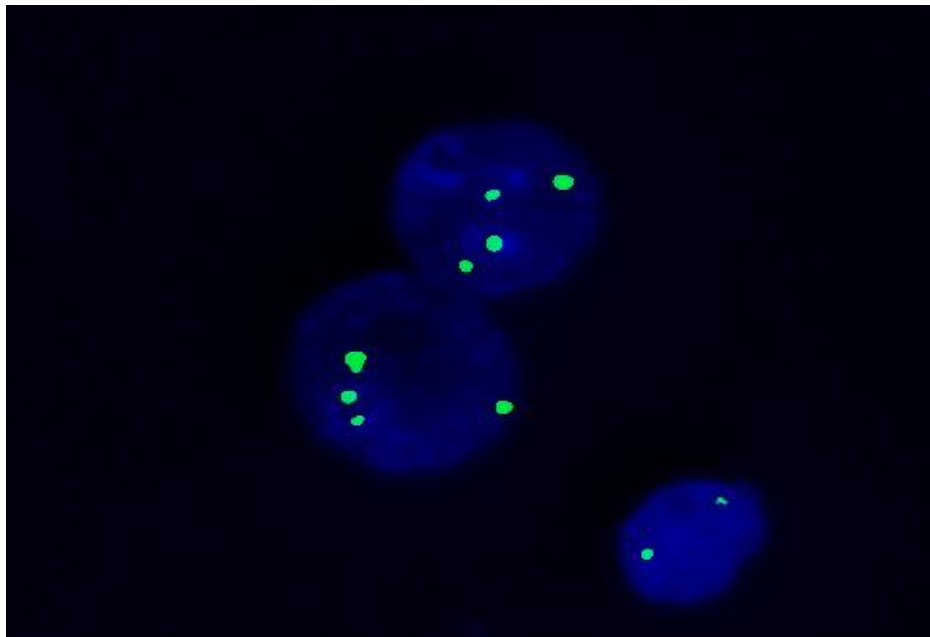




Μελέτη της επίδρασης γ-ακτινοβολίας χαμηλών δόσεων με μεθόδους κυτταρογενετικής και μοριακής γενετικής



Γκικούδη Αγγελική

Αθήνα, 2021 Υπεύθυνη ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”: Γεωργία Ι. Τερζούδη, Α’ Ερευνήτρια ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Ακτινοβολίες.....	9
1.1. Είδη ακτινοβολιών	9
1.2. Αλληλεπίδραση φωτονίων με την ύλη	9
1.2.1. Νόμος εκθετικής εξασθένησης	9
1.2.2. Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης φωτονίων με την ύλη	14
1.2.3. Συνεισφορά και πιθανότητα των μηχανισμών αλληλεπίδρασης στην εξασθένηση της δέσμης φωτονίων	20
1.5. Χαρακτηριστικά μεγέθη ακτινοβολιών	22
1.6. Διάκριση χαμηλών και υψηλών δόσεων/Τρόποι έκθεσης ανθρώπων σε χαμηλές δόσεις	25
Κεφάλαιο 2: Βασικές γνώσεις βιολογίας	27
2.1. Πυρήνας του κυττάρου και δομή DNA	27
2.1.1. Δομή χρωμοσωμάτων στα ευκαρυωτικά κύτταρα	28
2.1.2. Κυτταρικός κύκλος	29
2.1.3. Σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.....	30
2.1.4. Ανθρώπινα λεμφοκύτταρα	31
Κεφάλαιο 3: Βιολογικές αλληλεπιδράσεις των ιοντίζουσων ακτινοβολιών.....	32
3.1. Στάδια αλληλεπίδρασης ακτινοβολίας με βιολογικούς οργανισμούς	33
3.1.1. Έμμεση δράση ακτινοβολίας	33
3.1.2. Άμεση δράση ακτινοβολίας	35
3.2. Βλάβες DNA.....	36
3.2.1. Θραύσεις αλυσίδας DNA	37
3.2.2. Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί.....	38
3.3.3. Χρωμοσωματικές αλλοιώσεις.....	39
3.4. Επίδραση του οξυγόνου (Λόγος επαυξήσεως οξυγόνου/OER)	43
3.5. Επικινδυνότητα των ιοντιζουσών ακτινοβολιών	43
3.6. Γραμμικό τετραγωνικό μοντέλο.....	45

3.7. Επικινδυνότητα στην κλίμακα των χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας	47
3.8. Γενωμική αστάθεια	48
3.8.1. Χρωμοσωμική αστάθεια	48
3.8.2. Ανευπλοειδία	49
3.9. Εισαγωγή στην βιοδοσιμετρία	50
Κεφάλαιο 4: Μέθοδοι κυτταρογενετικής και μοριακής γενετικής	51
4.1. Μέθοδος κλασικής βιοδοσιμετρίας	51
4.2. Μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης-Μέθοδος μικροπυρήνων	53
4.3. Μέθοδος της φωσφορυλιωμένης ιστονικής πρωτεΐνης H2A (γ-H2AX)	55
4.4. Μέθοδοι GTG-ζώνωσης και φθορισμού in situ υβριδισμού (Fluorescence in situ hybridization assay /FISH)	57
4.5. Μέθοδος πρόωρης χρωμοσωμικής συμπύκνωσης (Premature Chromosome Condensation/PCC)	58
Κεφάλαιο 5: Πειραματική διαδικασία	59
5.1. Μελέτη επίδρασης χαμηλής δόσης γ ακτινοβολίας με την μέθοδο αναστολής της κυτταροκίνησης-Μέθοδος μικροπυρήνων (CBMN)	59
5.2. Ανάλυση βλαβών DSBs με την μέθοδο της φωσφορυλιωμένης ιστονικής πρωτεΐνης H2AX (γ-H2AX/foci)	62
5.3. Ανάλυση ανευπλοειδικών κυττάρων με συνδυασμό της μεθόδου των μικροπυρήνων και της μεθόδου φθορισμού in situ υβριδισμού (CBMN i-FISH)	68
Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα	72
6.1. 1η Σειρά πειραμάτων: Μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης (Μικροπυρήνες)	72
6.2. 2η Σειρά πειραμάτων: Μέθοδος ανάλυσης εστιών γ-H2AX (γ-H2AX foci)	74
6.3. 3η Σειρά πειραμάτων: Μέθοδος μελέτης ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων (CBMN-iFISH) ..	76
Κεφάλαιο 7: Συζήτηση	79
7.1. 1η Σειρά πειραμάτων: Μέθοδος μικροπυρήνων	79
7.2. 2η Σειρά πειραμάτων: Μέθοδος της φωσφορυλιωμένης ιστονικής πρωτεΐνης H2AX (γ-H2AX/foci)	80
7.3. 3η Σειρά πειραμάτων: Μέθοδος μελέτης ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων	81
Βιβλιογραφία	83

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην επιβλέποντα καθηγήτρια της παρούσας διπλωματικής εργασίας Δρ. Γεωργία Τερζούδη, Α' Ερευνήτρια του Ινστιτούτου Υγαιοφυσικής και Περιβαλλοντικής Υγιεινής ΙΠΤ-Α, ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος" για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε καθώς και για τις γνώσεις και την καθοδήγηση που μου πρόσφερε. Ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω και στην υποψήφια Διδάκτορα Μάρθα Χαμπίμπη για την βοήθεια, την καθοδήγηση και την εξαιρετη συνεργασία που είχαμε.

Τέλος, θέλω να εκφράσω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και τους φίλους μου για την στήριξη και την κατανόηση που μου έδειξαν σε όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

Περίληψη

Ο άνθρωπος στην καθημερινότητα του εκτίθεται σε πλήθος πηγών ακτινοβολίας, ιοντίζουσας και μη. Λόγω των καθοριστικών επιδράσεων των ιοντιζουσών ακτινοβολιών στην υγεία των έμβιων όντων, η επιστημονική κοινότητα εδώ και πολλές δεκαετίες ερευνά τα ακριβή αποτελέσματα των εκθέσεων σε πηγές ιοντίζουσας ακτινοβολίας με σκοπό τη συσχέτιση της έκθεσης με χρωμοσωματικές αλλοιώσεις, χρωμοσωματική αστάθεια και ανευπλοειδία, οι οποίες είναι διεθνώς αποδεκτό πως συμβάλλουν στο μηχανισμό καρκινογένεσης μετά από έκθεση σε ακτινοβολία, την θέσπιση αρχών προστασίας από αυτές αλλά και την εκμετάλλευση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης τους με τα βιολογικά υλικά για θεραπευτικούς σκοπούς.

Τα τελευταία χρόνια οι μελέτες που αφορούν την επίδραση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών έχουν επεκταθεί και στην κλίμακα των χαμηλών δόσεων, καθώς η χρήση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών κατά τις ιατρικές πράξεις για διαγνωστικούς σκοπούς είναι αρκετά αυξημένη. Μεγάλη μερίδα ανθρώπων πλέον υποβάλλεται ετησίως σε πλήθος διαγνωστικών εξετάσεων με αποτέλεσμα να εκτίθενται σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας, των οποίων επίδραση δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως έως σήμερα.

Σε αυτή την κατεύθυνση δομήθηκε η παρούσα διπλωματική εργασία, καθώς το αντικείμενο της είναι η μελέτη της επίδρασης χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας με μεθόδους κυτταρογενετικής και μοριακής γενετικής όπως η μέθοδος Μικροπυρήνων (MN), η μέθοδος ανάλυσης εστιών γ -H2AX (γ -H2AX foci) και η μέθοδος φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH).

Πιο συγκεκριμένα, η παρούσα εργασία χωρίστηκε σε τρία τμήματα, κάθε ένα από τα οποία αφορά διαφορετική μέθοδο ανάλυσης. Συνολικά λήφθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από 5 υγιείς δότες, τα οποία αναλύθηκαν μετά από *in vitro* έκθεση τους σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας.

Η πρώτη σειρά πειραμάτων περιλαμβάνει την εφαρμογή της μεθόδου των μικροπυρήνων για όλους τους δότες με *in vitro* έκθεση των δειγμάτων σε δόσεις ακτινοβολίας 0,05 και 1 Gy. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι η μέθοδος των μικροπυρήνων δεν ανιχνεύει στατιστικώς σημαντική αύξηση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων για χαμηλή δόση ακτινοβολίας (50 mGy). Επίσης, έδειξαν ότι υπάρχει μεγάλη διακύμανση της συχνότητας εμφάνισης των μικροπυρήνων τόσο στο υπόβαθρο όσο και στα ακτινοβολημένα δείγματα με την χαμηλή δόση ακτινοβολίας.

Η δεύτερη σειρά πειραμάτων αφορά την πλέον ευαίσθητη μέθοδο για την ανίχνευση χαμηλών δόσεων ιοντίζουσας ακτινοβολίας, την μέθοδο της φωσφορυλιωμένης ιστονικής πρωτεΐνης H2A (γ -H2AX). Με την συγκεκριμένη μέθοδο αναλύθηκαν όλα τα δείγματα μετά από *in vitro* έκθεση τους στην χαμηλή δόση ακτινοβολίας των 0,05 Gy και τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι προκλήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση των ακτινοεπαγόμενων γ -H2AX εστιών σε σχέση με τα μη-ακτινοβολημένα δείγματα (control) αμέσως μετά την έκθεση. Η διαφορά παρέμεινε στατιστικώς σημαντική και 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση με τον αριθμό των καταμετρούμενων foci μειωμένο λόγω της επιδιόρθωσης. Σημαντικό αποτέλεσμα είναι επίσης η διακύμανση στην επιδιόρθωση των DSBs μεταξύ των δοτών όπως προκύπτει από την ανάλυση των δειγμάτων 24 ώρες μετά την έκθεση.

Η τελευταία σειρά πειραμάτων επικεντρώθηκε στην μελέτη της επαγόμενης χρωμοσωματικής αστάθειας μετά από έκθεση σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας με τη μέθοδο ανίχνευσης ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων. Για τον σκοπό αυτό εφαρμόστηκε συνδυασμός της μεθόδου των μικροπυρήνων και της μεθόδου φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (i-CBMN) για τους 3 πρώτους υγιείς δότες μετά από *in vitro* έκθεση των δειγμάτων σε δόσεις ακτινοβολίας 0,05 και 2 Gy, για δύο

διαφορετικά χρονικά σημεία μετά την έκθεση (72 και 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση). Τα πρώιμα αποτελέσματα της τρίτης σειράς πειραμάτων δεν υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική δόσο-εξαρτώμενη αύξηση των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων μετά από έκθεση στην χαμηλή δόση ακτινοβολίας των 0,05 Gy για κανένα από τα τρία χρονικά σημεία.

Συμπερασματικά, για την βαθύτερη κατανόηση των επιδράσεων των χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας και κατ'επέκταση του κινδύνου που αυτές εγκυμονούν κατά τις ιατρικές εκθέσεις τόσο για τους ασθενείς όσο και για τους εργαζόμενους είναι αναγκαίο να ερευνηθεί περαιτέρω η συσχέτιση της επαγωγής και της επιδιόρθωσης των εστιών γ-H2AX με τις βιολογικές επιπτώσεις σε επίπεδο κυττάρου. Επιπλέον, η παρακολούθηση της εξέλιξης των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων μετά από αρκετούς κυτταρικούς κύκλους αλλά και συσχέτισή τους με χρωμοσωματική αστάθεια και ανευλοειδία μπορεί να συμβάλει καταλυτικά στην κατανόηση των πολύπλοκων μηχανισμών ακτινοπροκλητής καρκινογένεσης.

Abstract

Our daily lives are full of exposures in many sources of ionizing and non-ionizing radiation. The interaction of ionizing radiation with biological materials has tremendous results in individuals' health. That is the main reason that led the scientific community to investigate the exact results that come from the exposure in ionizing radiation. The main goals over the decades was to find the correlation between the exposure and the increase of chromosomal abnormalities, genomic instability and aneuploidy, as they contribute to the mechanism of carcinogenesis after exposure to radiation, to establish the main principles of radiation protection and to take in advantage the results of the interaction of ionizing radiation with biological materials for therapeutic purposes.

In recent years, the use of ionizing radiation for diagnostic purposes has been increased and that results to the expansion of the ionizing radiation effects research in the low dose scale. Annually, a large portion of people getting exposed to low doses of ionizing radiation as they undergo diagnostic testing that involves ionizing radiation but the biological effects of the low dose exposures has not been fully elucidated.

The present study was structured in this direction, as the topic is the investigation of the low dose ionizing radiation effect in biological materials with cytogenetics and molecular genetics methods such as the Micronucleus (MN) method, the phosphorylated histone γ -H2AX method (γ -H2AX foci) and the fluorescence in situ hybridization (FISH) method. More specifically, the study was divided in three sections and in each section one of the three methods is included. Peripheral blood samples were obtained from 5 healthy donors, and irradiated with low doses of radiation.

The first series of experiments involves the application of the micronucleus method for all 5 in vitro exposed samples with 0,05 and 1 Gy. The results of the analysis showed that the micronucleus method does not detect a statistically significant increase in chromosomal lesions for a low radiation dose (50 mGy). Also, the results of the analysis showed that there is a large variation in the number micronucleus in both control and low irradiated samples.

The second series of experiments includes the most sensitive method for the detection of the low dose ionizing radiation results, the method of phosphorylated histone γ -H2AX . This method was used for the analysis of samples that obtained from all 5 healthy donors after their in vitro exposure to low radiation dose of 0.05 Gy. The results of the analysis showed that there was a statistically significant increase in gamma-induced γ -H2AX foci compared to non-irradiated samples (control) right after the exposure and 24 hours post exposure with a total decrease of the counted γ -H2AX foci due to repair after 24 hours. An important result regarding the repair of DSBs is the large variation of repair among donors as the analysis of the samples 24 hours after radiation showed.

The last series of experiments focused on the study of induced chromosomal instability after exposure to low doses of radiation by the method of detecting asymmetric cell divisions. For this purpose, a combination of the Micronucleus method and the fluorescence in situ hybridization method (i-CBMN) was applied for the first 3 healthy donors after irradiation of the samples with 0.05 and 2 Gy doses, for two different time points after exposure (72 and 96 hours after irradiation). According to preliminary results that obtained from the third series of experiments, there is not a statistically

significant dose-dependent increase in asymmetric cell divisions after exposure to low radiation dose for any of the three time points.

In conclusion, in order to have a better overview of the effects of low radiation doses and the consequent risk for both patients and radiation workers, further research in the direction of association the induction and repair of γ -H2AX foci with biological effects at the cellular level is needed.

Furthermore, the analysis of asymmetric cell divisions after several cell cycles and their correlation with chromosomal instability and aneuploidy can contribute effectively in the understanding of the mechanisms of radiation carcinogenesis.

Κεφάλαιο 1: Ακτινοβολίες

1.1. Είδη ακτινοβολιών

Βασικό κριτήριο για τον διαχωρισμό των ακτινοβολιών, είτε είναι φυσικές είτε έχουν δημιουργηθεί από τον άνθρωπο, αποτελεί η ικανότητα τους ή η μη ικανότητα τους να προκαλούν ιονισμό των ατόμων της ύλης κατά την αλληλεπίδραση τους με αυτή.

Οι ακτινοβολίες που μεταφέρουν αρκετή ενέργεια στην ύλη προκαλώντας τον ιονισμό των ατόμων ονομάζονται ιονίζουσες ακτινοβολίες. Αντίστοιχα, οι ακτινοβολίες που δεν μεταφέρουν ενέργεια ικανή να εισχωρήσει στην ύλη ονομάζονται μη ιονίζουσες.

Οι ιονίζουσες ακτινοβολίες κατά την αλληλεπίδραση τους με βιολογικούς οργανισμούς, όπως ο άνθρωπος, διασπούν βίαια χημικούς δεσμούς με αποτέλεσμα την πρόκληση βιολογικών βλαβών. Για αυτό τον λόγο, εδώ και πολλές δεκαετίες, αποτελούν μεγάλο αντικείμενο μελέτης με σκοπό την προστασία μας από αυτές αλλά και την αξιοποίηση τους σε ποικίλους τομείς της καθημερινής μας ζωής, όπως ο τομέας της υγείας.

Μια σημαντική διάκριση των ιονίζουσων ακτινοβολιών σχετίζεται με την φύση τους. Η πρώτη κατηγορία αφορά τις ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες (φωτόνια) όπου προκαλούν έμμεσα ιοντισμό στην ύλη. Οι έμμεσα ιονίζουσες ακτινοβολίες διαχωρίζονται βάσει του μηχανισμού με τον οποίο δημιουργούνται. Αναφέρουμε, λοιπόν, ότι υπάρχει:

- Η ακτινοβολία Bremsstrahlung όπου πρόκειται για συνεχείς ακτίνες Χ, δηλαδή ακτινοβολία με συνεχές φάσμα, οι οποίες εκπέμπονται κατά τις αλληλεπιδράσεις ηλεκτρονίων με πυρήνες ατόμων.
- Οι χαρακτηριστικές ακτίνες Χ, ακτινοβολία με διακριτό φάσμα, οι οποίες εκπέμπονται κατά τις μεταπτώσεις τροχιακών ηλεκτρονίων.
- Η ακτινοβολία γ, ακτινοβολία με διακριτό φάσμα, η οποία εκπέμπεται κατά τις αποδιεγέρσεις πυρήνων.
- Η ακτινοβολία εξαύλωσης, ακτινοβολία με διακριτό φάσμα και ενέργειας συνήθως 0,511MeV, η οποία εκπέμπεται κατά την εξαύλωση ηλεκτρονίου-ποζιτρονίου.

Η δεύτερη κατηγορία αφορά τις σωματιδιακές ακτινοβολίες. Σε αυτή την περίπτωση, τα σωματίδια είτε είναι αφόρτιστα (νετρόνια), με συνέπεια να ιονίζουν έμμεσα την ύλη, είτε φορτισμένα (ηλεκτρόνια, ποζιτρόνια, πρωτόνια, σωματίδια-α) τα οποία προκαλούν άμεσο ιοντισμό της ύλης.

(1)

1.2. Αλληλεπίδραση φωτονίων με την ύλη

1.2.1. Νόμος εκθετικής εξασθένησης

Μια δέσμη φωτονίων καθώς διέρχεται από ένα υλικό υφίστανται εξασθένηση λόγω των αλληλεπιδράσεων των φωτονίων που την αποτελούν με την ύλη. Τα φωτόνια είτε σκεδάζονται από τα άτομα του υλικού με συνέπεια την εκτροπή της πορείας τους από την αρχική τους διεύθυνση και την μείωση της ενέργειάς τους,

είτε απορροφούνται από την ύλη μεταφέροντας την ενέργεια τους σε άτομα του υλικού. Αν εξετάσουμε στατιστικά το σύνολο των φωτονίων που αλληλεπιδρούν με την ύλη τότε η μεταβολή της συνολικής έντασης της δέσμης dI , όταν αυτή διέρχεται από υλικό μέσο πάχους dx , περιγράφεται από τον γραμμικό συντελεστή εξασθένησης μ και δίνεται από την σχέση:

$$dI = -\mu \cdot dx(1.1)$$

Με ολοκλήρωση της 1.1 για πεπερασμένο πάχος υλικού x , προκύπτει ότι η τελική ένταση μονοενεργειακής δέσμης φωτονίων $I(x)$, η οποία διέρχεται από υλικό πάχους x δίνεται από την μαθηματική σχέση:

$$I(x) = I(0) \cdot e^{-\mu(h\nu, Z) \cdot x}(1.2)$$

όπου

$I(0)$ η αρχική ένταση της δέσμης φωτονίων,

$\mu(h\nu, Z)$ ο γραμμικός συντελεστής εξασθένησης ο οποίος εξαρτάται από την ενέργεια της διερχόμενης μονοενεργειακής δέσμης φωτονίων $h \cdot \nu$ και από τον ατομικό αριθμό Z του υλικού το οποίο προκαλεί την εξασθένηση της δέσμης.

Σε αυτό το σημείο είναι σκόπιμο να αναφέρουμε ορισμένα σημαντικά μεγέθη τα οποία συναντάμε σε υπολογιστικά προβλήματα σχετικά με την εξασθένηση ακτινοβολιών.

Αρχικά, θα αναφερθούμε σε δύο μεγέθη που περιγράφουν το πάχος υλικού, το HVL και το TVL.

Ως half-value layer, το οποίο συμβολίζεται HVL ή $x_{1/2}$, ορίζεται το πάχος του υλικού στο οποίο η δέσμη φωτονίων θα έχει χάσει το 50% της αρχικής της έντασης.

Με απλή αντικατάσταση στον νόμο της εκθετικής εξασθένησης προκύπτει ότι το HVL δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$x_{1/2} = HVL = \frac{(\ln 2)}{\mu}(1.3)$$

Από την σχέση 1.3 προκύπτει η σχέση υπολογισμού του γραμμικού συντελεστή εξασθένησης ως εξής:

$$\mu = \frac{(\ln 2)}{HVL} = \frac{0,693}{HVL}(1.4)$$

Αναλογικά με τη σχέση 1.3 , ως tenth-value layer, το οποίο συμβολίζεται TVL ή $x_{1/10}$, ορίζεται το πάχος του υλικού στο οποίο η δέσμη φωτονίων θα έχει χάσει το 90% της αρχικής της έντασης, δηλαδή θα έχει τιμή ίση με το 1/10 της αρχικής της έντασης. Η σχέση με την οποία υπολογίζεται το TVL προκύπτει από τον νόμο της εκθετικής εξασθένησης και ορίζεται ως:

$$x_{1/10} = HVL = \frac{(\ln 10)}{\mu}(1.5)$$

Η παραπάνω προσέγγιση του προβλήματος είναι μακροσκοπική και η σύγκλιση της με την μικροσκοπική προσέγγιση του προβλήματος γίνεται μέσω της σχέσης του γραμμικού συντελεστή εξασθένησης μ με τη ενεργό διατομή σ .

Η σχέση αυτή προκύπτει αν αναλύσουμε το πρόβλημα μικροσκοπικά.

Ισχύει ότι η μείωση του αριθμού των φωτονίων στον όγκο του απορροφητή, πάχους dx και διατομής da , ισούται με το γινόμενο της πιθανότητας να αλληλεπιδράσει με ένα άτομο $\frac{\sigma_a \cdot N}{A}$ με τον αριθμό των ατόμων ανά μονάδα όγκου $\frac{\rho \cdot N_A}{A}$. Έτσι, προκύπτει η εξής σχέση:

$$\frac{-dN}{dV} = \frac{\rho \cdot N_A}{A} \cdot \frac{\sigma_a \cdot N}{A}(1.6)$$

$$\frac{dN}{dx} = - \left[\frac{\rho \cdot N_A \cdot \sigma_a}{A} \right] \cdot N(1.7)$$

όπου

dV ο στοιχειώδης όγκος του απορροφητή,

da η στοιχειώδης διατομή του απορροφητή,

dx το στοιχειώδες πάχος του απορροφητή,

dN η στοιχειώδης ποσότητα του αριθμού των φωτονίων στον στοιχειώδη όγκο του απορροφητή dV ,

N ο αριθμός των φωτονίων στον όγκο του απορροφητή,

ρ η πυκνότητα του υλικού του απορροφητή,

A το ατομικό βάρος του υλικού του απορροφητή,

σ_a η ενεργός διατομή του απορροφητή όπου αντιστοιχεί στην πιθανότητα αλληλεπίδρασης των φωτονίων με κάποιο άτομο του απορροφητή και έχει μονάδες επιφανείας,

N_A ο αριθμός Avogadro ο οποίος ισούται με $6,022 \cdot 10^{23}/\text{mole}$.

Ο αριθμός των φωτονίων που έχουν αλληλεπιδράσει με το υλικό και συνεπώς αφαιρούνται από την δέσμη για $\mu \cdot x \ll 1$ είναι:

$$dN = N_0 - N = -\mu \cdot N \cdot dx(1.8)$$

$$\frac{dN}{dx} = -\mu \cdot N(1.9)$$

Αν συγκρίνουμε τις σχέσεις 1.7 και 1.9 προκύπτει η σχέση μεταξύ του γραμμικού συντελεστή εξασθένησης μ και της ενεργού διατομής σ :

$$\mu = \frac{\rho \cdot N_A \cdot \sigma_a}{A}(1.10)$$

Ο γραμμικός συντελεστής εξασθένησης αποτελεί σημαντική παράμετρο του νόμου εκθετικής εξασθένησης. Όπως αναφέραμε, εξαρτάται από την ενέργεια της προσπίπτουσας δέσμης φωτονίων, τον ατομικό αριθμό του υλικού και την μάζα του, όχι όμως από την πυκνότητα του. Επομένως, αν θέλουμε να απαλλαγούμε από την εξάρτηση με την πυκνότητα μπορούμε να διαιρέσουμε με την πυκνότητα ρ και τότε αυτομάτως θα προκύψει ο μαζικός συντελεστής εξασθένησης μ_m .

Επιπλέον, ανάλογα με το τι επιδιώκουμε να υπολογίσουμε μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε εναλλακτικά τον ατομικό συντελεστή εξασθένησης μ_a και τον ηλεκτρονικό συντελεστή εξασθένησης μ_e . Η σχέση των δύο αυτών συντελεστών με τον γραμμικό συντελεστή εξασθένησης δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\mu = \mu_m \cdot \rho = \frac{\rho \cdot N_A}{A} \cdot \mu_a = \frac{\rho \cdot N_A \cdot Z}{A} \cdot \mu_e(1.11)$$

Τυπικές μονάδες για τους γραμμικό, μαζικό, ατομικό και ηλεκτρονικό συντελεστές εξασθένησης είναι: cm^{-1} , cm^2/g , $\text{cm}^2/\text{άτομο}$ και $\text{cm}^2/\text{ηλεκτρόνιο}$, και αντίστοιχα το πάχος x στον εκθέτη θα πρέπει να δίνεται σε cm , g/cm^2 , $\text{άτομα}/\text{cm}^2$ και $\text{ηλεκτρόνια}/\text{cm}^2$ προκειμένου ο εκθέτης να είναι αδιάστατος.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφέρουμε και κάποιους εναλλακτικούς συντελεστές εξασθένησης η οποία χρησιμοποιούνται ευρέως σε προβλήματα δοσιμετρίας.

Αρχικά, θα ορίσουμε τον συντελεστή ενεργειακής μεταφοράς μ_{tr} ο οποίος περιγράφεται από την σχέση:

$$\mu_{tr} = \mu \cdot \frac{\bar{E}_{tr}}{h \cdot \nu}(1.12)$$

όπου

μ ο γραμμικός συντελεστής εξασθένησης,

\bar{E}_{tr} η μέση ενέργεια που μεταφέρεται σε φορτισμένα σωμάτια (ηλεκτρόνια, ποζιτρόνια) του

υλικού του απορροφητή και

$h \cdot \nu$ η ενέργεια του αρχικού φωτονίου.

Στην συνέχεια, θα ορίσουμε τον συντελεστή ενεργειακής απορρόφησης μ_{ab} (ή μ_{en}) ο οποίος περιγράφεται από τη σχέση:

$$\mu_{ab} = \mu \cdot \frac{E_{ab}^-}{h \cdot \nu} \quad (1.13)$$

όπου

μ ο γραμμικός συντελεστής εξασθένησης,

E_{ab}^- η μέση ενέργεια που εναποτίθεται από τα φορτισμένα σωματρία (ηλεκτρόνια, ποζιτρόνια)

στον απορροφητή και

$h \cdot \nu$ η ενέργεια του αρχικού φωτονίου.

Τέλος, οι συντελεστές ενεργειακής μεταφοράς και απορρόφησης, μ_{tr} και ο μ_{ab} αντίστοιχα, συνδέονται μεταξύ τους μέσω της σχέσης:

$$\mu_{ab} = \mu_{tr} \cdot \left(1 - \frac{E_{sc}}{E_{tr}}\right) \quad (1.14)$$

$$\mu_{ab} = \mu_{tr} \cdot (1 - g) \quad (1.15)$$

όπου

E_{sc} η μέση ενέργεια που σκεδάζεται από την ύλη και

$g = \frac{E_{sc}}{E_{tr}}$ το κλάσμα σκέδασης.

Η σχέση 1.15 προκύπτει από το ισοζύγιο ενέργειας:

$$E_{tr} = E_{ab} + E_{sc} \quad (1.16)$$

Με αντικατάσταση των 1.12 και 1.13 προκύπτει:

$$\frac{\mu_{tr}}{\mu} h \cdot \nu = \frac{\mu_{ab}}{\mu} h \cdot \nu + E_{sc} \quad (1.17)$$

$$\mu_{tr} = \mu_{ab} + E_{sc} \cdot \frac{\mu}{h \cdot \nu} \quad (1.18)$$

$$\mu_{ab} = \mu_{tr} \cdot \left(1 - \frac{E_{sc}}{h \cdot \nu} \cdot \frac{\mu}{\mu_{tr}}\right) \quad (1.19)$$

$$\mu_{ab} = \mu_{tr} \cdot \left(1 - \frac{E_{sc}}{E_{tr}}\right) \quad (1.20)$$

$$\mu_{ab} = \mu_{tr} \cdot (1 - g) \quad (1.21)$$

(1)

1.2.2. Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης φωτονίων με την ύλη

Σε πρώτο στάδιο θα περιγράψουμε τους βασικούς μηχανισμούς αλληλεπίδρασης των φωτονίων, με τα άτομα του υλικού, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την μείωση της συνολικής έντασης της δέσμης.

- Φωτοηλεκτρικό φαινόμενο (Photoelectric effect)

Αποτελεί μηχανισμό απορρόφησης των φωτονίων κατά τον οποίο το φωτόνιο αλληλεπιδρά με δέσμιο τροχιακό ηλεκτρόνιο ατόμου του υλικού με αποτέλεσμα την μεταφορά ολόκληρης της ενέργειας του σε αυτό. Το τροχιακό ηλεκτρόνιο λαμβάνοντας την ενέργεια του φωτονίου (η οποία είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια σύνδεσης του ηλεκτρονίου) απομακρύνεται από το άτομο ως φωτοηλεκτρόνιο με κινητική ενέργεια E_K η οποία δίνεται ως:

$$E_K = h \cdot \nu - E_B \quad (1.22)$$

όπου

$h \cdot \nu$ η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου και

E_B η ενέργεια σύνδεσης του ηλεκτρονίου.

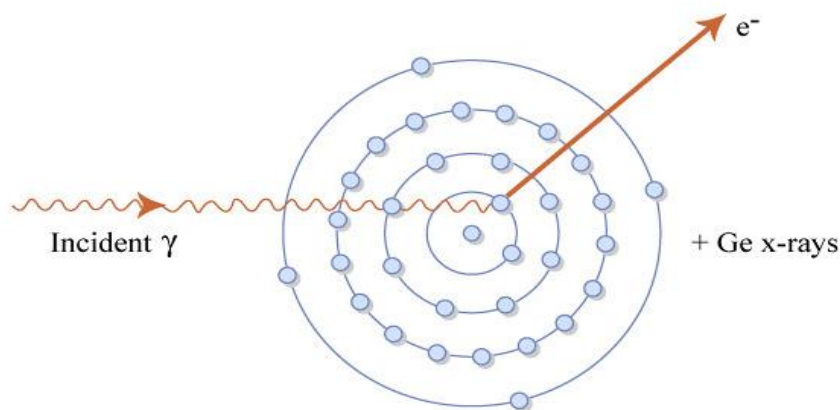
Το κενό που θα δημιουργηθεί στην εσωτερική στοιβάδα λόγω της απώλειας του φωτοηλεκτρονίου θα καλυφθεί από ηλεκτρόνιο εξωτερικής στοιβάδας και κατά την αποδιέγερση του θα εκπεμφθεί χαρακτηριστική ακτινοβολία, η οποία θα συνοδεύει τον ιονισμό του ατόμου λόγω της απώλειας του φωτοηλεκτρονίου.

Η πιθανότητα αλληλεπίδρασης ενός φωτονίου με φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, όπως και με κάθε άλλο μηχανισμό αλληλεπίδρασης, περιγράφεται από το μέγεθος της ενεργού διατομής σ . Η ενεργός διατομή εμφανίζει εξάρτηση από την ενέργεια του φωτονίου $h \cdot \nu$ και τον ατομικό αριθμό του υλικού Z . Συγκεκριμένα για το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, η ενεργός διατομή παρουσιάζει την παρακάτω εξάρτηση από αυτά μεγέθη:

$$\sigma_{ph} \propto \frac{Z^4}{(h\nu)^3} \quad (1.23)$$

Όπως φαίνεται από την σχέση 1.23 το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο κυριαρχεί για μικρές ενέργειες φωτονίων (της τάξης των keV) και μεγάλο ατομικό αριθμό υλικού απορροφητή.

Μια γραφική απεικόνιση του φωτοηλεκτρικού φαινομένου δίνεται στο σχήμα 1.1.



Σχήμα 1.1.: Σχηματικό διάγραμμα του φωτοηλεκτρικού φαινομένου. Φωτόνιο (incident photon) ενέργειας $h\nu$ αλληλεπιδρά με ισχυρά συνδεδεμένο ατομικό ηλεκτρόνιο μεταφέροντας ολόκληρη την ενέργεια του σε αυτό. Το ηλεκτρόνιο αποκτά κινητική ενέργεια E_k και απομακρύνεται από το άτομο ως φωτοηλεκτρόνιο. Το φαινόμενο συνοδεύεται από την εκπομπή χαρακτηριστικής ακτινοβολίας κατά την αποδιέγερση ηλεκτρονίου εξωτερικής στοιβάδας για την κάλυψη του κενού που δημιουργεί η απομάκρυνση του φωτοηλεκτρονίου.

- Δίδυμη γένεση (Pair production)

Κατά την δίδυμη γένεση το αλληλεπιδρών φωτόνιο εξαφανίζεται και στο πυρηνικό πεδίο Coulomb παράγεται ένα ζεύγος ηλεκτρονίου-ποζιτρονίου με συνολική κινητική ενέργεια ίση με $h \cdot \nu - 2 \cdot m_e \cdot c^2$. Όπως είναι προφανές, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αλληλεπίδραση της δίδυμης γένεσης η ενέργεια του αρχικού φωτονίου θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από ένα ενεργειακό κατώφλι. Πιο συγκεκριμένα, το αρχικό φωτόνιο θα πρέπει να έχει ενέργεια ίση ή μεγαλύτερη από το διπλάσιο της μάζας ηρεμίας του ηλεκτρονίου, δηλαδή, $h \cdot \nu \geq 2 \cdot m_e \cdot c^2 = 1,02 MeV$.

Η “διάρκεια ζωής” του ζεύγους ηλεκτρονίου-ποζιτρονίου είναι 10^{-7} s. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος το ζεύγος εξαϋλώνεται με παραγωγή ενός ζεύγους αντιδιαμετρικών και ίσων ενεργειακά φωτονίων.

Η πιθανότητα να αλληλεπιδράσει ένα προσπίπτον φωτόνιο με δίδυμη γένεση δίνεται από το μέγεθος της ενεργού διατομής η οποία δίνεται από την σχέση:

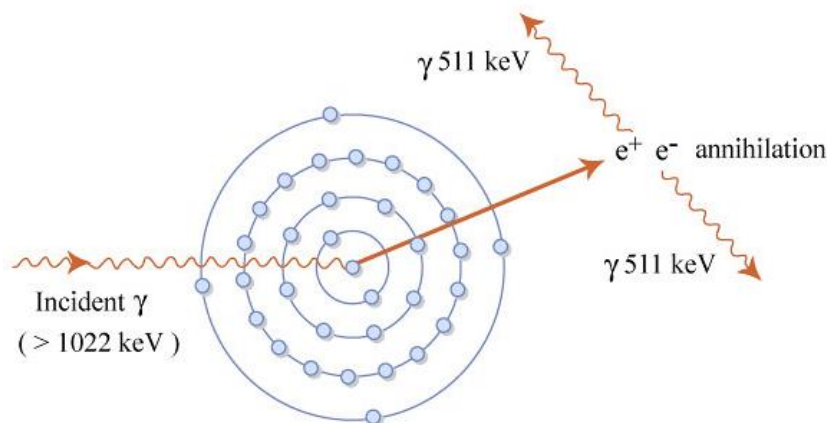
$$\sigma_{pe} \propto \ln(h \cdot \nu) \cdot Z^{\alpha} \quad (1.24)$$

όπου

Z ο ατομικός αριθμός του υλικού του απορροφητή,

α συντελεστής ο οποίος ισούται με $\alpha=2$ για μικρές τιμές Z και $\alpha<2$ για μεγάλες τιμές του Z.

Μια σχηματική απεικόνιση της πορείας του φαινομένου δίνεσαι το σχήμα 1.2



Σχήμα 1.2.: Σχηματικό διάγραμμα της δίδυμης γένεσης συνοδευόμενη από εξαϋλωση του ζεύγους ηλεκτρονίου-ποζιτρονίου. Από φωτόνιο (incident photon) ενέργειας μεγαλύτερης των 1022 keV δημιουργείται ζεύγος ηλεκτρονίου-ποζιτρονίου με χρόνο ζωής 10^{-7} s. Μετά το πέρας του διαστήματος των 10^{-7} s το ζεύγος εξαϋλώνεται και δημιουργείται ζεύγος αντιδιαμετρικών φωτονίων ενέργειας 511 keV έκαστος.

Όταν η δίδυμη γένεση λαμβάνει χώρα σε πεδίο τροχιακού ηλεκτρονίου το φαινόμενο ονομάζεται ως τρίδυμος γένεση. Τα τρία σωματίδια, δηλαδή το ζεύγος ηλεκτρονίου-ποζιτρονίου και το τροχιακό ηλεκτρόνιο μοιράζονται την διαθέσιμη ενέργεια. Το ενεργειακό κατώφλι αυτού του φαινομένου είναι $4 \cdot m_e \cdot c^2$.

- Σύμφωνη σκέδαση (Coherent scattering/ Rayleigh scattering)

Κατά την σύμφωνη σκέδαση το φωτόνιο αλληλεπιδρά με ένα τροχιακό ηλεκτρόνιο του ατόμου. Πρόκειται για ελαστική σκέδαση καθώς το φωτόνιο χάνει ελάχιστη ενέργεια (σχεδόν μηδενική) ενώ παράλληλα σκεδάζεται σε πολύ μικρή γωνία. Η σύμφωνη σκέδαση δεν έχει καμία συνεισφορά στον συντελεστή ενεργειακής μεταφοράς, καθώς δεν μεταφέρεται ενέργεια των φωτονίων σε φορτισμένα σωματίδια. Ωστόσο, αποτελεί συνιστώσα του συντελεστή εξασθένησης της δέσμης.

Η ατομική και η μαζική ενεργός διατομή της σύμφωνης σκέδασης περιγράφονται αντίστοιχα από τις παρακάτω αναλογίες:

$$\sigma_{coh} \propto \left(\frac{Z}{h \cdot \nu}\right)^2 \quad (1.25)$$

$$\frac{\sigma_{coh}}{\rho} \propto \frac{Z}{(h \cdot \nu)^2} \quad (1.26)$$

όπου

Z ο ατομικός αριθμός του υλικού του απορροφητή,

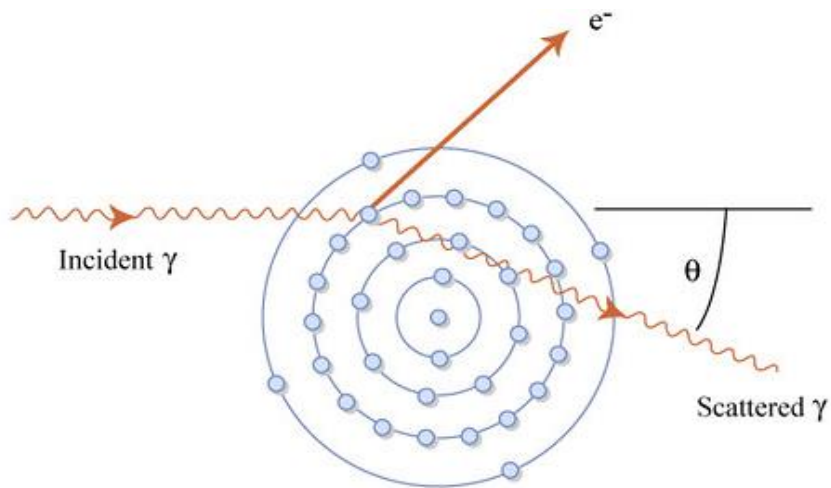
ρ η πυκνότητα του υλικού του απορροφητή και

$h \cdot \nu$ η ενέργεια του αλληλεπιδρώντος φωτονίου.

Προκύπτει ότι σε ιστούς ή υλικά ισοδύναμα ιστού η συνεισφορά της σύμφωνης σκέδασης συγκριτικά με την συνεισφορά των λοιπών μηχανισμών αλληλεπίδρασης των φωτονίων στην συνολική εξασθένηση της δέσμης είναι μικρής σημασίας.

- Σκέδαση Compton (Compton effect/ Incoherent scattering)

Πρόκειται για την αλληλεπίδραση ενός φωτονίου με ένα “ελεύθερο και στατικό” τροχιακό ηλεκτρόνιο κατά την οποία το προσπίπτον φωτόνιο έχει ενέργεια $h \cdot \nu$ πολύ μεγαλύτερη από την ενέργεια σύνδεσης του τροχιακού ηλεκτρονίου. Στην σκέδαση Compton το φωτόνιο χάνει μέρος της ενέργειας του, η οποία μεταφέρεται ως κινητική ενέργεια E_K στο ελεύθερο ηλεκτρόνιο (ηλεκτρόνιο ανάκρουσης), και σκεδάζεται σε γωνία θ με ενέργεια $h \cdot \nu'$ όπως φαίνεται και στο σχήμα 1.3.



Σχήμα 1.3.: Σχηματικό διάγραμμα της σκέδασης Compton. Φωτόνιο ενέργειας $h\nu$ αλληλεπιδρά με ελαφρά συνδεδεμένο ατομικό ηλεκτρόνιο. Το ηλεκτρόνιο απομακρύνεται από άτομο ως ηλεκτρόνιο ανάκρουσης με κινητική ενέργεια E_K και παράγεται ένα σκεδαζόμενο ηλεκτρόνιο ενέργειας $h\nu' = h\nu - E_K$

Η μεταβολή της ενέργειας του φωτονίου λόγω της σκέδασης μπορεί να περιγραφεί και μέσω της μεταβολής του μήκους κύματος ως:

$$\Delta\lambda = \lambda_c \cdot (1 - \cos(\theta)) \quad (1.27)$$

και

$$\lambda_c = \frac{h}{m_e \cdot c} = 0,0024 \text{ \AA} \quad (1.28)$$

όπου

θ η γωνία μεταξύ των διευθύνσεων του φωτονίου πριν και μετά την σκέδαση και

λ_c το μήκος κύματος Compton του ηλεκτρονίου.

Η σχέση 1.27 προκύπτει από την επίλυση των εξισώσεων διατήρησης ενέργειας και ορμής κατά την σκέδαση Compton. Η εξίσωση διατήρησης της ενέργειας περιγράφεται ως εξής:

$$h \cdot \nu + m_e \cdot c^2 = h \cdot \nu' + m_e \cdot c^2 + E_K \quad (1.29)$$

Αν ορίσουμε ως ϕ τη γωνία μεταξύ της διεύθυνσης του αρχικού φωτονίου και του ηλεκτρονίου ανάκρουσης η εξίσωση διατήρησης της ορμής στον άξονα x και y αντίστοιχα περιγράφεται ως εξής:

$$\frac{h \cdot v}{c} = \frac{h \cdot v'}{c} \cdot \cos(\theta) + \frac{m_e \cdot u}{\sqrt{1 - \left(\frac{u}{c}\right)^2}} \cdot \sin(\phi) \quad (1.30)$$

και

$$0 = \frac{h \cdot v'}{c} \cdot \sin(\theta) - \frac{m_e \cdot u}{\sqrt{1 - \left(\frac{u}{c}\right)^2}} \cdot \cos(\phi) \quad (1.31)$$

Αν θεωρήσουμε ως $\varepsilon = \frac{h \cdot v}{m_e \cdot c^2}$ την κανονικοποιημένη ενέργεια του αρχικού προσπίπτοντος φωτονίου προκύπτουν από τις σχέσεις 1.29, 1.30 και 1.31 οι σχέσεις της ενέργειας του σκεδαζόμενου φωτονίου, της κινητικής ενέργειας του φωτονίου ανάκρουσης και της γωνίας σκέδασης θ με την γωνία του ηλεκτρονίου ανάκρουσης ϕ αντίστοιχα ως εξής:

$$h \cdot v' = h \cdot v \cdot \frac{1}{1 + \varepsilon \cdot (1 - \cos(\theta))} \quad (1.32)$$

$$E_K = h \cdot v \cdot \frac{\varepsilon \cdot (1 - \cos(\theta))}{1 + \varepsilon \cdot (1 - \cos(\theta))} \quad (1.33)$$

$$\cot(\phi) = (1 + \varepsilon) \cdot \tan\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (1.34)$$

Από την εξίσωση 1.34 είναι προφανές ότι το εύρος της γωνίας ϕ είναι μεταξύ του 0 για $\theta=180^\circ$ (οπισθοσκέδαση φωτονίου) και 90° για $\theta=0$ (εμπρόσθια σκέδαση φωτονίου) για τυχαία ενέργεια φωτονίου. Για δεδομένη γωνία θ , όσο υψηλότερη είναι η ενέργεια του αρχικού φωτονίου, τόσο μικρότερη είναι η γωνία ϕ του ηλεκτρονίου ανάκρουσης.

Η σκέδαση Compton αντιπροσωπεύει την σκέδαση φωτονίου με ελεύθερο και στατικό ηλεκτρόνιο, όπου η ενέργεια του σκεδαζόμενου φωτονίου είναι πολύ μεγαλύτερη από την ενέργεια σύνδεσης του ατομικού ηλεκτρονίου ($h \cdot v \gg b$). Η ατομική ενεργός διατομή σ_{incoh} φαινομένου εξαρτάται γραμμικά από τον ατομικό αριθμό Z του υλικού του απορροφητή ενώ η ηλεκτρονιακή ενεργός διατομή σ_{incoh} και η μαζική ενεργός διατομή σ_{incoh}/ρ είναι ανεξάρτητες του ατομικού αριθμού Z.

Σημαντική είναι και η σχέση μεταξύ ατομικής και ηλεκτρονιακής ενεργού διατομής η οποία δίνεται ως εξής:

$$\sigma_{incoh} = Z \cdot \quad (1.35)$$

Η ηλεκτρονική ενεργός διατομή για το φαινόμενο Compton σ_{incoh} εξαρτάται από την ενέργεια του αρχικού φωτονίου μέσω της σχέσης Klein-Nishina:

$$\sigma_{\text{incoh}} = 2 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot \left\{ \frac{1+\alpha}{1-\alpha} \cdot \left[\frac{2 \cdot (1+\alpha)}{1+2\alpha} - \frac{\ln(1+2\alpha)}{2\alpha} \right] + \frac{\ln(1+2\alpha)}{2\alpha} - \frac{1+3\alpha}{(1+2\alpha)^2} \right\} \quad (1.36)$$

όπου

$\alpha = \frac{h \cdot \nu}{m_e \cdot c^2}$ το δυναμικό μεταξύ φωτονίου και ηλεκτρονίου με $h \cdot \nu$ την ενέργεια του αρχικού φωτονίου και $m_e \cdot c^2 = 0,511 \text{ MeV}$ την ενέργεια σύνδεσης του ηλεκτρονίου και $r = \frac{e^2}{m_e \cdot c^2} = 2,818 \cdot 10^{-13} \text{ cm}$ η κλασική ακτίνα του ηλεκτρονίου.

Η ατομική ενεργός διατομή του φαινομένου Compton προκύπτει αντικαθιστώντας την 1.35 στην σχέση:

$$\frac{\sigma_{\text{incoh}}}{\rho} = \frac{N_A \cdot Z}{A} \sigma_{\text{incoh}} \quad (1.37)$$

όπου

ρ η πυκνότητα του υλικού του απορροφητή,

Z ο ατομικός αριθμός του υλικού του απορροφητή,

A το ατομικό βάρος του υλικού του απορροφητή και

$N_A = 6,022 \cdot 10^{23} / \text{mole}$ ο αριθμός Avogadro.

(2)

1.2.3. Συνεισφορά και πιθανότητα των μηχανισμών αλληλεπίδρασης στην εξασθένηση της δέσμης φωτονίων

Μετά την αναλυτική περιγραφή των κύριων μηχανισμών αλληλεπίδρασης των φωτονίων με την ύλη είναι σκόπιμο να εξετάσουμε την συνεισφορά του καθενός στην συνολική εξασθένηση της δέσμης. Έτσι, για ένα φωτόνιο ενέργειας $h \cdot \nu$ και για υλικό απορροφητή με ατομικό αριθμό Z ο γραμμικός συντελεστής εξασθένησης μ , ο συντελεστής ενεργειακής μεταφοράς μ_{tr} , και ο συντελεστής ενεργειακής απορρόφησης μ_{ab} γράφονται ως άθροισμα των αντίστοιχων συντελεστών για κάθε μηχανισμό αλληλεπίδρασης του φωτονίου. Έτσι, προκύπτουν οι σχέσεις:

$$\mu = \tau + \sigma_R + \sigma_C + \kappa \quad (1.38)$$

$$\mu_{tr} = \tau_{tr} + (\sigma_c)_{tr} + \kappa_{tr} = \tau \cdot \frac{(\bar{E}_K)_{tr}^{PE}}{h \cdot \nu} + \sigma_c \cdot \frac{(\bar{E}_K)_{tr}^{CE}}{h \cdot \nu} + \kappa \cdot \frac{(\bar{E}_K)_{tr}^{PP}}{h \cdot \nu} \quad (1.39)$$

$$\mu_{ab} = \mu_{en} = \mu_{tr} \cdot (1 - g) = \tau \cdot \frac{(\bar{E}_K)_{tr}^{PE}}{h \cdot \nu} + \sigma_c \cdot \frac{(\bar{E}_K)_{tr}^{CE}}{h \cdot \nu} + \kappa \cdot \frac{(\bar{E}_K)_{tr}^{PP}}{h \cdot \nu} \cdot (1 - g) \quad (1.40)$$

όπου

g το κλάσμα σκέδασης,

$(\bar{E}_K)_{tr}^{PE} = h \cdot \nu - P_K \cdot \omega_K \cdot E_B(K)$ η ενέργεια που μεταφέρεται σε φορτισμένα σωματίδια

(ηλεκτρόνια και ποζιτρόνια) κατά το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο με $E_B(K)$ την ενέργεια

σύνδεσης του φωτονίου στην K στοιβάδα, P_K το ποσοστό όλων των φωτοηλεκτρικών

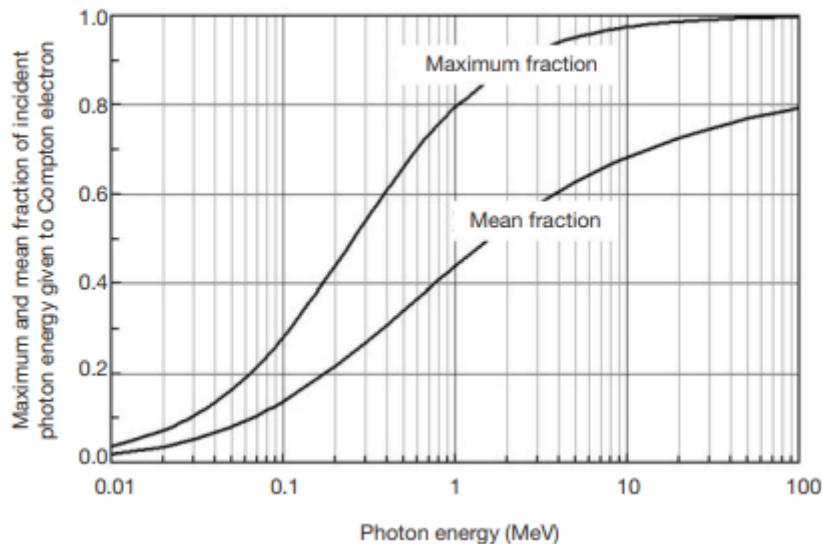
αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στην K στοιβάδα και ω_K το πεδίο φθορισμού της K

στοιβάδας,

$(\bar{E}_K)_{tr}^{CE}$ η ενέργεια που μεταφέρεται σε φορτισμένα σωματίδια κατά

την σκέδαση Compton με την τιμή αυτή να λαμβάνεται από πίνακες ή από το σχήμα 1.4

και $(\bar{E}_K)_{tr}^{PP} = h \cdot \nu - 2 \cdot m_e \cdot c^2$ η ενέργεια που μεταφέρεται σε φορτισμένα κατά την δίδυμη γένεση.

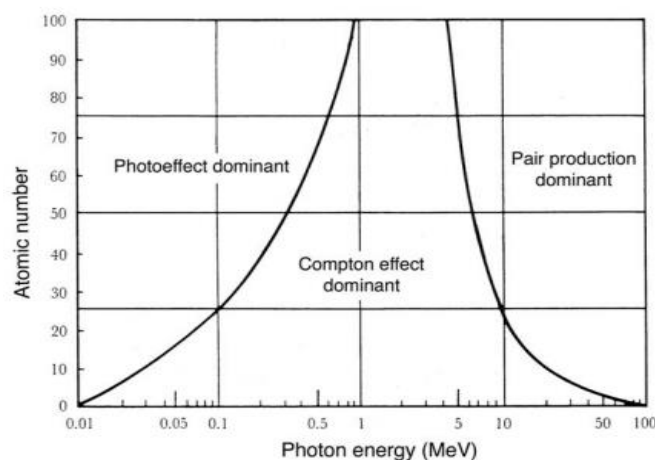


Σχήμα 1.4.: Μέγιστο και ελάχιστο κλάσμα ενέργειας του αρχικού φωτονίου που μεταφέρεται σε ηλεκτρόνιο ανάκρουσης Compton στο ενεργειακό εύρος 10 keV με 100 MeV. Τα δεδομένα έχουν ληφθεί από το Εθνικό Ινστιτούτο Επιστήμης και Τεχνολογίας (National Institute of Science and Technology-NIST).

Σημειώνεται ότι κατά την σύμφωνη σκέδαση δεν πραγματοποιείται μεταφορά ενέργειας, συνεπώς ο συγκεκριμένος τρόπος αλληλεπίδρασης δεν έχει συνεισφορά στους συντελεστές ενεργειακής μεταφοράς και απορρόφησης.

Συνοψίζοντας, είναι σημαντικό να εξετάσουμε ποιοτικά σε ένα κοινό διάγραμμα την πιθανότητα που έχει ένα φωτόνιο να αλληλεπιδράσει με το υλικό του απορροφητή με κάθε έναν από τους κύριους μηχανισμούς. Η πιθανότητα αυτή εξαρτάται από την ενέργεια του φωτονίου $h \cdot \nu$ και από τον ατομικό αριθμό Z του υλικού του απορροφητή.

Στο σχήμα 1.5 φαίνονται οι περιοχές στις οποίες υπερिशύχει ο κάθε μηχανισμός με παραμέτρους την ενέργεια και τον ατομικό αριθμό. Η αριστερή καμπύλη αντιστοιχεί στα σημεία του διαγράμματος όπου οι ατομικοί συντελεστές εξασθένησης του φωτοηλεκτρικού φαινομένου και του φαινομένου Compton είναι ίσοι και η δεξιά καμπύλη αντιστοιχεί στα σημεία του διαγράμματος όπου οι ατομικοί συντελεστές εξασθένησης του φαινομένου Compton και της δίδυμης γένεσης είναι ίσοι. Οι καμπύλες αυτές οριοθετούν τις περιοχές υπεροχής του κάθε φαινομένου.



Σχήμα 1.5.: Περιοχές σχετικής υπεροχής του κάθε ενός εκ των τριών κύριων μηχανισμών αλληλεπίδρασης των φωτονίων με την ύλη.

(1)

1.4. Χαρακτηριστικά μεγέθη ακτινοβολιών

- Απορροφούμενη δόση

Η απορροφούμενη δόση D είναι μη στοχαστικό μέγεθος και αφορά άμεσα και έμμεσα ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Όπως αναφέραμε και παραπάνω, η διαδικασία με την οποία η έμμεσα ιοντίζουσα ακτινοβολία εναποθέτει ενέργεια στην ύλη χωρίζεται σε δύο στάδια, την μεταφορά ενέργειας σε δευτερογενή φορτισμένα σωματίδια και την εναπόθεση αυτής της κινητικής ενέργειας των σωματιδίων στο υλικό του μέσου. Στο δεύτερο στάδιο, ένα μέρος της κινητικής ενέργειας απορροφάται τοπικά από το υλικό του μέσου (απορροφούμενη δόση) και ένα μέρος χάνεται με μορφή ακτινοβολίας (ακτινοβολίας bremsstrahlung, εξαΰλωση).

Συνεπώς, η απορροφούμενη δόση μπορεί να συσχετιστεί με το στοχαστικό μέγεθος της ενέργειας που εναποτίθεται τοπικά και ορίζεται ως η μέση ενέργεια $\bar{\epsilon}$ που εναποτίθεται από ιοντίζουσα ακτινοβολία στο υλικό του απορροφητή μάζας m σε πεπερασμένο όγκο V μέσω της σχέσης:

$$D = \frac{d\bar{\epsilon}}{dm}(1.52)$$

Η ενέργεια που εναποτίθεται είναι το άθροισμα όλων των ενεργειών που εισέρχονται στον όγκο V και παραμένουν εκεί, λαμβάνοντας υπόψη τα φαινόμενα μετατροπής μάζας-ενέργειας που συμβαίνουν στο εσωτερικό του.

Η μονάδα μέτρησης της απορροφούμενης δόσης είναι το J/kg όπου J/kg=Gy.

- Ανασχετική ισχύς (Stopping power)

Είναι ένα μέγεθος που σπανίως μετριέται, αλλά υπολογίζεται θεωρητικά, και χρησιμοποιείται ευρέως στην δοσιμετρία ακτινοβολιών.

Η γραμμική ανασχετική ισχύς ορίζεται ως η αναμενόμενη τιμή του ρυθμού απώλειας ενέργειας ανά μονάδα μήκους διαδρομής (dE/dx) ενός φορτισμένου σωματιδίου.

Η μαζική ανασχετική ισχύς προκύπτει με απλή διαίρεση της γραμμικής ανασχετικής ισχύς με την πυκνότητα του υλικού του απορροφητικού μέσου.

Τυπικές μονάδες μέτρησης της γραμμικής και μαζικής ανασχετικής ισχύς είναι το MeV/cm και MeV·cm² /g αντίστοιχα.

Υπάρχουν δύο τύποι ανασχετικής ισχύς, η ανασχετική ισχύς σκέδασης ή ιονισμού (collision/ionization) και η ανασχετική ισχύς ακτινοβολίας (radiative). Η πρώτη είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των φορτισμένων σωματιδίων με τροχιακά ατομικά ηλεκτρόνια, ενώ η δεύτερη είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των φορτισμένων σωματιδίων με πυρήνες.

- Γραμμικώς μεταφερόμενη ενέργειας (Linear Energy Transfer/LET)

Για τον υπολογισμό της ενέργειας που μεταφέρεται τοπικά στην περιοχή ενδιαφέροντος ήταν απαραίτητο να οριστεί ένα νέο μέγεθος μαζικής ανασχετικής ισχύς, η “περιορισμένη” μαζική ανασχετική ισχύς (restricted mass stopping power).

Ουσιαστικά θεωρούμε έναν κύλινδρο γύρω από την διαδρομή των σωματιδίων με ακτίνα τέτοια ώστε ο κύλινδρος να περιλαμβάνει τα ηλεκτρόνια δ με αρχική κινητική ενέργεια μικρότερη από μια μέγιστη τιμή Δ . Με τον τρόπο αυτό αποκλείονται τα ηλεκτρόνια δ με κινητική ενέργεια μεγαλύτερη από την ενέργεια Δ που έχει οριστεί και τους επιτρέπεται να ξεφύγουν από την περιοχή ενδιαφέροντος.

Η “περιορισμένη” ανασχετική ισχύς είναι μικρότερη από την κλασική ανασχετική ισχύ. Η επιλογή του ενεργειακού κατωφλιού Δ εξαρτάται από το εκάστοτε πρόβλημα που έχουμε να αντιμετωπίσουμε. Παραδείγματος χάρη, για προβλήματα που ασχολούνται με θαλάμους ιονισμού η τιμή του κατωφλιού είναι 10 keV

(η εμβέλεια ηλεκτρονίου ενέργειας 10 keV στον αέρα είναι 2 mm) και για προβλήματα μικροδοσιμετρίας η τιμή του κατωφλίου είναι γύρω στα 100 eV.

Η “περιορισμένη” ανασχετική ισχύς σκέδασης αναφέρεται αλλιώς και ως γραμμικώς μεταφερόμενη ενέργεια L_{Δ} του υλικού για φορτισμένα σωματίδια.

Ορίζεται ως ο λόγος dE_{Δ} προς dl , όπου dE_{Δ} είναι η ενέργεια που χάνεται από φορτισμένα σωματίδια σε μαλακές και σκληρές σκεδάσεις σε εγκάρσια απόσταση dl μείον την συνολική κινητική ενέργεια των φορτισμένων σωματιδίων που απελευθερώνεται, με ενέργειες μεγαλύτερες της Δ :

$$L_{\Delta} = \frac{dE_{\Delta}}{dl} \quad (1.62)$$

Η “περιορισμένη” μαζική ανασχετική ισχύς σκέδασης προκύπτει από την διαίρεση της γραμμικής ανασχετικής ισχύς σκέδασης με την πυκνότητα του υλικού. Η ποσότητα LET, η οποία έχει τεράστια σημασία για τον τομέα της ραδιοβιολογίας, είναι η ποσότητα L_{Δ} για $\Delta \rightarrow \infty$.

- Σχετική βιολογική δραστηριότητα (Relative Biological effectiveness/RBE)

Με την αύξηση του LET αυξάνεται και η πιθανότητα της ακτινοβολίας να προκαλέσει βιολογικές βλάβες. Το μέγεθος της σχετικής βιολογικής δραστηριότητας RBE συγκρίνει την δόση της υπό εξέταση ακτινοβολίας που χρειάζεται για να προκληθεί ένα βιολογικό αποτέλεσμα με την δόση μιας ακτινοβολίας αναφοράς που απαιτείται για να προκληθεί το ίδιο βιολογικό αποτέλεσμα.

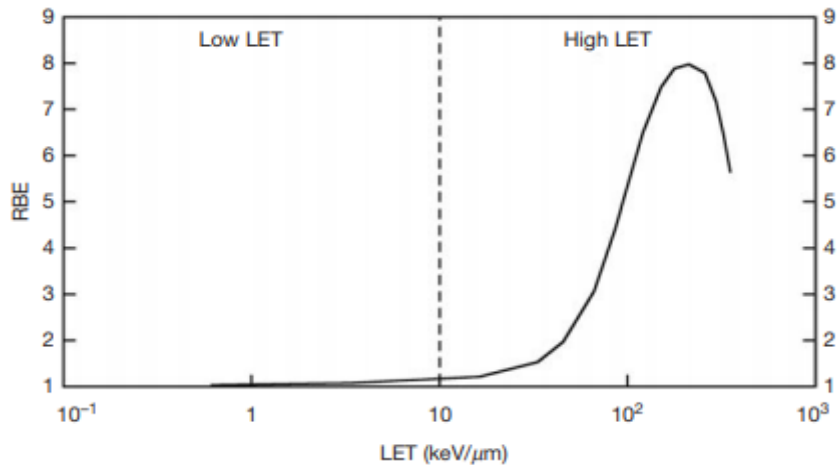
Για ιστορικούς λόγους ως ακτινοβολία αναφοράς ορίζονταν ακτίνες X 250 kVp, ενώ πλέον χρησιμοποιούνται οι ακτίνες γ του ^{60}Co . Η σχετική βιολογική δραστηριότητα ορίζεται ως εξής:

$$RBE = \frac{\text{Δόση της ακτινοβολίας αναφοράς για την πρόκληση ενός βιολογικού αποτελέσματος}}{\text{Δόση της υπό εξέταση ακτινοβολίας για την πρόκληση του ίδιου βιολογικού αποτελέσματος}}$$

(1.63)

Η τιμή του RBE εξαρτάται από το είδος της ακτινοβολίας, το είδος του ιστού ή οργάνου, το βιολογικό αποτέλεσμα που ερευνάται, την δόση, τον ρυθμό δόσης και την κλασματοποίηση της.

Το RBE αυξάνεται με την αύξηση του LET μέχρι την μέγιστη τιμή 3-8 για τιμή LET ίση με 200 keV και στην συνέχεια μειώνεται λόγω της μεγάλης θανάτωσης των κυττάρων που προκαλούν οι υψηλές ενέργειες όπως φαίνεται στο σχήμα 1.6.



Σχήμα 1.6.: Γραφική αναπαράσταση της σχέσης μεταξύ LET και RBE. Η κάθετη διακεκομμένη γραμμή διακρίνει την περιοχή χαμηλού LET όπου $RBE \approx 1$ από την περιοχή υψηλού LET όπου το RBE αυξάνεται με το LET μέχρι τη μέγιστη τιμή $RBE=8$ για $LET \approx 200 \text{ keV}/\mu\text{m}$, ενώ στην συνέχεια μειώνεται με την αύξηση του LET.

(1) (3)

1.4. Διάκριση χαμηλών και υψηλών δόσεων/Τρόποι έκθεσης ανθρώπων σε χαμηλές δόσεις

Συγκεκριμένες βιομηχανικές και ιατρικές πρακτικές έχουν ως συνέπεια μερική έκθεση σε ακτινοβολία με προβλέψιμα δυσμενή αποτελέσματα συνοδευόμενα από μια αβεβαιότητα. Τέτοιες εκθέσεις είναι γνωστές ως κανονικές εκθέσεις (normal exposures). Επιπλέον, μπορούν να ερευνηθούν σενάρια τα οποία αφορούν πιθανές καταστάσεις έκθεσης, οι οποίες αναφέρονται ως απρόσμενες αλλά εφικτές εκθέσεις ή δυνητικές εκθέσεις (occupational exposures). Οι δυνητικές εκθέσεις μπορεί να γίνουν πραγματικές αν λάβει χώρα ένα απρόσμενο συμβάν, όπως για παράδειγμα κάποιο σφάλμα εξοπλισμού, σχεδιασμού ή λειτουργίας.

Όσον αφορά τις κανονικές εκθέσεις υπάρχει όριο στην δόση που πρέπει να μεταφέρεται. Στην περίπτωση των ιατρικών εκθέσεων η δόση που λαμβάνουν οι ασθενείς ορίζεται ώστε να είναι ελάχιστη δυνατή αλλά ταυτόχρονα να δίνει τα ζητούμενα διαγνωστικά και θεραπευτικά αποτελέσματα.

Ο έλεγχος των δυνητικών εκθέσεων πραγματοποιείται με την βελτιστοποίηση του σχεδιασμού των εγκαταστάσεων, του εξοπλισμού και των διαδικασιών λειτουργίας με στόχο τον περιορισμό της πιθανότητας εμφάνισης συμβάντων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μη προγραμματισμένες εκθέσεις και τον περιορισμό του μεγέθους της έκθεσης στην περίπτωση που θα συμβεί ένα απρόοπτο συμβάν

Οι εκθέσεις σε ακτινοβολία που ορίζονται από τα BSS (Basic Safety Standards) περιλαμβάνουν τις εξής εκθέσεις τόσο κανονικές όσο και δυνητικές:

- Έκθεση εργαζόμενων σε ακτινοβολία ενώ ασκούν το επάγγελμά τους (επαγγελματική έκθεση), με εξαίρεση τις εκθέσεις που εξαιρούνται από το BSS και τις εκθέσεις από πρακτικές ή πηγές εξαιρούνται από το BSS.

- Έκθεση ασθενών στο πλαίσιο διαγνωστικών ή θεραπευτικών πρακτικών (ιατρικές εκθέσεις). Περιλαμβάνει εκθέσεις ασθενών στο πλαίσιο της δικής τους ιατρικής ή οδοντιατρικής διάγνωσης ή θεραπείας και εκθέσεις ατόμων που παρέχουν εθελοντική βοήθεια σε ασθενείς μετά από μια διαγνωστική ή θεραπευτική πρακτική. Επίσης περιλαμβάνει εκθέσεις εθελοντών κατά την συμμετοχή τους σε ένα πρόγραμμα βιοϊατρικής έρευνας.
- Έκθεση μελών του ευρύτερου κοινωνικού συνόλου. Περιλαμβάνει εκθέσεις κοινού από πηγές ακτινοβολίας, εξαιρουμένης κάθε επαγγελματικής ή ιατρικής έκθεσης και της κανονικής τοπικής ακτινοβολίας φυσικού υποβάθρου, συμπεριλαμβανομένης της έκθεσης σε εγκεκριμένες πηγές και πρακτικές.

Είναι πολύ σημαντικό σε αυτό το σημείο να γίνει διάκριση των δόσεων βάσει του μεγέθους τους, καθώς το μέγεθος της δόσης σε συνδυασμό με το είδος της ακτινοβολίας από την οποία προήλθε καθορίζουν τον βαθμό στον οποίο θα επηρεαστεί ένα ζωτικός οργανισμός.

Ως υψηλές δόσεις ακτινοβολίας θεωρούμε τιμές μεγαλύτερες των 50 mSv, ενώ αντίστοιχα χαμηλές δόσεις θεωρούνται εκείνες με τιμή μικρότερη των 50 mSv.

Η περιοχή των υψηλών δόσεων έχει μελετηθεί εκτενώς, σε αντίθεση με την περιοχή των χαμηλών δόσεων. Για μεγάλες δόσεις έχουν αναπτυχθεί τα γνωστότερα μοντέλα βιοδοσιμετρίας, όπως το γραμμικό τετραγωνικό μοντέλο, που θα αναλύσουμε στο επόμενο κεφάλαιο. Τέτοιου είδους μοντέλα παρουσιάζουν μεγάλη αβεβαιότητα σε περιπτώσεις χαμηλών δόσεων και για τον λόγο αυτό πρέπει να χρησιμοποιηθεί μεγάλο δείγμα για να μπορέσουν να εφαρμοστούν σε προβλήματα χαμηλών δόσεων.

Σε περιπτώσεις χαμηλών εκθέσεων το υπόβαθρο είναι τεράστιο και η συσχέτιση ενός ευρήματος με την έκθεση είναι αρκετά δύσκολο να επιβεβαιωθεί.

Ωστόσο, η έρευνα στο πεδίο των χαμηλών δόσεων είναι επιτακτικής σημασίας καθώς, όπως αναφέραμε και παραπάνω, οι πηγές έκθεσης των ανθρώπων σε χαμηλές δόσεις ολοένα και πληθαίνουν. Ιδιαίτερα οι ιατρικές εκθέσεις στα πλαίσια τη διάγνωσης, τόσο για τους ασθενείς όσο και για τους εργαζόμενους, είναι υψίστης σημασίας να μελετηθούν εκτενέστερα.

Οδηγός των ερευνών που σχετίζονται με χαμηλές εκθέσεις είναι επιδημιολογικές έρευνες ανθρώπων που έχουν εκτεθεί σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας μετά από κάποιο πυρηνικό ατύχημα.

(4) (5)

Κεφάλαιο 2: Βασικές γνώσεις βιολογίας

Για την ορθότερη περιγραφή των επιδράσεων της ακτινοβολίας στους βιολογικούς οργανισμούς είναι σκόπιμο να γίνει, αρχικά, μια σύντομη περιγραφή κάποιων βασικών αρχών της κυτταρικής βιολογίας.

2.1. Πυρήνας του κυττάρου και δομή DNA

Ο πυρήνας είναι το πιο εμφανές οργανίδιο των ευκαρυωτικών κυττάρων και στα ανθρώπινα κύτταρα έχει διάμετρο 5-8 μm. Περικλείεται από δύο ομόκεντρες μεμβράνες που συνιστούν το πυρηνικό περίβλημα και περιέχει τα μόρια DNA, τα οποία όπως θα δούμε και στην συνέχεια είναι εξαιρετικά επιμήκη πολυμερή που κωδικοποιούν την γενετική πληροφορία του οργανισμού.

Ένα μόριο DNA αποτελείται από δύο μακριές πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες (DNA chains) οι οποίες με την σειρά τους αποτελούνται από τέσσερα είδη νουκλεοτιδίων. Εναλλακτικά, οι αλυσίδες του DNA μπορεί να αναφερθούν και ως κλώνοι του DNA (DNA strands). Οι αλυσίδες του DNA αποτελούνται από νουκλεοτίδια τα οποία συνίστανται από μια πεντόζη, με την οποία συνδέονται μία ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες, και μια αζωτούχα βάση. Στην περίπτωση των νουκλεοτιδίων του DNA, η πεντόζη είναι δεσοξυριβόζη που συνδέεται με μια φωσφορική ομάδα, ενώ η βάση μπορεί να είναι αδενίνη (A), κυτοσίνη (C), γουανίνη (G) ή θυμίνη (T). Τα ίδια αυτά σύμβολα χρησιμοποιούνται για να υποδηλώσουν και τα τέσσερα διαφορετικά νουκλεοτίδια. Οι δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες στην διπλή έλικα του DNA συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων των νουκλεοτιδίων των διαφορετικών κλώνων και τα νουκλεοτίδια συνδέονται μεταξύ τους ομοιοπολικά σε μια αλυσίδα μέσω των σακχάρων και των φωσφορικών ομάδων τους.

Επειδή η συγκράτηση των αλυσίδων γίνεται με δεσμούς μεταξύ των βάσεων είναι λογικό όλες οι βάσεις να βρίσκονται στο εσωτερικό της έλικας, ενώ ο σάκχαρο-φωσφορικός “σκελετός”, όπως καλείται, στο εξωτερικό της, έτσι ο τρόπος με τον οποίο συνδέονται τα νουκλεοτίδια μεταξύ τους προσδίδει στο κάθε κλώνο του DNA μια χημική πολικότητα. Η πολικότητα μιας αλυσίδας DNA υποδεικνύεται ορίζοντας τον ένα άκρο ως 3' και το άλλο ως 5', ορισμός που βασίζεται στις λεπτομέρειες του χημικού δεσμού μεταξύ των νουκλεοτιδικών υπομονάδων.

Επιπλέον, οι βάσεις συνδέονται σε συγκεκριμένα ζευγάρια, η A ζευγαρώνει με την T και η G με την C και το ζευγάρι των βάσεων επιτρέπει στα ζεύγη των βάσεων (base pairs) να τοποθετούνται στο εσωτερικό της έλικας στην πιο ευνοϊκή από, ενεργειακή άποψη, διάταξη. Κάθε ζεύγος βάσεων έχει παρόμοιο εύρος ώστε να διατηρείται ο σάκχαρο-φωσφορικός “σκελετός” σε ίση απόσταση κατά μήκος του DNA. Οι δύο αυτοί “σκελετοί” περιελίσσονται ο ένας γύρω από τον άλλο σχηματίζοντας την διπλή έλικα.

Το DNA, λοιπόν, κωδικοποιεί την γενετική πληροφορία του οργανισμού μέσω της κωδικοποίησης πληροφοριών με τη σειρά, ή την αλληλουχία των, των νουκλεοτιδίων κατά μήκος ενός κλώνου. Το σύνολο των πληροφοριών στο DNA ενός οργανισμού αποτελεί το γονιδίωμα του (όρος που χρησιμοποιείται και για αναφορά στο ίδιο το DNA που περιέχει αυτές τις πληροφορίες).

2.1.1. Δομή χρωμοσωμάτων στα ευκαρυωτικά κύτταρα

Η ανάπτυξη πολυκύτταρων οργανισμών, όπως ο άνθρωπος, απαιτεί τεράστιο όγκο πληροφοριών, δηλαδή χρειάζεται πολύ μεγάλη ποσότητα DNA για την κωδικοποίηση των απαραίτητων οδηγιών.

Όπως αναφέραμε και παραπάνω, ο πυρήνας ανθρώπινων κυττάρων έχει διάμετρο 5-8 μm όμως μπορεί και περιέχει περίπου δύο μέτρα DNA.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα μόρια του DNA συσκευάζονται σε μια ομάδα διαφορετικών χρωμοσωμάτων. Το “πακετάρισμα” του γενετικού υλικού σε αυτές τις δομές καθιστά ικανή την αποθήκευση του στο εσωτερικό τον πυρήνων και εξυπηρετεί την εύκολη κατανομή του στα δύο θυγατρικά κύτταρα κατά την κυτταρική διαίρεση.

Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου $3,2 \cdot 10^9$ νουκλεοτίδια που κατανέμονται σε 24 χρωμοσώματα. Το κάθε ένα από τα χρωμοσώματα αποτελείται από ένα μακρύ γραμμικό μόριο DNA που αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες οι οποίες διπλώνουν με αποτέλεσμα την δημιουργία μιας πιο συμπαγής δομής. Οι πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις ιστόνες και τις υπόλοιπες μη χρωμοσωματικές πρωτεΐνες (μη ιστόνες). Το σύμπλοκο του DNA και των πρωτεϊνών καλείται χρωματίνη. Βασική μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεοσωμάτιο.

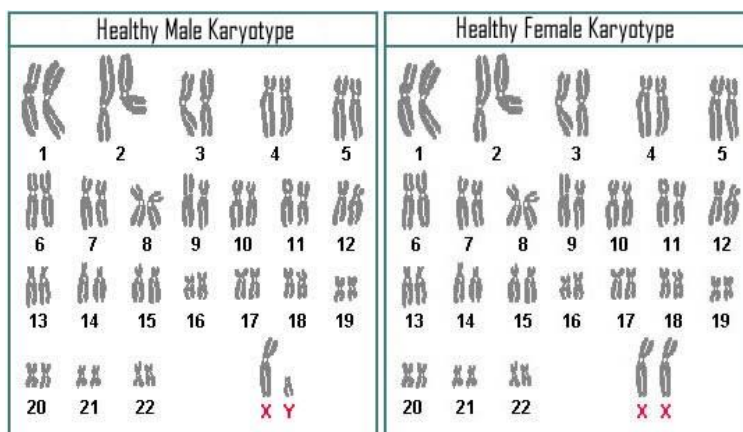
Ο πυρήνας ενός νουκλεοσωμάτιου αποτελείται από ένα σύμπλοκο οκτώ πρωτεϊνικών μορίων των ιστόνων (ανά δύο μόρια ιστόνων H2A, H2B, H3 και H4) και ενός τμήματος δίκλωνου DNA, μήκους περίπου 146 ζευγών νουκλεοτιδίων. Το οκταμερές των ιστόνων σχηματίζει έναν πρωτεϊνικό πυρήνα γύρω από τον οποίο περιελίσσεται η δίκλωνη έλικα του DNA.

Εκτός από τα γενετικά κύτταρα και κάποια εξειδικευμένα κύτταρα χωρίς DNA (π.χ. ερυθροκύτταρα) όλα τα υπόλοιπα ανθρώπινα κύτταρα περιέχουν δύο αντίγραφα του κάθε χρωμοσώματος, όπου το ένα προέρχεται από την μητέρα και το άλλο από τον πατέρα.

Τα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα διαθέτουν 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων από τα οποία τα 22 είναι αυτοσωμικά και το ένα είναι φυλετικό, ενώ τα γενετικά κύτταρα διαθέτουν 23 χρωμοσώματα από τα οποία τα 22 είναι αυτοσωμικά και τα ένα φυλετικό.

Στα σωματικά κύτταρα τα χρωμοσώματα του κάθε ζεύγους ονομάζονται ομόλογα, εκτός από την περίπτωση του ζεύγους των φυλετικών χρωμοσωμάτων στους άρρενες, οι οποίοι κληρονομούν ένα χρωμόσωμα Y από τον πατέρα και ένα χρωμόσωμα X από τη μητέρα τους.

Η παρουσία των 46 χρωμοσωμάτων αποτελεί τον καρυότυπο του ανθρώπου. Δύο εικόνες τυπικών καρυότυπων ενός άνδρα και μιας γυναίκας φαίνονται στο σχήμα 2.1.



Σχήμα 2.1. Καρυότυποι υγιούς άνδρα (αριστερά) και γυναίκας (δεξιά).

Η σημαντικότερη λειτουργία των χρωμοσωμάτων είναι η μεταφορά γονιδίων. Ως γονίδιο ορίζεται ένα τμήμα του DNA που περιέχει τις πληροφορίες για την παρασκευή μιας ορισμένης πρωτεΐνης ή μιας ομάδας συγγενών πρωτεϊνών και σε ορισμένες περιπτώσεις τα γονίδια έχουν ως τελικό προϊόν ένα μόριο RNA. Οι πρωτεΐνες και τα μόρια RNA που εν τέλη παρασκευάζονται επιτελούν ποικίλες δομικές και καταλυτικές λειτουργίες στα κύτταρα. Συνεπώς, μπορούμε να συνειδητοποιήσουμε την το μέγεθος των δυσμενών αποτελεσμάτων που μπορεί να προκληθούν αν κάποιο παράγοντας, όπως η ακτινοβολία, διαταράξει την δομή και την λειτουργία τους.

2.1.2. Κυτταρικός κύκλος

Η βασικότερη λειτουργία ενός κυττάρου είναι να διπλασιάζει με σωστό τρόπο το DNA των χρωμοσωμάτων και στην συνέχεια να μοιράζει ισότιμα τα αντίγραφα σε γενετικώς ταυτόσημα θυγατρικά κύτταρα. Η διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ποικίλλει ανάλογα με το είδος του κυττάρου. Ο κυτταρικός κύκλος διαθέτει ένα σύστημα ελέγχου για την διασφάλιση της σωστής πορείας και διαδοχής των συμβάντων.

Πιο αναλυτικά, ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτικών κυττάρων διαιρείται σε τέσσερις φάσεις ή στάδια. Το πρώτο στάδιο στο οποίο θα αναφερθούμε είναι αυτό της φάσης M. Κατά την διάρκεια αυτού του σταδίου πραγματοποιείται διαίρεση του πυρήνα με μια διαδικασία που ονομάζεται μίτωση (mitosis) αλλά και διαίρεση ολόκληρου του κυττάρου, διεργασία γνωστή ως κυτταροκίνηση (cytokinesis). Η φάση M αποτελεί ένα πολύ μικρό κλάσμα του συνολικού κυτταρικού κύκλου καθώς σε ένα συνηθισμένο κύτταρο θηλαστικού διαρκεί περίπου μισή ώρα.

Η περίοδος μεταξύ δύο φάσεων M ονομάζεται μεσόφαση (interphase) και στην διάρκεια αυτής το κύτταρο αυξάνει μέγεθος. Η μεσόφαση χωρίζεται σε τρεις επιμέρους φάσεις, την φάση S (Synthesis), την φάση G₁ και την φάση G₂.

Στη φάση S, οποία διαρκεί 6-8 ώρες, γίνεται αντιγραφή του DNA του πυρήνα, προκειμένου να γίνει διπλασιασμός του. Η φάση G₁, διάρκειας 8-10 ωρών, αποτελεί το μεσοδιάστημα ανάμεσα στο τέλος της φάσης M και την αρχή της φάσης S κατά την διάρκεια του οποίου μεγαλώνει ο πυρήνας και το κύτταρο συνθέτει RNA και πρωτεΐνες. Παράλληλα, το κύτταρο τελεί τις απαραίτητες λειτουργίες αναλόγως τον τύπο του. Η φάση G₂ είναι το μεσοδιάστημα ανάμεσα στο τέλος της φάσης S και την αρχή της M κατά το οποίο το κύτταρο προετοιμάζεται για τη διαδικασία της μίτωσης και διαρκεί 4-6 ώρες. Σε αυτή την φάση οργανίδια του κυττάρου, όπως τα μιτοχόνδρια και τα κεντροσώματα διαιρούνται.

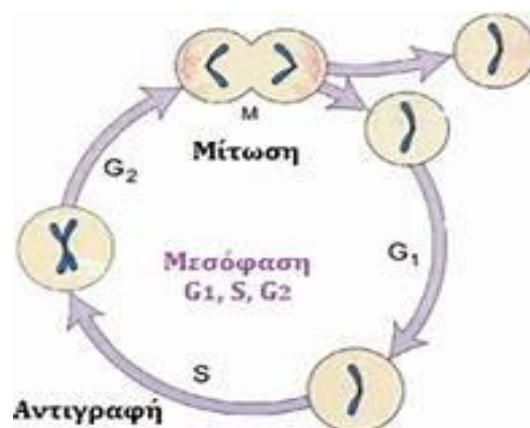
Υπάρχουν συγκεκριμένα χρονικά σημεία ελέγχου στις φάσεις G_1 και G_2 κατά τα οποία το κύτταρο αποφασίζει αν θα σταματήσει τον κύκλο ώστε να προετοιμαστεί περαιτέρω ή αν θα συνεχίσει κανονικά την πορεία του.

Ο κυτταρικός κύκλος από την σκοπιά των χρωμοσωμάτων μπορεί να περιγραφεί συνοπτικά ως εξής:

Τα χρωμοσώματα στην μεσόφαση ονομάζονται μεσοφασικά και βρίσκονται στον πυρήνα ως εκτεταμένες, λεπτές και μπερδεμένες ίνες DNA. Σε αυτή την μορφή είναι δύσκολο να διακριθούν, πόσο μάλλον να διαχωριστούν και να μοιραστούν στα δυο θυγατρικά κύτταρα. Στο στάδιο της σύνθεσης εξειδικευμένες αλληλουχίες DNA που υπάρχουν σε όλους του ευκαρυώτες εξασφαλίζουν την αντιγραφή των μεσοφασικών χρωμοσωμάτων. Καθώς προχωράει ο κυτταρικός κύκλος το DNA συσπειρώνεται και αποκτά μια συμπαγή δομή μέσω μιας σειράς διαδικασιών έως ότου σχηματιστούν τα πολύ συμπυκνωμένα μιτωτικά χρωμοσώματα. Αυτά αποτελούνται από δύο αδελφές χρωματίδες οι οποίες συνδέονται με μια ποσότητα DNA που λειτουργεί ως δεσμός, το κεντρομερίδιο.

Η φάση M διακρίνεται σε τέσσερις φάσεις κατά τις οποίες ολοκληρώνεται η κυτταρική διαίρεση. Η πρώτη φάση ονομάζεται πρόφαση, κατά την διάρκεια της σχηματίζεται η άτρακτος με την βοήθεια των κεντροσωμάτων και τα χρωμοσώματα εμφανίζουν τον μεγαλύτερο βαθμό συμπύκνωσης. Η δεύτερη φάση ονομάζεται μετάφαση και σε αυτήν ο πυρήνας έχει αποσυντεθεί και τα χρωμοσώματα ευθυγραμμίζονται στο κέντρο του κυττάρου. Η τρίτη φάση είναι αυτή της ανάφασης κατά την οποία οι αδελφές χρωματίδες διαχωρίζονται και τα χρωμοσώματα κινούνται προς τους πόλους του κυττάρου με την βοήθεια των μιτωτικών ατράκτων. Η τελευταία φάση καλείται τελόφαση και σε αυτήν η άτρακτος αποδιοργανώνεται και τα χρωμοσώματα που είναι συγκεντρωμένα στις δύο αντίθετες πλευρές περικλείονται από δυο νέους πυρήνες που σχηματίζονται. Τέλος, η κυτταρική διαίρεση διαχωρίζει το κυτταρόπλασμα και ολοκληρώνει τον διαχωρισμό των δύο κυττάρων.

Οι φάσεις G_1 και G_2 προσφέρουν όλο τον χρόνο που χρειάζεται το κύτταρο για την αύξηση του και τον διπλασιασμό των κυτταροπλασματικών οργανιδίων του.



Σχήμα 2.2.: Γραφική απεικόνιση του κυτταρικού κύκλου.

2.1.3. Σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

Κατά τον κυτταρικό κύκλο ένα κεντρικό σύστημα ελέγχου πυροδοτεί κάθε διεργασία με καθορισμένη σειρά και ρυθμίζεται σε ορισμένα κρίσιμα σημεία του κύκλου με ανατροφοδότηση από τις διεργασίες που διεκπεραιώνονται.

Είναι κρίσιμης σημασίας όλα τα γεγονότα του κυτταρικού κύκλου να συμβαίνουν με μια ορισμένη σειρά ακόμα και αν κάποιο από τα επιμέρους στάδια του διαρκεί περισσότερο από όσο θα έπρεπε.

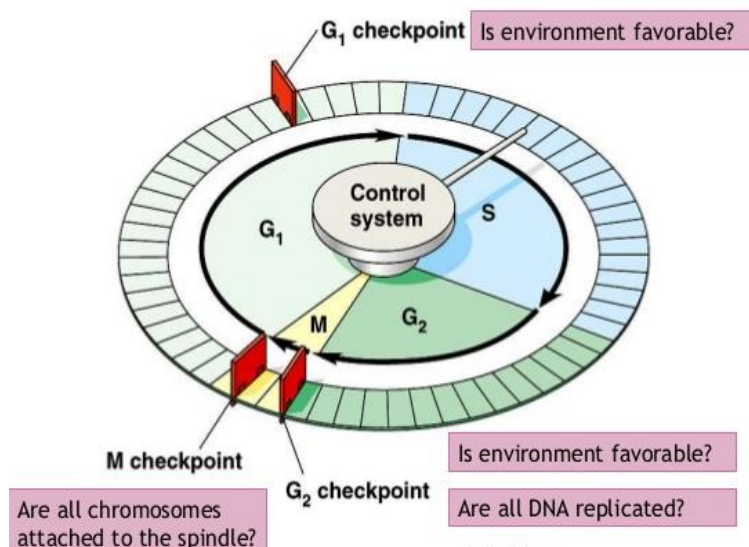
Το DNA του πυρήνα πρέπει να έχει αντιγραφεί πριν την έναρξη των διαδικασιών διαίρεσης του, δηλαδή πριν από την φάση M πρέπει να έχει προηγηθεί η φάση S. Έτσι στην περίπτωση που η σύνθεση του DNA δεν ολοκληρωθεί στον αναμενόμενο χρόνο εξαιτίας βλαβών που απαιτούν επιδιόρθωση, η μίτωση και η κυτταρική διαίρεση πρέπει να καθυστερήσουν και αυτές.

Η διατήρηση της σωστής αλληλουχίας των γεγονότων επιτυγχάνεται με την ύπαρξη σημείων ελέγχου (checkpoints) τα οποία δεν επιτρέπουν στο κύτταρο να προχωρήσει στο επόμενο στάδιο στην περίπτωση που δεν έχει προετοιμαστεί.

Στην φάση M υπάρχει ένα σημείο ελέγχου το οποίο ελέγχει αν έχει ολοκληρωθεί επιτυχώς η διαδικασία της μίτωσης, δηλαδή αν τα χρωμοσώματα έχουν προσδεθεί επιτυχώς στην άτρακτο, προκειμένου να ολοκληρωθεί η κυτταρική διαίρεση.

Δύο σημαντικά σημεία ελέγχου, επίσης, βρίσκονται στις φάσεις G_1 και G_2 . Στην φάση G_1 το σημείο ελέγχου επιτρέπει στο κύτταρο να εξακριβώσει αν το περιβάλλον είναι ευνοϊκό για τον πολλαπλασιασμό, δηλαδή αν η αύξηση του κυττάρου από τον εφοδιασμό σε θρεπτικές ουσίες και από άλλους παράγοντες στο εξωκυττάριο περιβάλλον είναι επαρκής προτού δεσμευτεί στην φάση S. Στην περίπτωση που οι εξωκυττάρια συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές τα κύτταρα σταματούν στην φάση G_1 και σε ορισμένες περιπτώσεις περνούν σε μια κατάσταση ηρεμίας που ονομάζεται G_0 .

Το σύστημα ελέγχου της φάσης G_2 έχει την δυνατότητα να σταματήσει τον κύκλο πριν την μίτωση ώστε το κύτταρο να ελέγξει αν έχει ολοκληρωθεί η σωστά αντιγραφή του DNA προτού προχωρήσει σε αυτή.



Σχήμα 2.3.: Κυτταρικό κύκλος με επισημασμένα τα τρία σημεία ελέγχου M, G_1 και G_2 checkpoints.

2.1.4. Ανθρώπινα λεμφοκύτταρα

Τα λεμφοκύτταρα είναι ένα από τα σημαντικότερα βιοδοσίμετρα και χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα της παρούσας εργασίας, επομένως είναι σκόπιμο να κάνουμε μια μικρή αναφορά σε αυτά στο θεωρητικό τμήμα της.

Τα λεμφοκύτταρα παράγονται από αρχέγονα κύτταρα (stem cells) του μυελού των οστών που δεσμεύονται νωρίς για διαφοροποίηση προς την λεμφική σειρά και εξειδικεύονται για τις διάφορες λειτουργίες τους στο μυελό, το θύμο αδένα, τους λεμφαδένες, το σπλήνα και άλλους λεμφικούς ιστούς. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού έναντι των λοιμώξεων και κάθε άλλου κινδύνου και διαχωρίζονται σε κατηγορίες βάσει ειδικών ανοσολογικών δεικτών και υποδοχών αντιγόνων, οι οποίοι εκφράζονται στη μεμβράνη τους. Οι βασικότερες ομάδες λεμφοκυττάρων είναι τα Β και Τ λεμφοκύτταρα.

Τα περιφερειακά μικρά λεμφοκύτταρα μπορούν εύκολα να διακριθούν στο μικροσκόπιο καθώς διαθέτουν μεγάλους και πυκνούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από σχετικά λίγο κυτταρόπλασμα. Έχουν διάμετρο 6 μm και όγκο περίπου 110 μm³.

Η συγκέντρωση των λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα καθορίζεται από ένα πλήθος παραμέτρων όπως είναι η ηλικία (με την πάροδο των χρόνων παρατηρείται μείωση του αριθμού των λεμφοκυττάρων σε έναν άνθρωπο), η εθνικότητα (σε ορισμένες φυλές παρατηρούνται αυξημένες ή μειωμένες τιμές βάσης), η παρουσία παθογόνων και περιβαλλοντικών παραγόντων (έκθεση οργανισμού σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας της τάξεως των Gy οδηγεί σε ραγδαία μείωση των λεμφοκυττάρων). Τα ανθρώπινα περιφερειακά λεμφοκύτταρα αποτελούν έναν πληθυσμό κυττάρων που βρίσκεται συγχρονισμένο σε ένα στάδιο προσύνθεσης του DNA κατά τον κυτταρικό κύκλο (φάση G₀), ιδιότητα που εξυπηρετεί πολύ για την χρήση τους ως βιοδοσίμετρα.

Για την ανίχνευση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι καθοριστικής σημασίας τα περιφερικά λεμφοκύτταρα να ανήκουν στην “δεξαμενή ανακατανομής”. Τα λεμφοκύτταρα, δηλαδή, θα πρέπει να μπορούν να εγκαταλείψουν το περιφερικό αίμα, να περάσουν από τη σπλήνα, τους λεμφικούς αδένες και άλλους ιστούς και να εισέλθουν ξανά στην κυκλοφορία, πράγμα που σημαίνει ότι λεμφοκύτταρα με χρωμοσωμικές ανωμαλίες οι οποίες έχουν προκληθεί οπουδήποτε στο σώμα θα είναι τελικά παρούσες στο περιφερικό αίμα.

Ο μέση διάρκεια παραμονής ενός λεμφοκυττάρου δεξαμενής στο περιφερικό αίμα είναι 30 min ενώ εκτιμάται ότι περίπου το 80%, δηλ. 4 10¹¹ λεμφοκύτταρα ανήκουν στη δεξαμενή ανακατανομής και ο συνολικός χρόνος επανακυκλοφορίας είναι 12 ώρες.

Συνοψίζοντας, τα λεμφοκύτταρα θεωρούνται το βέλτιστο βιολογικό δοσίμετρο καθώς διαθέτουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- κατανέμονται σε ολόκληρο το σώμα,
- είναι αρκετά ακτινοευαίσθητα και η απόκρισή τους είναι ανάλογη της δόσης,
- αποτελούν συγχρονισμένο κυτταρικό πληθυσμό στην G₀ φάση,
- σε κάποιο ποσοστό είναι μακρόβια, και έχουν ‘μνήμη’,
- η λήψη του δείγματος είναι εύκολη και ανώδυνη.

(6)

Κεφάλαιο 3: Βιολογικές αλληλεπιδράσεις των ιοντίζουσων ακτινοβολιών

3.1. Στάδια αλληλεπίδρασης ακτινοβολίας με βιολογικούς οργανισμούς

Οι βιολογικές αλληλεπιδράσεις της ακτινοβολίας προκύπτουν κυρίως από βλάβες στο δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA), που είναι ο κρίσιμος στόχος. Η απορρόφηση οποιασδήποτε μορφής ακτινοβολίας (ακτινοβολία Χ, γ, φορτισμένα σωματίδια) από ένα βιολογικό υλικό συνοδεύεται με μια πιθανότητα αλληλεπίδρασης της με κρίσιμους στόχους των κυττάρων (μόριο DNA).

3.1.1. Έμμεση δράση ακτινοβολίας

Η ακτινοβολία μπορεί να επιδράσει έμμεσα στην λειτουργία των βιολογικών υλικών όχι αλληλεπιδρώντας απευθείας με τον στόχο (μόριο DNA) αλλά αλληλεπιδρώντας με άτομα ή μόρια των κυττάρων (κυρίως του νερού). Το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η δημιουργία ελεύθερων ριζών οι οποίες διαχέονται και καταστρέφουν τους κρίσιμους στόχους.

Η έμμεση αλληλεπίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με βιολογικούς οργανισμούς μπορεί να χωριστεί σε τρία βασικά στάδια, το φυσικό, το χημικό και το βιολογικό. Παρακάτω θα περιγράψουμε τις βασικές διαδικασίες και την πορεία της ακτινοβολίας σε κάθε στάδιο ξεχωριστά, από την είσοδο της στο βιολογικό υλικό μέχρι την πρόκληση της βιολογικής βλάβης.

- Φυσικό στάδιο

Το φυσικό στάδιο περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση ακτινοβολίας και ύλης με αποτέλεσμα την εναπόθεση ενέργειας μέσω ιοντισμών και διεγέρσεων. Συνολικά η διάρκεια αυτού του σταδίου είναι 10^{-16} s.

Η ακτινοβολία μπορεί να διακριθεί σε άμεσα και έμμεσα ιοντίζουσα ακτινοβολία. Τα φορτισμένα σωματίδια προκαλούν άμεσο ιοντισμό, δηλαδή, έχουν αρκετή κινητική ενέργεια ώστε να μπορούν να διαταράξουν την ατομική δομή του υλικού του απορροφητή προκαλώντας χημικές και βιολογικές μεταβολές.

Οι ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες (ακτίνες Χ και γ) προκαλούν έμμεσο ιοντισμό, δηλαδή, δεν προκαλούν οι ίδιες χημικές και βιολογικές βλάβες. Οι χημικές και βιολογικές συνέπειες είναι μεταγενέστερη συνέπεια της αλληλεπίδρασης των φωτονίων με ηλεκτρόνια του υλικού.

Τα φωτόνια θα αλληλεπιδράσουν με έναν από τους γνωστούς τρόπους που αναφέραμε στο πρώτο κεφάλαιο και η ενέργεια που θα μεταφέρουν συνολικά στο υλικό πραγματοποιείται σε χρόνο μικρότερο των 10^{-18} s, ενώ η κατανομή της στον χώρο εξαρτάται από το είδος και την ενέργεια της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Πιο συγκεκριμένα, καθορίζεται από την τιμή της γραμμικώς μεταφερόμενης ενέργειας LET. Αν η τιμή της LET είναι χαμηλή τότε η ακτινοβολία προκαλεί μικρό αριθμό ιοντισμών ή διεγέρσεων αν μη διαδρομής ενώ για ακτινοβολίες με υψηλή LET λαμβάνουν χώρα πυκνοί ιοντισμοί ανά μη διαδρομής. Η πυκνότητα των ιοντισμών αυτών καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την βιολογική βλάβη που θα προκληθεί. Τυπικές τιμές του LET για σημαντικές ακτινοβολίες περιλαμβάνονται στον πίνακα 3.1.

Ακτινοβολία	LET(keV/μm)
250 kVp ακτίνες X	<1
Ακτίνες γ	<1
Πρωτόνια	1-50
Νετρόνια	1-50
Σωματία α	100-200
Βαρέα ιόντα	500-1000+

Πίνακας 3.1.: Τιμές LET για διαφορετικά είδη ακτινοβολιών.

- Χημικό στάδιο

Το επόμενο στάδιο αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας ονομάζεται χημικό και περιλαμβάνει όλες τις ταχείες χημικές αντιδράσεις των συστατικών των κυττάρων που έχουν ακτινοβοληθεί. Πιο συγκεκριμένα, η απορρόφηση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας από το βιολογικό υλικό έχει ήδη προκαλέσει ιοντισμούς και διεγέρσεις με αποτέλεσμα την δημιουργία σχηματισμών που ονομάζονται ελεύθερες ρίζες. Συνοπτικά αναφέρουμε ότι ελεύθερες ρίζες είναι τα ηλεκτρικά ουδέτερα άτομα ή μόρια στα οποία ένα ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στιβάδας δεν σχηματίζει ζεύγος (ασύζευκτο ηλεκτρόνιο), κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή χημική δραστηριότητα. Επομένως, η ύπαρξη του ασύζευκτου ηλεκτρονίου καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ιδιαίτερα χημικώς δραστικές.

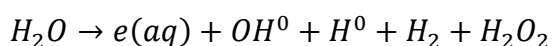
Στα βιολογικά υλικά το μόριο που βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα είναι το μόριο του ύδατος, επομένως είναι και αυτό που δέχεται σε μεγαλύτερο βαθμό την επίδραση της ακτινοβολίας. Η αλληλεπίδραση των φωτονίων ακτίνων X ή γ, ηλεκτρονίων και πρωτονίων με τα μόρια του νερού έχουν ως αποτέλεσμα τον ιονισμό τους. Η πρώτη αυτή αντίδραση που λαμβάνει χώρα μετά την ακτινοβολήση του βιολογικού υλικού γίνεται σε χρόνο 10^{-18} s και οι αρχικές αυτές ελεύθερες ρίζες έχουν χρόνο ζωής 10^{-10} s.

Στα επόμενα 10^{-12} s το ηλεκτρόνιο που προκύπτει ως προϊόν συνδέεται με μόρια του νερού με αποτέλεσμα να προκύπτει το ενυδατωμένο ηλεκτρόνιο $e(aq)$ ενώ ταυτόχρονα η ρίζα του νερού $H_2O^{\cdot 0}$ διασπάται δίνοντας ως προϊόν ρίζα υδροξυλίου $OH^{\cdot 0}$ και θετικά φορτισμένο υδρογόνο. Η ρίζα του υδροξυλίου έχει χρόνο ζωής 10^{-9} s στα κύτταρα.

Παράλληλα το ενυδατωμένο ηλεκτρόνιο μπορεί να αλληλεπιδράσει με θετικά φορτισμένο υδρογόνο δίνοντας ρίζα ελεύθερου υδρογόνου.

Τέλος, είναι δυνατό δύο ελεύθερες ρίζες του υδροξυλίου να αντιδράσουν δίνοντας υπεροξειδίο του υδρογόνου H_2O_2 .

Συνοπτικά, η παραπάνω διαδικασία της ραδιόλυσης του ύδατος περιγράφεται από την αντίδραση:



Η ελεύθερη ρίζα του υδροξυλίου OH^\bullet (έχει εννέα ηλεκτρόνια αρά ένα ασύζευκτο) έχει περιορισμένη εμβέλεια, δεν ξεπερνά τα 100 Angstrom, καθώς είναι ιδιαίτερα ασταθής και δραστική. Έτσι, αλληλεπιδρά απευθείας με όποιο οργανικό μόριο βρεθεί στην τροχιά της, για παράδειγμα με το DNA το οποίο είναι και ο στόχος όσων αφορά τις βιολογικές βλάβες από ακτινοβολία. Αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι οργανικές ρίζες, που ως ασταθείς και με υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο, θα μετασηματιστούν γρήγορα προκαλώντας μεταβολή/βλάβη στη δομή του οργανικού μορίου του. Οι ρίζες του DNA που είναι αποτέλεσμα ιονισμού ή αντίδρασης με ρίζα του υδροξυλίου έχουν χρόνο ζωής 10^{-5}s (με παρουσία αέρα).

Θεωρείται ότι οι ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται εντός κυλίνδρου με διάμετρο διπλάσια της διαμέτρου του DNA μπορούν να προσεγγίσουν το DNA και να προκαλέσουν βλάβες. Υπολογίζεται, μάλιστα, ότι τα δύο τρίτα των βλαβών του DNA που προκαλούνται από ακτίνες X σε θηλαστικά κύτταρα οφείλονται στην δράση ριζών υδροξυλίου.

- Βιολογικό στάδιο

Το βιολογικό στάδιο διαδέχεται το χημικό με την εμφάνιση ενζυμικών μηχανισμών που δρουν επιδιορθωτικά στους μοριακούς σχηματισμούς που υπέστησαν βλάβη. Το κύριο μέρος της επιδιόρθωσης διαρκεί δεκαπέντε λεπτά με τρεις ώρες και ολοκληρώνεται σε εικοσιτέσσερις με σαρανταοκτώ ώρες. Αν η διόρθωση της βλάβης είναι επιτυχής το κύτταρο συνεχίζει τον κυτταρικό του κύκλο επιτελώντας τις εκάστοτε εργασίες. Στην περίπτωση όπου η βλάβη είναι αδύνατον να επιδιορθωθεί τα κύτταρα είτε επιβιώνουν με την παρουσία μεταλλάξεων είτε/και οδηγούνται στον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης.

Το χρονικό διάστημα μεταξύ της ρήξης των χημικών δεσμών και της εμφάνισης των βιολογικών βλαβών μπορεί να διαρκέσει ώρες, μέρες, μήνες, χρόνια ή και γενιές. Στην περίπτωση που το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης είναι ο θάνατος του κυττάρου η βιολογική βλάβη μπορεί να εκφραστεί μετά από κάποιες ώρες ή μέρες, όταν κύτταρο αποπειραθεί να διαιρεθεί. Αν το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης είναι ογκογένεση τότε η εμφάνιση αυτής μπορεί να έχει μια καθυστέρηση έως και 40 χρόνων ενώ αν η βλάβη είναι μια μετάλλαξη σε γενετικό κύτταρο μπορεί να εκφραστεί μετά από γενιές.

3.1.2. Άμεση δράση ακτινοβολίας

Η άμεση επίδραση της ακτινοβολίας είναι ο βασικός μηχανισμός στην περίπτωση που η ακτινοβολία έχει υψηλό LET (νετρόνια, φορτισμένα σωματίδια).

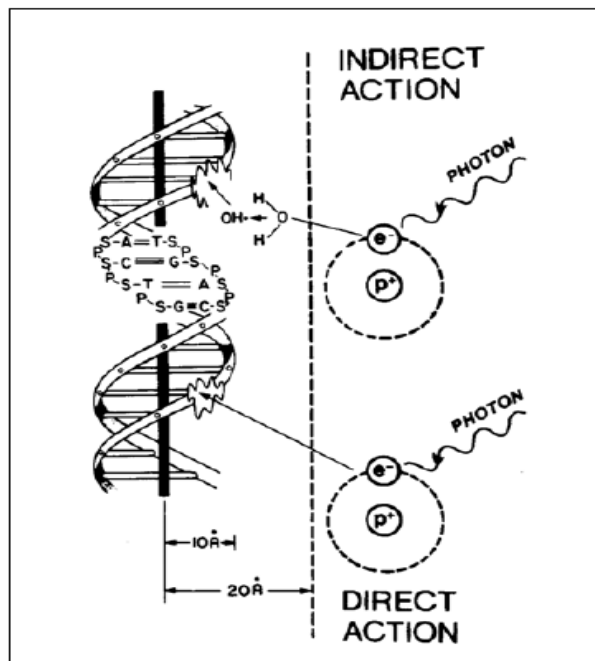
Σε αντίθεση με τα φωτόνια, τα νετρόνια αλληλεπιδρούν απευθείας με τον πυρήνα των ατόμων που απαρτίζουν τον ιστό. Το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η εκπομπή πρωτονίων ανάκρουσης ή στην περίπτωση υψηλοενεργειακών νετρονίων πολλαπλών προϊόντων (π.χ. στην περίπτωση πρόσκρουσης νετρονίων υψηλής ενέργειας με άτομα άνθρακα προκύπτουν τρία σωματίδια και στην περίπτωση πρόσκρουσης νετρονίων με άτομα οξυγόνου παράγονται τέσσερα σωματίδια).

Στην συνέχεια, τα πρωτόνια αλληλεπιδρούν με τροχιακά ηλεκτρόνια προκαλώντας ιονισμό των ατόμων με αποτέλεσμα την εκπομπή ταχέων ηλεκτρονίων ανάκρουσης αλλά και με πυρήνες ατόμων του ιστού με αποτέλεσμα την παραγωγή βαρέων δευτερογενών σωματιδίων.

Η πυρηνική αυτή αποσύνθεση είναι περισσότερο πιθανό να πραγματοποιηθεί όσο αυξάνεται η ενέργεια των πρωτονίων. Επομένως, όσο αυξάνεται η πυκνότητα των ιονισμών που προκαλούνται τόσο αυξάνεται και η πιθανότητα απευθείας αλληλεπίδρασης του σωματιδίου με τον στόχο (μόριο DNA).

Γενικά υπολογίζεται ότι το 85% των βιολογικών επιδράσεων οφείλεται στην έμμεση δράση της ακτινοβολίας ενώ το 15% στην άμεση, όταν χρησιμοποιούνται ακτίνες χαμηλής ενέργειας.

Στο σχήμα 3.4 απεικονίζεται η άμεση και η έμμεση δράση της ακτινοβολίας.



Σχήμα 3.4.: Άμεση και έμμεση δράση της ακτινοβολίας. Φαίνεται σχηματικά η δομή του DNA. Στην άμεση δράση, δευτερογενές ηλεκτρόνιο, αποτέλεσμα της απορρόφησης ενός φωτονίου, αλληλεπιδρά απευθείας με το μόριο του DNA. Στην έμμεση δράση το δευτερογενές ηλεκτρόνιο αλληλεπιδρά με ένα άτομο ή μόριο, για παράδειγμα μόριο νερού, και παράγεται ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου (OH[•]), η οποία με τη σειρά της προκαλεί βλάβη στο μόριο του DNA. Η έλικα του DNA έχει διάμετρο 10 Å (2 nm) και ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται εντός κυλίνδρου με διάμετρο διπλάσια της διαμέτρου του DNA μπορούν να το επηρεάσουν.

S:sugar, P:phosphorus, A:adenine, T:thymine, G:guanine, C:cytosine.

(7) (2) (8) (9)

3.2. Βλάβες DNA

Όπως αναφέραμε και στις προηγούμενες ενότητες ο βασικότερος στόχος της ακτινοβολίας είναι τα μόρια του DNA, η πλήξη των οποίων έχει ως αποτέλεσμα δυσμενή βιολογικά αποτελέσματα όπως

είναι ο κυτταρικός θάνατος, η καρκινογένεση και οι μεταλλάξεις. Επομένως η εκτίμηση των βιολογικών επιδράσεων της ακτινοβολίας μπορεί να γίνει μέσω της ανίχνευσης και ανάλυσης των βλαβών της αλυσίδας του DNA που προκαλούνται από φορτισμένα σωματίδια ή τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται. Οι πιο πιθανές βλάβες του DNA που επάγει η έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι οι εξής:

- Θραύση ενός κλώνου της αλυσίδας (Single Strand Break-SSB)
- Διπλή θραύση της αλυσίδας (Double Strand Break-DSB)
- Αλλοίωση ή/και απώλεια αζωτούχας βάσης ή/και ζακχάρους (οξειδώσεις, μεθυλιώσεις, αποπουρινώσεις, απαμινώσεις)
- Απώλεια μιας βάσης-Αβασικά σημεία (AP-sites)
- Σπάσιμο δεσμού υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων
- Εγκάρσιες συνδέσεις μεταξύ των ελίκων-Διαδεσμοί (Crosslinks)
- Δημιουργία αλκαλικώς ευαίσθητων σημείων ή/και θερμικώς ευαίσθητων σημείων

3.2.1. Θραύσεις αλυσίδας DNA

Η δόση ακτινοβολίας που επάγει κατά μέσω όρου ένα “θανατηφόρο” γεγονός σε κάθε κύτταρο και αφήνει το 37% του κυτταρικού πληθυσμού ζωντανό ονομάζεται D_0 και για κύτταρα θηλαστικών για ακτίνες X βρίσκεται στο εύρος των 1 με 2 Gy. Ο αριθμός των βλαβών του DNA που επάγονται μετά από έκθεση σε τέτοιου επιπέδου δόση είναι:

- Παραπάνω από 1000 Βλάβες βάσεων (Base damage),
- περίπου 1000 Μονόκλωνες θραύσεις (Single-strand breaks/SSBs) και
- 40 Δίκλωνες θραύσεις (Double-strand breaks/DSBs).

Στην περίπτωση ακτινοβόλησης των κυττάρων με μέτρια δόση φωτονίων κατά κύριο λόγο θα πραγματοποιηθούν μονόκλωνες θραύσεις οι οποίες μπορούν να αξιολογηθούν και να αποτελέσουν συνάρτηση ανάλογη της δόσης μόνο στην περίπτωση που το DNA μετουσιωθεί. Σε άθικτο DNA, οι μονόκλωνες θραύσεις (SSBs) έχουν μικρή βιολογική συνέπεια όσον αφορά τη θανάτωση των κυττάρων, διότι επιδιορθώνονται εύκολα χρησιμοποιώντας τον αντίθετο κλώνο ως “καλούπι”, ενώ στην περίπτωση που το αποτέλεσμα της επιδιόρθωσης δεν είναι το σωστό μπορεί να δημιουργηθεί κάποια μετάλλαξη.

Εάν έχει προκληθεί θραύση και στους δύο κλώνους του DNA σε σημεία που έχουν απόσταση μεταξύ τους, η επισκευή πραγματοποιείται και σε αυτή την περίπτωση εύκολα καθώς οι δύο θραύσεις αντιμετωπίζονται ως ξεχωριστά γεγονότα. Αντίθετα, αν η ακτινοβολία προσβάλει και τους δύο κλώνους ταυτόχρονα και μάλιστα στην ίδια θέση ή σε θέσεις που διαχωρίζονται από λίγα μόνο ζεύγη βάσεων τότε οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του κυττάρου δεν λειτουργούν με ακρίβεια και οδηγούνται σε λανθασμένη αντικατάσταση βάσεων. Τέτοιου είδους θραύσεις ακολουθούμενες από ατελή επιδιόρθωση αν συμβαίνουν σε γενετικά κύτταρα μπορεί να οδηγήσουν σε μεταλλαγές που μεταφέρονται στους απογόνους. Στην περίπτωση που γίνονται σε σωματικά κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν καρκινογένεση στο ίδιο το άτομο που εκτίθεται στην ακτινοβολία.

3.2.2. Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί

Η ακτινοβολία προκαλεί ένα πλήθος βλαβών στο DNA, οι περισσότερες από τις οποίες επιδιορθώνονται επιτυχώς μέσω των επιδιορθωτικών μηχανισμών του κυττάρου.

Τα κύτταρα των θηλαστικών έχουν αναπτύξει εξειδικευμένες διαδικασίες για την ανίχνευση, ανταπόκριση και εν τέλη επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Διαφορετικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης ενεργοποιούνται για τις βλάβες βάσεων και διαφορετικοί για την επιδιόρθωση των DSBs, όπως επίσης υπάρχουν και διαφορετικοί επιδιορθωτικοί μηχανισμοί σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Οι κυριότεροι μηχανισμοί επιδιόρθωσης είναι:

- Μηχανισμός επιδιόρθωσης εκτομής βάσης (Base Excision Repair/BER)
- Μηχανισμός επιδιόρθωσης εκτομής νουκλεοτιδίου (Nucleotide excision repair/NER)
- Μηχανισμός επιδιόρθωσης λανθασμένης τοποθέτησης νουκλεοτιδίου (Mismatch Repair /MMR)
- Μηχανισμός επιδιόρθωσης διαδεσμού (Crosslink repair)
- Μηχανισμοί επιδιόρθωσης DSBs (DNA Double-Strand Break Repair)

Στα πειράματα που έγιναν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής έγινε ανάλυση βλαβών DSBs, οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης των οποίων είναι οι εξής:

a) Μη ομόλογη ένωση άκρων (Non-homologous end-joining /NHEJ)

Είναι ο κύριος μηχανισμός επιδιόρθωσης δίκλωνων θραύσεων σε κύτταρα θηλαστικών όταν δεν υπάρχουν οι αδερφές χρωματίδες, δηλαδή κατά την φάση G_1 . Πρόκειται για την άμεση απόκριση ενός κυττάρου απέναντι σε ένα DSBs και περιλαμβάνει την ενεργοποίηση μιας ομάδας αισθητήρων που προωθούν την επιδιόρθωση του DNA και σταματούν ταυτόχρονα τον κυτταρικό κύκλο έως ότου η θραύση επιδιορθωθεί πλήρως. Η μη ομόλογη ένωση των άκρων είναι επιρρεπής σε σφάλματα λόγω της απώλειας κάποιων νουκλεοτιδίων καθώς η επιδιόρθωση δεν βασίζεται σε κάποιον κλώνο ως πρότυπο.

b) Ομόλογος ανασυνδιασμός (Homologous recombination /HHR)

Πρόκειται για τον κύριο μηχανισμό επιδιόρθωσης DSBs κατά την φάση G_2 , στα κύτταρα των θηλαστικών, όπου έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία της σύνθεσης και υπάρχουν οι αδερφές χρωματίδες.

Κατά συνέπεια, υπάρχει η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί η μια αδελφή χρωματίδα ως πρότυπο με αποτέλεσμα η επιδιόρθωση να γίνεται με μεγάλη ακρίβεια.

3.3.3. Χρωμοσωματικές αλλοιώσεις

Ο κυτταρικός θάνατος δεν συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με μονόκλωνες θραύσεις του DNA (SSBs), αλλά περισσότερο με δίκλωνες θραύσεις (DSBs). Παράγοντες (όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου) επάγουν σε μεγάλο βαθμό SSBs, αλλά ελάχιστα DSBs, ενώ τελικά θανατώνουν μικρό αριθμό κυττάρων. Τα κύτταρα που είναι ελαττωματικά στην επιδιόρθωση των DSBs παρουσιάζουν υπερευαισθησία στη θανάτωση από ιονίζουσα ακτινοβολία και χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό χρωμοσωμικών αλλοιώσεων. Επομένως, ως συμπέρασμα προκύπτει ότι οι DSBs είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνες για την εμφάνιση δυσμενών βιολογικών αποτελεσμάτων.

Οι επιδράσεις των ιοντίζουσων ακτινοβολιών είναι εμφανής κατά την πρώτη μετάφαση μετά την έκθεση όπου η δόμη των χρωμοσωμάτων μπορεί να διακριθεί.

Εάν τα κύτταρα ακτινοβοληθούν με ακτίνες Χ, τα DSBs προκαλούνται στα χρωμοσώματα. Τα χρωμοσώματα φαίνεται να έχουν σπασμένα άκρα λόγω των μη αντιστοιχισμένων βάσεων

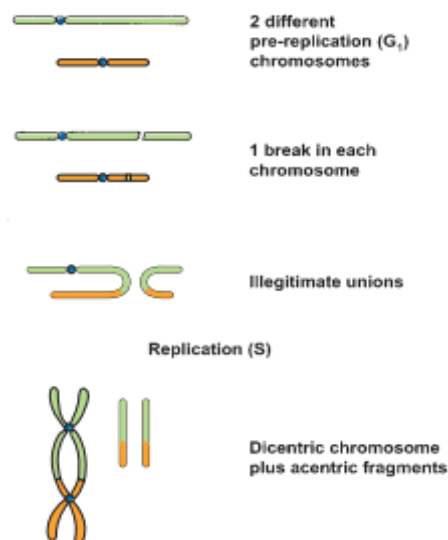
ενώ μπορεί να επανασυνδεθούν με οποιοδήποτε άλλο άκρο. Τα θραύσματα που δημιουργούνται μπορεί να συμπεριφερθούν με τους εξής τρόπους:

- Τα θραύσματα μπορεί να επανασυνδεθούν με τα αρχικά τους σώματα. Σε αυτή την περίπτωση όλα βαίνουν ομαλώς και οτιδήποτε περιεργο δεν είναι ορατό στην επόμενη μίτωση.
- Τα θραύσματα μπορεί να αποτύχουν να επανασυνδεθούν και σε αυτή την περίπτωση δημιουργείται μια αλλοίωση η οποία είναι εμφανής στην επόμενη μίτωση.
- Τα σπασμένα άκρα χρωμοσωμάτων μπορεί να συνδεθούν με άλλα σπασμένα άκρα με αποτέλεσμα την δημιουργία παραμορφωμένων χρωμοσωμάτων τα οποία είναι εμφανή στην επόμενη μίτωση.

Οι αλλοιώσεις που παρατηρούνται στη μετάφαση διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τις **χρωμοσωμικές αλλοιώσεις (chromosome aberrations)** και τις **αλλοιώσεις χρωματίδας (chromatid aberrations)**. Οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις είναι αποτέλεσμα ακτινοβολήσης του κυττάρου στην αρχή της μετάφασης όπου το χρωμοσωμικό υλικό δεν έχει αντιγραφεί.

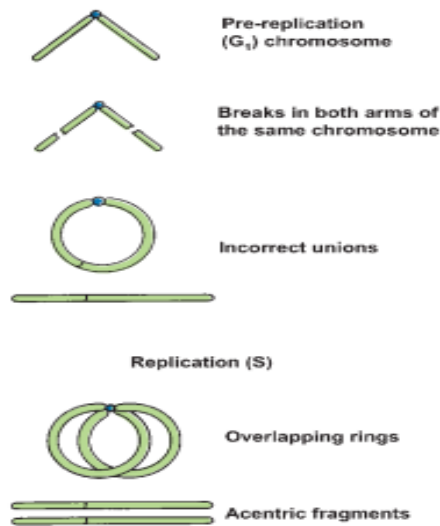
Οι τρεις τύποι αλλοιώσεων που συναντάμε στις αναλύσεις είναι τα **δικετρικά χρωμοσώματα** και οι **δακτύλιοι** που αποτελούν χρωμοσωμικές αλλοιώσεις και η **γέφυρα ανάφασης** που αποτελεί αλλοίωση χρωματίδας. Πρόκειται για σοβαρές αλλοιώσεις οι οποίες είναι σαφώς ορατές.

Τα **δικεντρικά χρωμοσώματα** προκύπτουν από ανταλλαγές τμημάτων μεταξύ δύο σπασμένων χρωμοσωμάτων και στην πλήρη μορφή τους συνοδεύονται από ένα τουλάχιστον ακεντρικό θραύσμα το οποίο συντίθεται από ακεντρικά κομμάτια από αυτά τα χρωμοσώματα. Ως αποτέλεσμα της ακτινοβόλησης προκαλείται σπάσιμο σε κάθε μια από τις αδελφές χρωματίδες πριν την διαδικασία της αντιγραφής (G_1) και τα σπασμένα άκρα ενώνονται δημιουργώντας μια νέα μορφή. Στη συνέχεια, γίνεται αντιγραφή του DNA και σαν αποτέλεσμα προκύπτει ένα χρωμόσωμα με δυο κεντρομερίδια, το δικεντρικό. Το ακεντρικό θραύσμα θα αντιγραφεί και αυτό όμως θα χαθεί στην επόμενη μίτωση καθώς δεν διαθέτει κεντρομερίδιο και δεν μπορεί να συνδεθεί με τις μιτωτικές ατράκτους για να κινηθεί προς κάποιο πόλο ανάφασης. Υπάρχει περίπτωση να εμφανιστούν και πολυ-κεντρικές διαμορφώσεις ιδιαίτερα μετά από έκθεση σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας. Πρέπει να έχουμε στον νου μας ότι οι δικεντρικές διαμορφώσεις συνοδεύονται από ένα ακεντρικό θραύσμα, οι τρικεντρικές συνοδεύονται από δύο ακεντρικά θραύσματα, οι τετρακεντρικές από τρία κλπ. Ο σχηματισμός ενός δικεντρικού απεικονίζεται στην εικόνα του σχήματος 3.10.



Σχήμα 3.10.: Τα βήματα σχηματισμού δικεντρικού χρωμοσώματος.

Η δημιουργία ενός **δακτυλίου ή δακτυλοειδούς χρωμοσώματος (centric ring)** αφορά βλάβη ενός και μόνου χρωμοσώματος από ακτινοβολία αρκετά νωρίς στον κυτταρικό κύκλο. Πιο συγκεκριμένα, ένα δακτυλοειδές χρωμόσωμα προκύπτει από μια ανταλλαγή ανάμεσα σε δύο σπασίματα σε διαφορετικά τμήματα του ίδιου χρωμοσώματος, φέρει κεντρομερίδιο και συνοδεύεται επίσης από ένα ακεντρικό θραύσμα. Στην συνέχεια του κύκλου κατά την σύνθεση του DNA το χρωμόσωμα αντιγράφεται ενώ το θραύσμα το πιθανότερο είναι να χαθεί στην μίτωση γιατί δεν θα μετακινηθεί προς κάποιον πόλο του κυττάρου εφόσον δεν διαθέτει κεντρομερίδιο. Στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, οι κεντρικοί δακτύλιοι συναντούνται σπάνια σε σύγκριση με τα δικεντρικά. Ο σχηματισμός ενός δακτυλίου απεικονίζεται στην εικόνα του σχήματος 3.11.



Σχήμα 3.11.: Τα βήματα σχηματισμού δακτυλοειδούς χρωμοσώματος.

Οι κεντρικοί δακτύλιοι αποτελούν ασύμμετρες εσωτερικές ανταλλαγές σε ένα χρωμόσωμα. Παρατηρούνται όμως και βλάβες λόγω συμμετρικών εσωτερικών ανταλλαγών.

Υπάρχουν δύο ειδών συμμετρικές ανταλλαγές οι **περικεντρικές** και **παρακεντρικές αναστροφές**. Οι πρώτες αφορούν την 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). Οι δεύτερες συμβαίνουν

εκτός της περιοχής του κεντρομεριδίου με αποτέλεσμα το χρωμόσωμα αναγνωρίζεται μόνο με τη χρήση των τεχνικών ζωνοποίησης, όπου παρατηρείται αλλαγή των φυσιολογικών ζωνών.

Επίσης, υπάρχουν επιπλέον δύο τύποι χρωμοσωμικών αλλοιώσεων η δημιουργία των οποίων δεν οδηγεί τα κύτταρα στον θάνατο, οι **συμμετρικές ανταλλαγές (symmetric translocation)** και οι **μικρές διαγραφές (small interstitial deletion)**.

Για την δημιουργία των **συμμετρικών ανταλλαγών** αρχικά δημιουργείται σπάσιμο σε δύο χρωμοσώματα τα οποία δεν έχουν αντιγραφεί (φάση G_1) ενώ στην συνέχεια γίνεται ανταλλαγή και ένωση των σπασμένων άκρων με αποτέλεσμα να προκύψουν δύο νέα χρωμοσώματα.

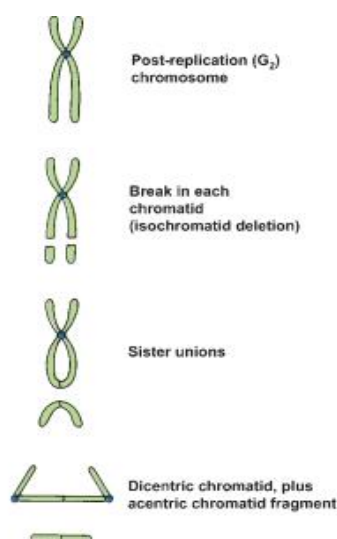
Ο άλλος τύπος μη θανατηφόρων χρωμοσωμικών αλλοιώσεων είναι οι **τελικές ή ενδιάμεσες διαγραφές**. Τέτοιου τύπου βλάβες μπορεί να προκύψουν από δύο σπασίματα στον ίδιο βραχίονα του ίδιου χρωμοσώματος, με αποτέλεσμα την απώλεια των γενετικών πληροφοριών μεταξύ των δύο σπασμάτων. Για την δημιουργία μιας διαγραφής αρχικά γίνονται δύο σπασίματα στον ίδιο βραχίονα ενός μεταφασικού χρωμοσώματος (από ένα ή δύο διαφορετικά φορτισμένα σωματίδια) με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργηθεί ένας βρόγχος DNA χωρίς κεντρομερίδιο (ακεντρικοί δακτύλιοι). Οι **ακεντρικοί δακτύλιοι** μοιάζουν με κουκκίδες με ξεκάθαρα διακριτό κενό μέσα σε αυτές και θεωρούνται συνήθως ενδιάμεσες διαγραφές, ενώ όταν εμφανίζονται σαν διπλές τελείες

(doubleminutes) είναι κυρίως τελικές διαγραφές. Τα σπασμένα άκρα του χρωμοσώματος ενώνονται ενώ ο βρόγχος διαγραφής χάνεται στην επόμενη μίτωση. Οι διαγραφές μπορεί να συσχετίζονται την εμφάνιση καρκίνου καθώς μπορεί να περιέχουν ένα γονίδιο καταστολέα όγκου.

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	

Σχήμα 3.12.: Συγκεντρωτικός πίνακας χρωμοσωματικών αλλοιώσεων.

Ο τρίτος τύπος θανατηφόρας αλλοίωσης, η **γέφυρα αναφάσης**, μπορεί να δημιουργηθεί με διάφορους τρόπους. Όπως φαίνεται στο σχήμα 3.13, προκύπτει από θραύσεις που συμβαίνουν σε μεταγενέστερη φάση του κυτταρικού κύκλου (στην φάση G₂) δηλαδή μετά την αντιγραφή των χρωμοσωμάτων. Τα σπασίματα μπορεί να εμφανιστούν και στις δύο αδελφές χρωματίδες του ίδιου χρωμοσώματος, με αποτέλεσμα τα σπασμένα άκρα να συγκολληθούν και να σχηματίσουν μια ένωση μεταξύ τους, συνοδευόμενα από ένα ακεντρικό θραύσμα. Κατά την επόμενη αναφάση γίνεται πρόσδεση της μιτωτικής ατράκτου στο κεντρομερίδιο με αποτέλεσμα την τάση διαχωρισμού των αδελφών χρωματίδων όμως λόγω της ύπαρξης γέφυρας ανάφασης θα γίνει τέντωμα της χρωματίδας μεταξύ των δύο πόλων. Το αποτέλεσμα είναι τελικά η αδυναμία διαχωρισμού του χρωμοσώματος και εν τέλει ολόκληρου του κυττάρου.



Σχήμα 3.13.: Τα βήματα σχηματισμού γέφυρας ανάφασης.

(2) (10) (11) (12) (13)

3.4. Επίδραση του οξυγόνου (Λόγος επαυξήσεως οξυγόνου/OER)

Η παρουσία ή η απουσία μοριακού οξυγόνου μέσα σε ένα κύτταρο επηρεάζει τη βιολογική επίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερη είναι η οξυγόνωση των κυττάρων τόσο μεγαλύτερη είναι η βιολογική επίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας. Ειδικότερα για τις ακτινοβολίες χαμηλού LET, όσο μεγαλύτερη είναι η οξυγόνωση των κυττάρων τόσο μεγαλύτερη είναι η βιολογική επίδραση μέχρι να εμφανιστεί κορεσμός στην επίδραση του οξυγόνου. Το φαινόμενο της επίδρασης του οξυγόνου είναι υπαρκτό και για και τις ακτινοβολίες υψηλού LET αλλά σε μικρότερο βαθμό. Ο λόγος των δόσεων χωρίς και με την ύπαρξη οξυγόνου (υποξικά έναντι καλά οξυγονωμένων κυττάρων) για την παραγωγή της ίδιας βιολογικής επίδρασης ονομάζεται λόγος επαυξήσεως οξυγόνου (oxygen enhancement ratio /OER):

$$OER = \frac{\text{Δόση για την πρόκληση συγκεκριμένου βιολογικού αποτελέσματος χωρίς την ύπαρξη οξυγόνου}}{\text{Δόση για την πρόκληση συγκεκριμένου βιολογικού αποτελέσματος με την ύπαρξη οξυγόνου}}$$

(3.1)

Το OER για ακτίνες X και ηλεκτρόνια είναι περίπου 3 σε υψηλές δόσεις και

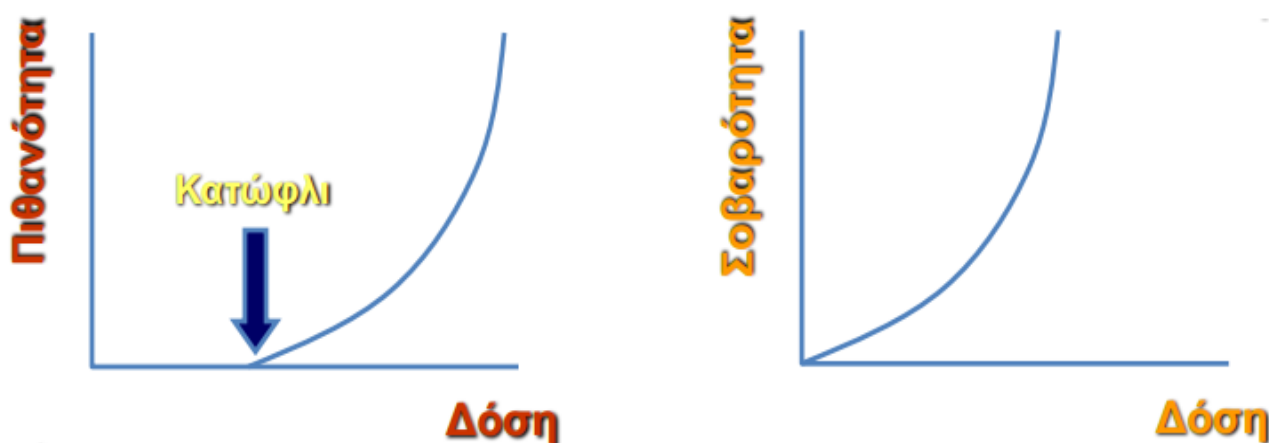
περίπου 2 για δόσεις 1-2 Gy. Το OER μειώνεται καθώς αυξάνεται το LET και προσεγγίζει την μονάδα για τιμή LET = 150 keV/mm.

Τα επίπεδα οξυγόνου στα κύτταρα ενός όγκου έχουν καθορίσουν σε μεγάλο βαθμό την έκβαση μιας θεραπείας με ακτινοβολίες. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση του μεγέθους του όγκου προϋποθέτει αύξηση της αιματικής τροφοδοσία, γεγονός που επιτελείται με τη δημιουργία νεόπλαστων αγγείων (αγγειογένεση). Τα αγγεία αυτά δεν είναι ολοκληρωμένα μορφολογικά και λειτουργικά με αποτέλεσμα να μην τροφοδοτούν επαρκώς όλες τις περιοχές του όγκου με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά. Τα κύτταρα που βρίσκονται σε μικρή απόσταση από κάποιο αγγείο (100-180 μm) είναι δυνατό να προσλάβουν οξυγόνο με την διαδικασία της διάχυσης, ενώ κύτταρα που βρίσκονται σε μεγαλύτερη απόσταση από κάποιο αιμοφόρο αγγείο δεν προσλαμβάνουν ικανή ποσότητα οξυγόνου και καταστρέφονται, σχηματίζοντας περιοχές νεκρώσεως στον όγκο. Στα όρια αυτών των περιοχών τα κύτταρα είναι υποξικά και για τους λόγους που αναφέραμε σχετικώς ακτινοάντοχα, γεγονός που αποτελεί τεράστιο πρόβλημα στην ακτινοθεραπεία όγκων.

3.5. Επικινδυνότητα των ιοντιζουσών ακτινοβολιών

Όπως αναφέραμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο αν μια κυτταρική βλάβη που προκαλείται από έκθεση σε ακτινοβολία δεν επιδιορθωθεί επιτυχώς μπορεί να εμποδίσει την επιβίωση του κυττάρου και την ικανότητα αναπαραγωγής. Υπάρχει, επίσης, περίπτωση το κύτταρο να επιβιώσει φέροντας μεταλλάξεις. Οι δύο αυτές διαδρομές που μπορεί να ακολουθήσει ένα ακτινοβολημένο κύτταρο δημιουργούν διαφορετικές επιπλοκές εν τέλη στον οργανισμό.

Τα περισσότερα όργανα ή ιστοί του σώματος δεν επηρεάζονται καθόλου από την απώλεια μικρού αριθμού κυττάρων, όμως στην περίπτωση που ο αριθμός είναι μεγάλος η βλάβη που προκαλείται στον ιστό είναι αρκετά σημαντική, τόσο που μπορεί να οδηγηθεί στην απώλεια της λειτουργικότητας του. Η πιθανότητα πρόκλησης σημαντικής βλάβης σε έναν ακτινοβολημένο ιστό είναι μηδενική για χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας. Ωστόσο, υπάρχει ένα κατώφλι δόσης πάνω από το οποίο η πιθανότητα εμφάνισης σοβαρής βλάβης αυξάνεται αρκετά συναρτήσει της δόσης μέχρι να γίνει 100% (σχήμα 3.14). Επιπλέον, πέρα από την πιθανότητα, η σοβαρότητα της βλάβης που μπορεί να προκληθεί αυξάνεται με την δόση και μάλιστα για δόσεις που δεν περιορίζονται από κάποια τιμή κατωφλίου (σχήμα 3.14). Τέτοια αποτελέσματα ακτινοβολίας ονομάζονται **καθορισμένα**. Ουσιαστικά τα καθορισμένα αποτελέσματα περιλαμβάνουν την θανάτωση μεγάλου αριθμού κυττάρων που οδηγεί σε καταστροφή οργάνων και έκπτωση συστημάτων με τραγική κατάληξη των θάνατο ολόκληρου του οργανισμού. Ως παράδειγμα καθορισμένων αποτελεσμάτων αναφέρουμε τον ακτινοπροκλητό καταρράκτη, το ερύθημα και την νέκρωση του δέρματος.



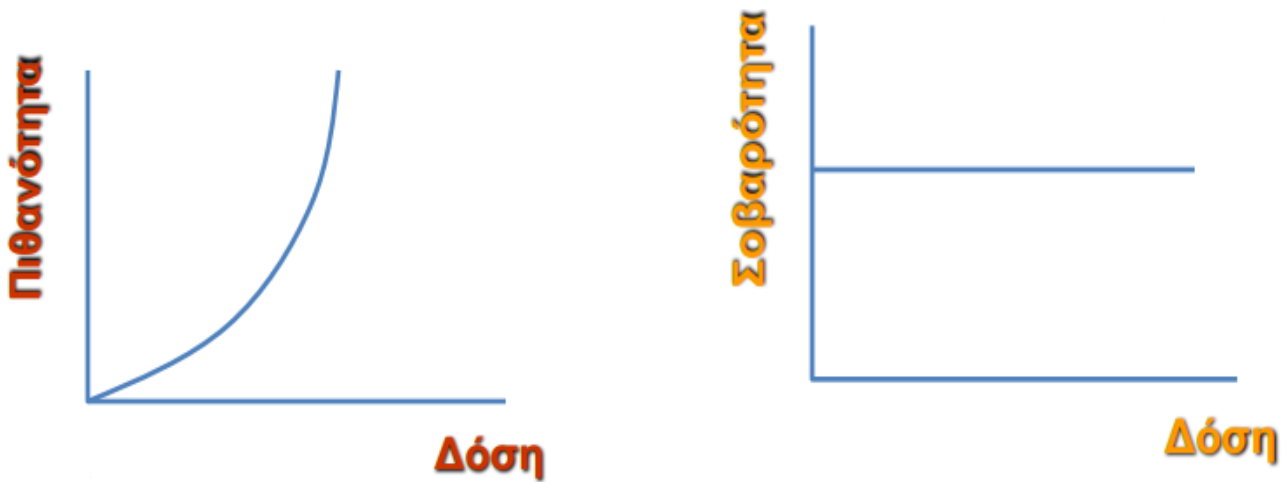
Σχήμα 3.14.: Ποιοτικά διαγράμματα της πιθανότητας συναρτήσει της δόσης και της σοβαρότητας συναρτήσει της δόσης για τα καθορισμένα αποτελέσματα.

Στην περίπτωση που η ακτινοβολία δεν οδηγήσει στην θανάτωση ή στην παύση της αναπαραγωγής του κυττάρου αλλά προκύψουν τροποποιημένα σωματικά κύτταρα με γενετικές μεταλλάξεις τα αποτελέσματα είναι πολύ διαφορετικά. Η καρκινογένεση και οι κληρονομήσιμες βλάβες εμπίπτουν σε αυτήν ακριβώς την κατηγορία.

Στην περίπτωση που η ακτινοβολία πλήξει σωματικά κύτταρα η πιθανότητα πρόκλησης καρκίνου αυξάνεται με την δόση και μάλιστα χωρίς την ύπαρξη κάποιοι κατωφλίου, ενώ η σοβαρότητα δεν εξαρτάται από την δόση (σχήμα 3.15). Τα αποτελέσματα αυτά ονομάζονται **στοχαστικά**.

Εάν η βλάβη ακτινοβολίας εμφανίζεται σε γεννητικά κύτταρα, εμφανίζονται μεταλλάξεις οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν επιβλαβείς επιδράσεις στις μελλοντικές γενιές. Και σε αυτή την περίπτωση, δεν υπάρχει κατώφλι στην πιθανότητα εμφάνισης βλάβης και η σοβαρότητα των κληρονομικών επιδράσεων δεν σχετίζεται με τη δόση. Η πεποίθηση ότι η εμφάνιση στοχαστικών αποτελεσμάτων δεν έχει όριο δόσης βασίζεται στον γεγονός ότι ακόμη και ένα μόνο φωτόνιο ακτίνων Χ θα μπορούσε να οδηγήσει σε μια αλλαγή βάσης που οδηγεί σε μια μετάλλαξη, η οποία με την σειρά

της θα μπορούσε να προκαλέσει καρκίνο ή βλάβη σε γενετικά κύτταρα. Ως παράδειγμα στοχαστικών αποτελεσμάτων είναι όπως αναφέραμε και προηγούμενος η καρκινογένεση, η λευχαιμία και οι γενετικές βλάβες.



Σχήμα 3.15.: Ποιοτικά διαγράμματα της πιθανότητας συναρτήσει της δόσης και της σοβαρότητας συναρτήσει της δόσης για τα στοχαστικά αποτελέσματα.

3.6. Γραμμικό τετραγωνικό μοντέλο

Μια καμπύλη επιβίωσης κυττάρων περιγράφει τη σχέση μεταξύ της δόσης ακτινοβολίας που λαμβάνει ένας οργανισμός και των κυττάρων που επιβιώνουν.

Το γραμμικό τετραγωνικό μοντέλο (σχήμα 3.16) βασίζεται στην υπόθεση ότι υπάρχουν δύο παράμετροι που προκαλούν τον θάνατο των κυττάρων από ακτινοβολία, η πρώτη είναι ανάλογη της δόσης και η δεύτερη είναι ανάλογη με το τετράγωνο της δόσης.

Στο γραμμικό τετραγωνικό μοντέλο υπάρχει η υπόθεση της ύπαρξης μέσα στο κύτταρο πολλών ισοδύναμων θέσεων-στόχων, από τις οποίες μία μόνο εάν προσβληθεί, το κύτταρο καταστρέφεται. Οι στόχοι αυτοί είναι διπλοί, δηλαδή κάθε ένας απαρτίζεται από ζεύγος θέσεων (διπλή έλικα του DNA). Με αυτό τον τρόπο διακρίνονται δυο ειδών βλάβες: (i) η βλάβη με απλό ακτινικό πλήγμα κατά την οποία καταστρέφονται με μιας και οι δύο θέσεις του ζεύγους και (ii) η βλάβη με ξεχωριστά πλήγματα, των δύο θέσεων του ζεύγους, που πρέπει να αλληλεπιδράσουν για να προκύψει θανατηφόρα βλάβη.

Αν δεν πραγματοποιηθεί κάποια αλληλεπίδραση ή αν η ακτινοβολία πλήξει μόνο η μία από τις δύο θέσεις, τότε το κύτταρο έχει υποστεί μη θανατηφόρο επίδραση, την οποία μπορεί να επιδιορθώσει. Βλάβες τέτοιου τύπου είναι γραμμικώς ανάλογες της δόσης και ισούνται με $\exp(-\alpha D)$ όπου α ένας θετικός συντελεστής αναλογίας. Βλάβες του δευτέρου τύπου, ισούνται με $\exp(-\beta D^2)$ όπου β ένας συντελεστής αναλογίας επίσης.

Για χαμηλές δόσεις παρατηρούνται κατά κόρον οι βλάβες απλού πλήγματος (τύπου α), ενώ με την αύξηση της δόσης, αρχίζει να αποκτά σημασία η βλάβη του δεύτερου τύπου (τύπου β).

Σύμφωνα με την παραπάνω θεώρηση το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων, μετά από έκθεση σε δόση D εφάπαξ δίνεται από την εξής σχέση:

$$S = \exp(-\alpha D - \beta D^2) \quad (3.3)$$

όπου

α, β θετικού συντελεστές αναλογίας και

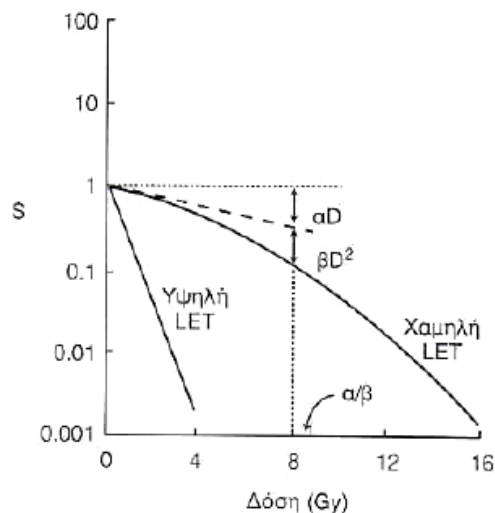
D η δόση ακτινοβολίας.

Στην περίπτωση που οι δύο τύποι βλαβών είναι ποσοτικά ίσες ισχύει:

$$\exp(-\alpha D) = \exp(-\beta D^2) \quad (3.4)$$

$$\alpha D = \beta D^2 \quad (3.5)$$

$$D = \frac{\alpha}{\beta} \quad (3.6)$$



Σχήμα 3.16.: Γραμμικό τετραγωνικό μοντέλο για ακτινοβολίες χαμηλού και υψηλού LET.

Η κλίση της καμπύλης επιβίωσης επηρεάζεται πολύ περισσότερο από το β συστατικό, όταν το συστατικό α είναι μικρό (μικρή κλίση). Όταν η κλίση της γραμμικής βλάβης είναι μεγάλη, η προσθήκη της β συνιστώσας δεν επηρεάζει σημαντικά τη συνισταμένη κλίση της καμπύλης επιβιώσεως.

Ο G. Steel διακρίνει τρεις τύπους βλαβών:

- Επιδιορθώσιμες βλάβες που αλληλεπιδρούν και γίνονται θανατηφόρες.
- Βλάβες που μπορεί να αποβούν θανατηφόρες, αλλά αυτό εξαρτάται από την επανορθωτική ικανότητα του κυττάρου.
- Βλάβες που είναι τόσο βαρείες που είναι αδύνατο να διορθωθούν.

Οι βλάβες της κατηγορίας της πρώτης κατηγορίας διαμορφώνουν το συντελεστή β του μοντέλου ενώ οι βλάβες της δεύτερης και τρίτης κατηγορίας μαζί, διαμορφώνουν το συντελεστή α και καταλαβαίνουμε ότι οι βλάβες που αναφέρονται στον β συντελεστή είναι αυτές που υπάρχει η δυνατότητα να τροποποιηθούν αλλάζοντας ταυτόχρονα την τιμή του συντελεστή α .

3.7. Επικινδυνότητα στην κλίμακα των χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας

Οι εκτιμήσεις που αφορούν την επικινδυνότητα έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία έχουν μελετηθεί για χρόνια και βασίζονται κυρίως σε επιδημιολογικά δεδομένα από τους επιζώντες της ατομικής βόμβας στη Χιροσίμα και το Ναγκασάκι στην Ιαπωνία. Οι μελέτες αυτές παρείχαν αποτελέσματα σχετικά με τις εκτιμήσεις κινδύνου και συγκεκριμένα υπέδειξαν γραμμική αύξηση της επικινδυνότητας με τη δόση για ενδιάμεσες και υψηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας (>50-100 mGy). Τα επιδημιολογικά δεδομένα για την κλίμακα των χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας δεν μπορούν να δώσουν απευθείας εκτιμήσεις κινδύνου, ωστόσο, για πρακτικούς κανονιστικούς σκοπούς, θεωρείται ότι είναι γραμμική η εξάρτηση της επικινδυνότητας με τη δόση και κάτω από το κατώφλι των χαμηλών δόσεων.

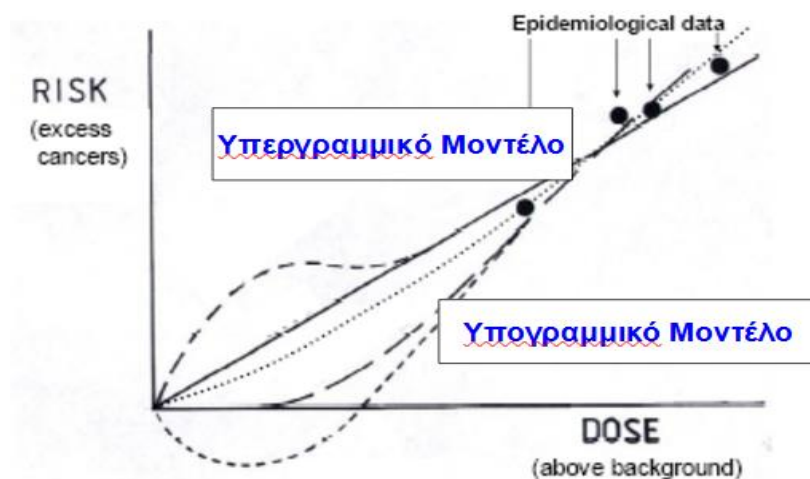
Η εγκυρότητα αυτής της υπόθεσης απαιτεί ότι η αποτελεσματικότητα των βιολογικών διεργασιών με τις οποίες τα κύτταρα ανταποκρίνονται στην παρουσία βλαβών του DNA είναι ίδια στην περίπτωση χαμηλών και υψηλών δόσεων.

Πέρα από την υπόθεση επέκτασης της γραμμικότητας και στην περιοχή των χαμηλών δόσεων, έχουν αναπτυχθεί δύο εκ διαμέτρου αντίθετα μοντέλα, το υπεργραμμικό και το υπογραμμικό μοντέλο.

Το υπεργραμμικό μοντέλο υποστηρίζει αυξημένη επικινδυνότητα σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας λόγω της αυξημένης επιδεκτικότητας σε ακτινοπροκλητές βλάβες βάσει της γενετικής προδιάθεσης κάποιων ατόμων (Individual Radosensitivity). Επιπλέον, βασίζεται στην γενωμική αστάθεια που μπορεί να δημιουργηθεί μετά την επιδιόρθωση μιας μετάλλαξης (Genomic Instability). Τέλος, η θεωρία του υπεργραμμικού μοντέλου στηρίζεται στην πιθανή ύπαρξη οδών (Bystander Effects).

Το υπογραμμικό μοντέλο βασίζεται στην προσαρμοστικότητα, την ευαισθητοποίηση και την εγρήγορση των κυτταρικών μηχανισμών σε χαμηλούς ρυθμούς δόσεων και θεωρεί την πιθανή ύ-

παρξη χαμηλού κατωφλίου δόσης, κάτω από το οποίο επιδιορθώνονται όλες οι κυτταρικές οι βλάβες. Επίσης, βασίζεται στην άποψη ότι οι χαμηλές δόσεις μπορούν να εγείρουν τον μηχανισμό απόπτωσης, οδηγώντας σε θάνατο τα κύτταρα με βλάβες. Σύμφωνα με το υπογραμμικό μοντέλο οι πολύ μικρές εκθέσεις είναι ακίνδυνες ενώ ταυτόχρονα μπορεί να θεωρηθούν ευεργετικές σύμφωνα με την θεωρία της όρμησης (hormesis).



Σχήμα 3.17.: Υπεργραμμική, γραμμική και υπογραμμική επέκταση του γραμμικού μοντέλου στην περιοχή των χαμηλών δόσεων.

3.8. Γενωμική αστάθεια

Η γενωμική αστάθεια είναι ένα χαρακτηριστικό των περισσότερων καρκινικών κυττάρων και ουσιαστικά πρόκειται για μια αυξημένη τάση μεταβολής του γονιδιώματος κατά τη διαίρεση τους. Πιο συγκεκριμένα, γενωμική αστάθεια είναι η εμφάνιση υψηλής συχνότητας μεταλλάξεων στο γονιδίωμα. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να είναι αλλαγές στην αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων, χρωμοσωμικές ανακατατάξεις ή ανευπλοειδία.

Ο καρκίνος είναι συχνά αποτέλεσμα βλάβης σε πολλαπλά γονίδια που ελέγχουν την κυτταρική διαίρεση και τους καταστολείς όγκων. Η ακεραιότητα του γονιδιώματος παρακολουθείται και εξασφαλίζεται από διάφορους μηχανισμούς παρακολούθησης όπως είναι τα σημεία ελέγχου βλάβης του DNA, οι μηχανισμοί επισκευής του DNA και το μιτωτικό σημείο ελέγχου. Οποιοδήποτε ελάττωμα σε έναν ή περισσότερους από τους παραπάνω μηχανισμούς συχνά οδηγεί σε γενωμική αστάθεια, η οποία δημιουργεί μια προδιάθεση στο κύτταρο για κακοήγη μετασχηματισμό. Η γενωμική αστάθεια μπορεί να είναι είτε μικροδορυφορική είτε χρωμοσωμική αστάθεια. Εκτενέστερα θα αναφερθούμε στην χρωμοσωμική αστάθεια η οποία αποτελεί και αντικείμενο έρευνας της εν λόγω διπλωματικής εργασίας.

3.8.1. Χρωμοσωμική αστάθεια

Χρωμοσωμική αστάθεια είναι είτε η απόκτηση ή/και η απώλεια ολόκληρων χρωμοσωμάτων ή χρωμοσωμικών τμημάτων με υψηλότερο ρυθμό σε ορισμένους πληθυσμούς κυττάρων, όπως τα καρκινικά κύτταρα, σε σύγκριση με φυσιολογικούς πληθυσμούς κυττάρων είτε η ύπαρξη αυξημένης συχνότητας δομικών χρωμοσωμικών αλλοιώσεων. Σε ορισμένους καρκίνους, κάθε κύτταρο εντός

του όγκου έχει διαφορετική χρωμοσωμική σύσταση (καρυότυπος) λόγω της χρωμοσωμικής αστάθειας.

Η χρωμοσωμική αστάθεια διακρίνεται σε δύο κατηγορίες, την αριθμητική χρωμοσωμική αστάθεια και την δομική χρωμοσωμική αστάθεια.

Η αριθμητική χρωμοσωμική αστάθεια προκύπτει όταν συμβαίνουν λάθη κατά τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων στην μιτωτική διαίρεση του κυττάρου. Το αποτέλεσμα των λαθών αυτών είναι η δημιουργία κυττάρων που φέρουν είτε λιγότερα (πχ. μονοσωμίες), είτε περισσότερα (πχ. τρισωμίες) χρωμοσώματα και καλούνται ανευπλοειδικά κύτταρα ή φέρουν ολόκληρες χρωμοσωμικές σειρές και καλούνται πολυπλοειδικά κύτταρα.

Η δομική χρωμοσωμική αστάθεια προκύπτει από ανώμαλες δομικές μεταβολές στα χρωμοσώματα (πχ. 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 πρώτο-ογκογονιδίων ή απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων με τη συνέπεια την δημιουργία καρκίνου.

3.8.2. Ανευπλοειδία

Όπως αναφέραμε και στις πρώτες ενότητες του δεύτερου κεφαλαίου, τα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα έχουν 23 διαφορετικά χρωμοσώματα σε ζευγάρια, μισά από κάθε γονέα, για να αποδώσουν συνολικά 46 χρωμοσώματα. Κύτταρα τέτοιου τύπου καλούνται «διπλοειδή». Τα κύτταρα που βρίσκονται σε συμπαγείς όγκους, από την άλλη πλευρά, έχουν συνήθως 60-90 χρωμοσώματα και ονομάζονται «ανευπλοειδή».

Οποιοδήποτε κύτταρο με αριθμό χρωμοσωμάτων διαφορετικό από το 46 και όχι ακριβές πολλαπλάσιο του 23 είναι ένα ανευπλοειδές κύτταρο και αυτή η ανισορροπία στα χρωμοσώματα προκαλεί μεγάλο αριθμό δυσμενών συνεπειών, μία από τις οποίες είναι ο καρκίνος.

Καθώς τα ανευπλοειδή κύτταρα διαιρούνται, το γονιδίωμα τους καθίστανται ολοένα και πιο αποδιοργανωμένο με αποτέλεσμα τα περισσότερα από αυτά τα κύτταρα να σταματούν να διαιρούνται ενώ πολλά πεθαίνουν.

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί και ερεθίσματα που οδηγούν στην δημιουργία ανευπλοειδών κυττάρων, όπως είναι η ακτινοβολία και διαφορές χημικές ουσίες όπως η πίσσα. Η έκθεση σε αυτές τις συνθήκες έχει ως αποτέλεσμα όπως είναι γνωστό και την εμφάνιση καρκινογένεσης.

Η παραπάνω διαπίστωση είναι ένα ισχυρό επιχείρημα για τη θεωρία της ανευπλοειδίας του καρκίνου.

Σύμφωνα με την θεωρία της γονιδιακής μετάλλαξης του καρκίνου, η μετάλλαξη ορισμένων γονιδίων μετατρέπει ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό, δηλαδή, η μετάλλαξη ενός μόνο, ή μερικών γονιδίων μπορεί να είναι επαρκής για τη μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Αντίθετα, η ανευπλοειδία διαταράσσει την κανονική ισορροπία πολλών χιλιάδων γονιδίων, καθώς ένα μοναδικό χρωμόσωμα περιέχει χιλιάδες γονίδια. Επιπλέον, ένα καρκινικό κύτταρο μπορεί να έχει πολλά αντίγραφα ενός δεδομένου χρωμοσώματος και για αυτό τον λόγο η ανευπλοειδία είναι πολύ περισσότερο καταστροφική για τη ζωή ενός κυττάρου.

(14) (15) (16) (17) (18) (19)

3.9. Εισαγωγή στην βιοδοσιμετρία

Όλα όσα αναφέρθηκαν στο τρίτο κεφάλαιο αποτελούν βασικές γνώσεις για τον προγραμματισμό, την κατανόηση και την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας με σκοπό την μελέτη της επίδρασης γ ακτινοβολίας χαμηλών δόσεων με μεθόδους κυτταρογενετικής και μοριακής γενετικής.

Υπάρχει ένα πλήθος μεθόδων δοσιμέτρίας, στην κάθε μια από τις οποίες χρησιμοποιείται διαφορετικός εξοπλισμός (δοσίμετρα). Ως δοσίμετρο θεωρείται κάθε μετρητικό σύστημα το οποίο είναι ικανό να παρέχει μια ένδειξη M η οποία είναι ανάλογη της δόσης που εναποτίθεται από ιοντίζουσα ακτινοβολία στον ευαίσθητο όγκο V του δοσιμέτρου. Γενικά διακρίνουμε δύο ειδών δοσίμετρα, τα απόλυτα και τα σχετικά. Στα πρώτα, από το σήμα που παράγεται στον ευαίσθητο όγκο του δοσιμέτρου προσδιορίζεται άμεσα η απορροφούμενη δόση χωρίς να απαιτείται βαθμονόμηση του δοσιμέτρου σε ένα γνωστό πεδίο ακτινοβολίας, ενώ στην δεύτερη περίπτωση για τον προσδιορισμό της απορροφούμενης δόσης απαιτείται βαθμονόμηση του δοσιμέτρου σε ένα γνωστό πεδίο ακτινοβολίας. Κάποιες ευρέως εφαρμοζόμενες μέθοδοι δοσιμετρίας είναι η θερμοδομετρία, η χημική δοσιμετρία, η δοσιμετρία με θαλάμους ιονισμού, η δοσιμετρία φωταύγειας, η δοσιμετρία με φιλμ, η δοσιμετρία προσωπικού και η βιοδοσιμετρία.

Βιοδοσιμετρία ιονιζουσών ακτινοβολιών είναι η μεθοδολογία εκτίμησης της απορροφούμενης δόσης με βάση την απόκριση ενός βιολογικού δοσιμέτρου.

Βιολογικά δοσίμετρα ορίζουμε διάφορες ουσίες ή κυτταρικά συστήματα των οποίων η απόκριση μετά από έκθεση σε ακτινοβολία σχετίζεται ποσοτικά με την απορροφούμενη δόση. Τα βιολογικά δοσίμετρα πρέπει να έχουν ένα ικανοποιητικό βαθμό ευαισθησίας και να έχουν “μνήμη”. Επίσης, η ουσία που επιλέγεται ως βιολογικό δοσίμετρο θα πρέπει να είναι παρούσα σε όλο το σώμα και ο τρόπος που λαμβάνεται το δείγμα να είναι ανώδυνος και εύκολος.

Η βιοδοσιμετρία αποτελεί μοναδική μέθοδο προσδιορισμού της δόσης σε περίπτωση απουσίας φυσικού δοσιμέτρου προσωπικού. Επίσης είναι ο μοναδικός τρόπος επιβεβαίωσης έκθεσης φυσικού δοσιμέτρου και χρησιμοποιείται για την δοσιμετρία σε περιπτώσεις μερικής έκθεσης ανθρωπίνου σώματος, με το φυσικό δοσίμετρο εκτός πεδίου έκθεσης. Τέλος, χρησιμοποιείται ευρέως για την συσχέτιση μεταξύ των δόσεων ακτινοβολίας και τις επιπτώσεις που αυτές προκαλούν στην υγεία αλλά και για την κατανόηση του μηχανισμού καρκινογένεσης από ακτινοβολίες.

Κεφάλαιο 4: Μέθοδοι κυτταρογενετικής και μοριακής γενετικής

Διαφορετικοί τύποι βιοδεικτών χρησιμοποιούνται αποτελεσματικά για τον προσδιορισμό του κινδύνου που επάγει η ακτινοβολία, συμπεριλαμβανομένων των χρωμοσωματικών βλαβών, των μεταβολών μετά την μετάφραση, των αλλαγών στην έκφραση των γονιδίων και στην σύνθεση πρωτεϊνών καθώς και επιγονιδιωματικών τροποποιήσεων.

Η έκθεση των κυττάρων σε δόσεις ακτινοβολίας προκαλεί συγκεκριμένες βλάβες του DNA οι οποίες με την σειρά τους σηματοδοτούν την ενεργοποίηση μιας σειράς μηχανισμών επιδιόρθωσης.

Όπως αναφέραμε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, η λανθασμένη επισκευή των δίκλωνων θραύσεων του DNA (DSBs) μπορεί να προκαλέσει πολλούς διαφορετικούς τύπους χρωμοσωματικών αλλοιώσεων. Οι κυτταρογενετικοί βιοδείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανάλυση αυτών των αλλοιώσεων (π.χ. δικεντρικών, πρόωρη συμπύκνωση χρωμοσωμάτων και μικροπυρήνων) σε λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος έχουν οριστεί ως βιοδείκτες σωματικών χρωμοσωματικών βλαβών.

Οι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση αλλοιώσεων που επάγονται μετά από έκθεση σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας, όπως αυτές που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία, δεν είναι στον ίδιο βαθμό αποδοτικοί σε περιπτώσεις έκθεσης σε χαμηλότερες δόσεις.

Αρκετά αποτελεσματικές και ευαίσθητες μέθοδοι στην κλίμακα των χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας είναι η μέθοδος ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης ιστόνικης πρωτεΐνης H2A (foci/ γ -H2AX) και η μέθοδος φθορισμού in situ υβριδισμού (Fluorescence in situ hybridization assay /FISH).

Στο παρών κεφάλαιο θα κάνουμε μια σύντομη αναφορά στην μέθοδο της κλασικής βιοδοσιμετρίας και στις βασικότερες μεθόδους κυτταρογενετικής και μοριακής γενετικής. Θα αναλύσουμε εκτενέστερα τις τρεις μεθόδους που εφαρμόσαμε πειραματικά, δηλαδή την μέθοδο της καταμέτρησης την μέθοδο της καταμέτρησης μικροπυρήνων (μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης), την μέθοδο της φωσφορυλιωμένης ιστόνης γ -H2AX (foci) και την μέθοδο φθορισμού in situ υβριδισμού (Fluorescence in situ hybridization assay /FISH).

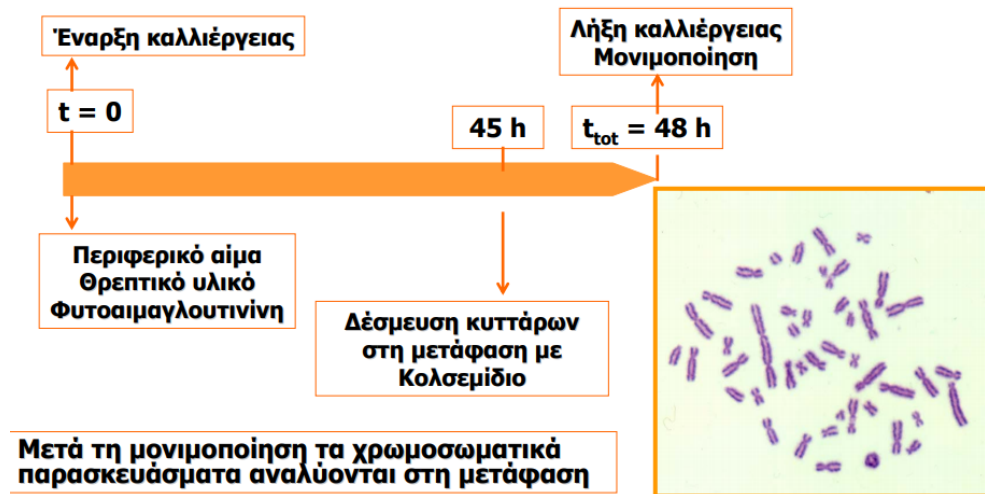
4.1. Μέθοδος κλασικής βιοδοσιμετρίας

Η ανάλυση των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων μέσω της συχνότητας εμφάνισης τους σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος αποτελεί την πιο αξιόπιστη και παγκοσμίως αποδεκτή μέθοδο κλασικής βιοδοσιμετρίας καθώς μπορεί να ανταποκριθεί αποτελεσματικά σε ένα εύρος δόσεων από 0,1 έως 6 Gy.

Μετά από οξεία έκθεση σε ακτινοβολία, η συχνότητα εμφάνισης των δικεντρικών παραμένει αμετάβλητη για αρκετές εβδομάδες, αλλά μειώνεται στο ήμισυ της τιμής της μετά από 180 ημέρες.

Το πρωτόκολλο της κλασικής βιοδοσιμετρίας όπως και μια εικόνα μετάφρασης από μικροσκόπιο στην οποία εντοπίζονται δικεντρικά χρωμοσώματα και ένα δακτύλιος φαίνονται στο σχήμα 3.1. Η κλασική κυτταρογενετική μεθοδολογία δοσιμετρίας βασίζεται στη καλλιέργεια των 48 λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος με παρουσία μιτογόνων παραγόντων. Με αυτό τον τρόπο τα κύτταρα

εισέρχονται στο κυτταρικό τους κύκλο για να γίνει ανάλυση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων στη μετάφαση.



Σχήμα 4.1.: Πρωτόκολλο κλασικής μεθόδου βιοδοσιμετρίας και εικόνα μικροσκοπίου μιας μετάφασης στην οποία εντοπίζονται δικεντρικά χρωμοσώματα και ένα δακτύλιος.

Η συχνότητα εμφάνισης των αλλοιώσεων στο υπόβαθρο, δηλαδή σε δείγματα αίματος που δεν εκτίθενται κυμαίνεται από 0,0005 έως 0,001. Η συχνότητα αυξάνεται με τη δόση γραμμικά-τετραγωνικά για ακτινοβολίες χαμηλού LET ενώ έχει γραμμική εξάρτηση από την δόση για νετρόνια και ακτινοβολίες υψηλού LET.

Έτσι, χρησιμοποιώντας τις αλλοιώσεις ως δείκτη έκθεσης, ο προσδιορισμός της απορροφούμενης δόσης είναι εφικτός μέσω των πρότυπων καμπυλών αναφοράς οι οποίες έχουν τη μορφή γραμμικής-δευτεροβάθμιας εξίσωσης:

$$y = c + bD + aD^2 \quad (4.1)$$

όπου

y η συχνότητα εμφάνισης δικεντρικών ανά κυτταρο,

D η απορροφούμενη δόση σε Gy,

c, b, a συντελεστές που εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως η ακτινοβολία.

Συνήθως η ανάλυση 500 μεταφάσεων αρκεί για τον προσδιορισμό της συχνότητας των δικεντρικών ενώ η απορροφούμενη δόση προκύπτει από την σχέση:

$$D = \frac{[-b + \sqrt{b^2 + 4ay}]}{2a} \quad (4.2)$$

Η δόση που προκύπτει από την σχέση 4.2 θεωρείται ως η ισοδύναμη ολόσωμη δόση που έλαβε κάποιος από μια τυχαία έκθεση.

Σε αρκετά υψηλές δόσεις, τα περισσότερα από τα κύτταρα που έχουν πληγεί σοβαρά δεν ολοκληρώνουν την διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης με αποτέλεσμα να είναι πολύ δύσκολο να βρεθούν ακόμη και μερικές μεταφάσεις για ανάλυση. Έτσι, σε περιπτώσεις έκθεσης σε θανάσιμες δόσεις ακτινοβολίας (3-6 Gy) είναι αρκετή η ανάλυση 25-50 μεταφάσεων προκειμένου να ληφθούν οι βασικές πληροφορίες που χρειάζονται για την σωστή ιατρική αντιμετώπιση των ασθενών.

Όταν πρέπει να εντοπιστούν χαμηλές δόσεις, της τάξης μερικών 100 mGy, το σφάλμα της μεθόδου μπορεί να είναι πολύ μεγάλο, καθώς μόνο λίγες αλλοιώσεις είναι διαθέσιμες για εκτίμηση.

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η κλασική μέθοδος βιοδοσιμετρίας δεν είναι σκόπιμο να χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου η έκθεση έχει γίνει πριν από μεγάλο χρονικό διάστημα καθώς η μέθοδος χάνει την αξιοπιστία της. Το γεγονός αυτό οφείλεται στον πεπερασμένο χρόνο ζωής των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος και στην αντικατάστασή τους μετά από πολλαπλασιασμό αρχέγονων κυττάρων κυρίως του μυελού των οστών, η οποία πραγματοποιείται από νέα φυσιολογικά ή από λεμφοκύτταρα με αλλοιώσεις που είναι όμως συμβατές με την κυτταρική τους διαίρεση με συνέπεια οι επαγόμενες από την ακτινοβολία χρωμοσωματικές αλλοιώσεις να είναι ασταθείς.

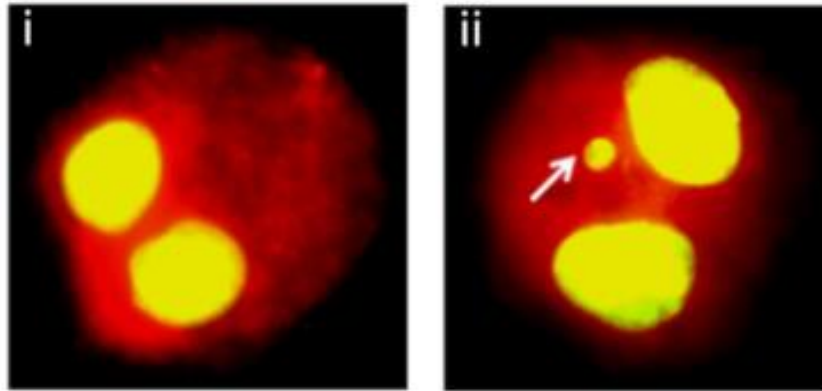
(13) (7)

4.2. Μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης-Μέθοδος μικροπυρήνων

Η ανίχνευση μικροπυρήνων (MN) με την μέθοδο αναστολής της κυτταροκίνησης (Cytokinesis-block micronucleus assay /CBMN) αναπτύχθηκε από τους Fenech και Morley το 1985 και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική μέθοδος της κλασικής βιοδοσιμετρίας καθώς πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο αριθμός των μικροπυρήνων που επάγει η ακτινοβολία συσχετίζεται έντονα με τη δόση και την ποιότητα της ακτινοβολίας. Η μέθοδος CBMN αποτελεί μια πλήρως επικυρωμένη και τυποποιημένη τεχνική για την in vivo αξιολόγηση της επαγγελματικής έκθεσης. Σε σύγκριση με την μέθοδο της κλασικής βιοδοσιμετρίας, η μέθοδος CBMN πλεονεκτεί από οικονομικής απόψεως ενώ ταυτόχρονα η ανάλυση που απαιτεί είναι εύκολη και γρήγορη. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου CBMN σχετίζεται με την μεγάλη συχνότητα εμφάνισης μικροπυρήνων στο υπόβαθρο.

Οι μικροπυρήνες αποτελούν μικρά εξωπυρηνικά σώματα και μπορεί να είναι αποτέλεσμα χρωμοσωμικών θραυσμάτων δηλαδή άκεντρων χρωμοσωματικών τμημάτων ή χρωμοσωματικής καθυστέρησης κατά την ανάφαση της μίτωσης δηλαδή ολόκληρα χρωμοσώματα τα οποία δεν κατάφεραν να αλληλεπιδράσουν με την άτρακτο κατά τη μίτωση με αποτέλεσμα να περιέχουν το κεντρόμερος στους μικροπυρήνες οπότε να μεταβάλλεται ο αριθμός των χρωμοσωμάτων στον κύριο πυρήνα (σχήμα 4.2).

Οι μικροπυρήνες ανιχνεύονται και καταμετρούνται στο κυτταρόπλασμα στην πρώτη φάση μετά την κυτταρική διαίρεση σε διπύρρηνα κύτταρα (BN). Τα διπύρρηνα κύτταρα αυτά προκύπτουν εξαιτίας της προσθήκης κυτταροχλασίνης B, η οποία εξασφαλίζει την αναστολή της κυτταροκίνησης χωρίς να εμποδίζει την πυρηνική διαίρεση. Επομένως κύτταρα που έχουν διαιρεθεί μία μόνο φορά φανερώνονται ως διπύρρηνα κύτταρα, ενώ κύτταρα που έχουν διαιρεθεί περισσότερο από μία φορά εμφανίζονται ως τριπύρρηνα, τετραπύρρηνα και πολυπύρρηνα.



Σχήμα 4.2.: Εικόνες διπύρηνων κυττάρων χωρίς την ύπαρξη μικροπυρήνα (αριστερά) και με την ύπαρξη μικροπυρήνα (δεξιά).

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο αριθμός των MN που προκαλούνται από την ακτινοβολία συσχετίζεται έντονα με τη δόση ακτινοβολίας και εξαρτάται από την ποιότητα ακτινοβολίας. Για δόσεις ακτινοβολίας χαμηλού LET, η μέθοδος των μικροπυρήνων ακολουθεί μια γραμμική-τετραγωνική εξίσωση δόσης-απόκρισης της μορφής $y = c + \alpha D + \beta D^2$, ενώ μια γραμμική εξάρτηση της μορφής $y = c + \alpha D$ έχει παρατηρηθεί για ακτινοβολίες υψηλού LET, με τις τελευταίες να είναι περισσότερο αποτελεσματικές στη δημιουργία MN. Στις εξισώσεις η μεταβλητή y αντιπροσωπεύει το ποσοστό του αριθμού των μικροπυρήνων στον συνολικό αριθμό των διπύρηνων μέσω του λόγου MN/BN, η παράμετρος c αποτελεί την συχνότητα υποβάθρου, η μεταβλητή D είναι την απορροφούμενη δόση και οι συντελεστές α και β αναφέρονται στον αριθμό των μικροπυρήνων ανά διπύρηνο κύτταρο ανά Gy και ανά Gy².

Η συχνότητα εμφάνισης των μικροπυρήνων επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες όπως είναι η ηλικία, το φύλο, τη διατροφή και η έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Όπως είναι λογικό και η συγκεκριμένη μέθοδος απαιτεί τον ορισμό κριτηρίων καθορισμού και μέτρησης των διπύρηνων κυττάρων καθώς και των υπάρχοντων μικροπυρήνων έτσι ώστε να γίνεται ορθότερη καταγραφή τους. Παρακάτω ακολουθούν τα κριτήρια μέτρησης και καταγραφής του δημοσιευμένου πρωτόκολλου του Fenech, τα οποία ακολουθήθηκαν κατά την διαδικασία ανάλυσης.

Κριτήρια επιλογής διπύρηνων κυττάρων για την καταμέτρηση της συχνότητας των μικροπυρήνων:

- Τα κύτταρα πρέπει να είναι διπύρηνια.
- Οι δυο πυρήνες των διπύρηνων κυττάρων πρέπει να είναι μέσα στα όρια του ίδιου κυτταροπλάσματος.
- Οι δυο πυρήνες πρέπει να είναι περίπου ίσοι σε σχήμα και η χρώση τους να είναι ίσης έντασης.
- Οι δυο πυρήνες μπορεί να μην συνδέονται μεταξύ τους και στη περίπτωση που υπάρχει γέφυρα μεταξύ τους, αυτή να μην ξεπερνά το ¼ της διαμέτρου του πυρήνα.

- Οι δύο πυρήνες μπορεί να ακουμπούν ο ένας πάνω στον άλλον χωρίς όμως να δημιουργείται επικάλυψη. Ένα κύτταρο με επικάλυψη του ενός πυρήνα πάνω στον άλλον μπορεί να καταμετρηθεί εφόσον τα όρια του κάθε πυρήνα είναι ευδιάκριτα.
- Τα όρια του κυτταροπλάσματος των διπύρηνων ενός κυττάρου πρέπει να είναι άθικτα και ευδιάκριτα απ' τα όρια των κυτταροπλάσμάτων των γειτονικών κυττάρων.

Κριτήρια καταμέτρησης μικροπυρήνων (χαρακτηριστικά μικροπυρήνων):

Οι μικροπυρήνες είναι ακριβώς ίδιοι με τους κύριους πυρήνες απλώς μικρότεροι και ακολουθούν τα εξής χαρακτηριστικά:

- Η διάμερος του μικροπυρήνα σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα συνήθως ποικίλει ανάμεσα στο $1/16^\circ$ και $1/3^\circ$ της μέσης διαμέτρου του κύριου πυρήνα που αντιστοιχεί στο $1/256^\circ$ και $1/9^\circ$ της περιοχής του ενός πυρήνα σε ένα διπύρηνο κύτταρο αντιστοίχως.
- Οι μικροπυρήνες είναι μη διαθλαστικοί και έτσι μπορούν εύκολα να γίνουν ευδιάκριτοι από τυχόν ψευδή σωματίδια που μοιάζουν με μικροπυρήνες.
- Οι μικροπυρήνες δεν συνδέονται και δεν είναι ενωμένοι με τους κύριους πυρήνες.
- Οι μικροπυρήνες μπορεί να ακουμπούν στο πυρήνα χωρίς όμως να υπάρχει επικάλυψή του και τα όρια του μικροπυρήνα πρέπει να είναι πλήρως ευδιάκριτα από τα όρια του κύριου πυρήνα.
- Οι μικροπυρήνες πρέπει να έχουν την ίδια έντονη χρώση με τον κύριο πυρήνα αν και περιστασιακά ο μικροπυρήνας αποκτά χρώμα μεγαλύτερης έντασης.

(20) (21) (22) (23)

4.3. Μέθοδος της φωσφορυλιωμένης ιστονικής πρωτεΐνης H2A (γ -H2AX)

Οι πυρηνικές εστίες foci που δημιουργούνται σε σημεία βλάβης του DNA ως “απάντηση” στην ιονίζουσα ακτινοβολία ουσιαστικά αποτελούν συγκροτήματα πρωτεϊνών σηματοδότησης και επισκευής που εντοπίζονται σε θέσεις δίκλωνων θραύσεων DNA.

Όπως αναφέραμε και στην ενότητα 2.1.2 το κάθε ένα από τα χρωμοσώματα αποτελείται από ένα μακρύ γραμμικό μόριο DNA που αλληλοεπιδρά με πρωτεΐνες οι οποίες διπλώνουν με αποτέλεσμα την δημιουργία μιας πιο συμπαγής δομής. Οι πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις ιστόνες και τις υπόλοιπες μη χρωμοσωμικές πρωτεΐνες (μη ιστόνες). Το σύμπλοκο του DNA και των πρωτεϊνών καλείται χρωματίνη. Η βασική μονάδα της χρωματίνης, το

νουκλεοσωμάτιο, αποτελείται από ένα σύμπλοκο οκτώ πρωτεϊνικών μορίων, των ιστόνων (ανά δύο μόρια ιστόνων H2A, H2B, H3 και H4) και ενός τμήματος δίκλωνου DNA, μήκους περίπου 146 ζευγών νουκλεοτιδίων. Το οκταμερές των ιστόνων σχηματίζει έναν πρωτεϊνικό πυρήνα γύρω από τον οποίο περιελίσσεται η δίκλωνη έλικα του DNA.

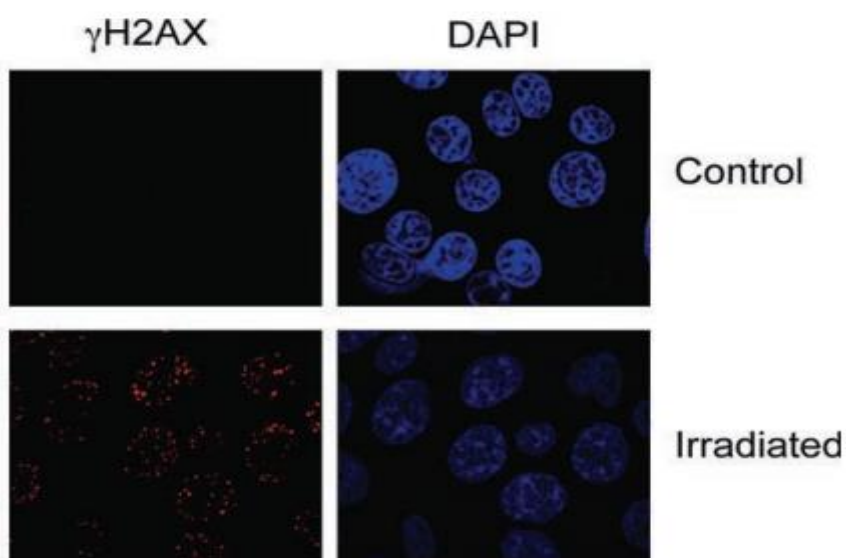
Η ιστόνη H2AX ανήκει στην οικογένεια των H2A ιστονών. Μετά την πρόκληση δίκλωνων θραύσεων στο DNA λόγω ιοντίζουσας ακτινοβολίας, η H2AX φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 139 στο τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η φωσφορυλιωμένη μορφή της H2AX ονομάζεται γ-H2AX. Η φωσφορυλίωση της ιστόνης είναι από τα πρώτα στάδια που συμβαίνουν για αναγνώριση δίκλωνων θραύσεων DNA και γίνεται από κινάσες όπως οι ATM και ATR. Μετά από ταχεία ενεργοποίηση της από την ιονίζουσα ακτινοβολία, η δραστηριότητα της κινάσης ATM έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση και άλλων πρωτεϊνικών σημείων ελέγχου, όπως τα p53, Chk2 και SMC.

Αν και η φωσφορυλίωση του H2AX αντικατοπτρίζει αποκλειστικά DSBs, αποτελεί τον καλύτερο βιοδείκτη καθώς δεν επηρεάζεται από την φάση του κυτταρικού κύκλου. Το χρονικό διάστημα για τη φωσφορυλίωση είναι 1-10min μετά τη βλάβη και εκτείνεται σε χιλιάδες βάσεις εκατέρωθεν του σπασίματος. Στην συνέχεια, έχοντας προκληθεί δίκλωνες θραύσεις στο DNA, λαμβάνουν δράση οι ενζυμικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης των βλαβών.

Στην πράξη τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα επάγονται με ένα συγκεκριμένο αντίσωμα το οποίο προσδένεται στην πρωτεΐνη σηματοδότησης/επισκευής ενδιαφέροντος. Η δέσμευση του αντισώματος ανιχνεύεται με δευτερεύον αντίσωμα, το οποίο φέρει μια ετικέτα φθορισμού. Έτσι, με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού γίνεται προσδιορισμός της θέσης και της έντασης της κάθε εστίας (σχήμα 4.3).

Η εκτεταμένη χρήση φωσφορυλιωμένων δεικτών βλάβης DNA (π.χ. γ-H2AX, p53,

και ATM) ως βιοδείκτες της άμεσης έκθεσης σε ακτινοβολία σε βιολογικά δείγματα είναι περιορισμένη λόγω διαφόρων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του παροδικού χαρακτήρα του σχηματισμού εστιών, της έλλειψη εξειδίκευσης για την ακτινοβολία, και της διακύμανσης των συχνοτήτων εμφάνισης εστιών μεταξύ ατόμων. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, αυτοί οι βιοδείκτες έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύσουν με αυξημένη ευαισθησία σε ακτινοβολίες χαμηλής δόσης εάν τα δείγματα συλλεχθούν σε πολλαπλά χρονικά σημεία εντός των κατάλληλων χρονικών παραθύρων.



Σχήμα 4.3.: Φωτομικρογραφίες πυρηνικών εστιών foci σε κύτταρα δείγματος control και ακτινοβολημένου με δόση ακτινοβολίας 2 Gy ανιχνευμένων μετά από μαρκάρισμα τους με αντισώματα (φωτογραφίες στα αριστερά). Στις φωτογραφίες στα δεξιά φαίνονται τα κύτταρα μαρκαρισμένα με DAPI (nuclear stain 4,6-diamidino-2-phenylindole) για τον εντοπισμό της θέσης του πυρήνα. Όπως φαίνεται στο control δείγμα είναι ελάχιστες οι εστίες καθώς δεν υπάρχουν πολλά DSBs συγκριτικά με το ακτινοβολημένο δείγμα.

(24) (25) (26) (2)

4.4. Μέθοδοι GTG-ζώνωσης και φθορισμού in situ υβριδισμού (Fluorescence in situ hybridization assay /FISH)

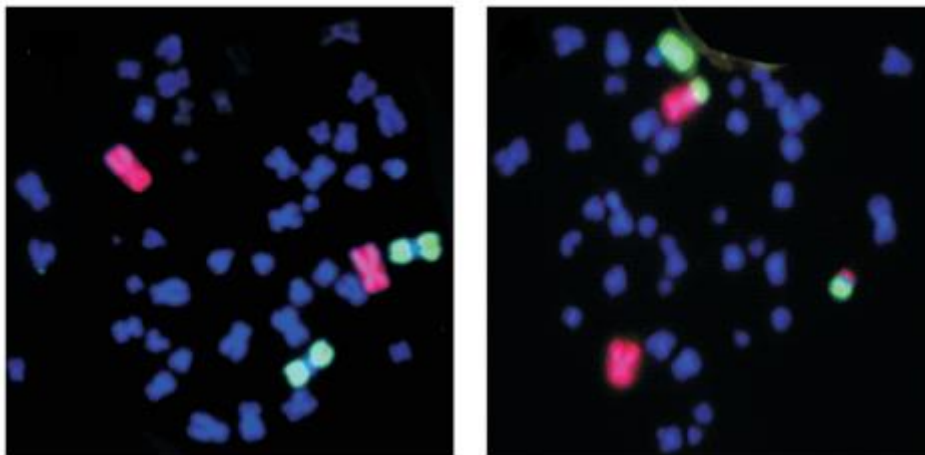
Υπάρχει μεγάλη αβεβαιότητα στην δοσιμετρία παλαιότερων εκθέσεων καθώς οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις που είναι αποτέλεσμα ακτινοβόλησης (δικεντρικά, δακτύλιοι, διαγραφές) είναι ασταθής με χρόνο ημιζωής 1-3 χρόνια και εξαρτώνται από τις συνθήκες έκθεσης. Κατά συνέπεια, η ανάλυση σταθερών χρωμοσωμικών αλλοιώσεων, όπως οι αμοιβαίες χρωμοσωμικές μετατοπίσεις, αποτελεί περισσότερο αξιόπιστη πρακτική η οποία γίνεται με την μέθοδο της GTG ζωνοποίησης και την μέθοδο FISH.

Στην μέθοδο της ζωνοποίησης τα χρωμοσώματα χωρίζονται σε 7 ομάδες, από Α έως G, 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 πραγματοποιείται GTG-ζώνωση χρωμοσωμάτων με τη βοήθεια ενός ενζύμου τη τρυψίνης και χρώση Giemsa.

Η μέθοδος της GTG ζωνοποίησης είναι χρονοβόρα και απαιτεί αρκετά έμπειρους αναλυτές.

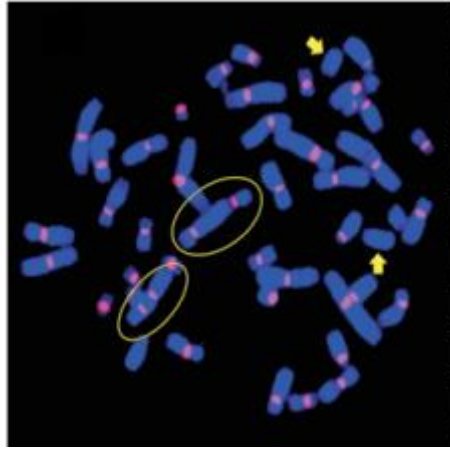
Με την μέθοδο FISH γίνεται χρώση ολόκληρων χρωμοσωμάτων με αποτέλεσμα ο εντοπισμός των μετατοπίσεων να γίνεται εύκολα ενώ ταυτόχρονα η μέθοδος χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση γεγονότων σε σύγκριση με αυτή της GTG ζωνοποίησης.

Στις εικόνες τους σχήματος 3.4 φαίνονται ως δίχρωμες δομές οι μετατοπίσεις μεταξύ μαρκαρισμένων και μη μαρκαρισμένων χρωμοσωμάτων.



Σχήμα 4.4.: Εικόνες FISH από μικροσκόπιο φθορισμού. Στα αριστερά φαίνεται μια μετάφαση στην οποία υπάρχουν μαρκαρισμένα δύο ζεύγη χρωμοσωμάτων 1 και 2 με κόκκινο και πράσινο probe αντίστοιχα. Δεξιά φαίνεται η μετάφαση με αμοιβαία μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 1 και 2.

Η τεχνική FISH μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την οπτικοποίηση και ανάλυση των δικεντρικών με χρώση των κεντρομεριδίων με κατάλληλους probes (ιχνηθέτες) όπως φαίνεται και στην εικόνα του σχήματος 4.5.



Σχήμα 4.5.: Εικόνα FISH από μικροσκόπιο φθορισμού. Φαίνεται μια μετάφαση στην οποία έχει γίνει βαφή των κεντρομεριδίων για την ανίχνευση των δικεντρικών χρωμοσώματων.

(27) (14)

4.5. Μέθοδος πρόωρης χρωμοσωμικής συμπύκνωσης (Premature Chromosome Condensation/PCC)

Πρόκειται για μέθοδο τεχνητής πρόωρης συμπύκνωσης των χρωμοσωμάτων στην μετάφαση η οποία χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις εκθέσεων σε υψηλές δόσεις κατά τις οποίες τα κύτταρα είναι δύσκολο να “συλληφθούν” στην μετάφαση εξαιτίας της διακοπής του κυτταρικού κύκλου στο σημείο G_2/M .

Υπάρχουν δύο τρόποι πρόκλησης της πρόωρης χρωμοσωμικής συμπύκνωσης:

- Πρόωρη χρωμοσωμική συμπύκνωση προκαλούμενη από φάρμακα με χημικές ουσίες όπως η Calyculin-A και Οκαδαϊκό οξύ. Τα φάρμακα αυτά χρησιμοποιούνται για την πρόκληση συμπύκνωσης σε κύτταρα συνελήφθησαν στη φάση G_2 επιτρέποντάς τους να εισέλθουν πρόωρα σε μίτωση.
- Πρόωρη χρωμοσωμική συμπύκνωση προκαλούμενη από σύντηξη κατά την οποία η συμπύκνωση προκαλείται τεχνητά στην φάση G_0 με την μεταφορά χημικών παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για την χρωμοσωμική συμπύκνωση στα κύτταρα μέσω της σύντηξης τους με μιτωτικά κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται σύντηξη των κυττάρων του αίματος του οργανισμού που θέλουμε να εφαρμόσουμε την μέθοδο με μιτωτικά κύτταρα, για παράδειγμα κύτταρα χάμστερ, όπου έχουν καλλιεργηθεί και βρίσκονται στην μετάφαση με συνέπεια να διατηρούν παράγοντες χρωμοσωμικής συμπύκνωσης. Η διαδικασία της σύντηξης και η συμπύκνωσης διαρκεί περίπου 3 ώρες και η εκτίμηση της δόσης γίνεται γρήγορα με ανάλυση των χρωμοσωματικών θραυσμάτων. Επιπλέον, η μέθοδος μπορεί να συνδυαστεί με την μέθοδο FISH. Σε αυτή την περίπτωση η ποσοτικοποίηση της δόσης βασίζεται σε πολλά end points όπως ύπαρξη δικεντρικών χρωμοσωμάτων και μετατοπίσεων.

Κεφάλαιο 5: Πειραματική διαδικασία

5.1. Μελέτη επίδρασης χαμηλής δόσης γ ακτινοβολίας με την μέθοδο αναστολής της κυτταροκίνησης-Μέθοδος μικροπυρήνων (CBMN)

Το πρώτο σκέλος της παρούσας διπλωματικής αφορά την μελέτη της επίδρασης των χαμηλών δόσεων σε βιολογικά συστήματα με την εφαρμογή της μεθόδου αναστολής της κυτταροκίνησης για πέντε υγειής δότες. Τα υλικά και αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου είναι τα εξής:

- Φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA)
- Κυτοχალασίνη-B (Cytochalasin-B)
- Θρεπτικό υλικό RPMI 1640
- Εμβρυϊκός ορός μόσχου FBS
- Διάλυμα πενικιλίνης – στρεπτομυκίνης
- Διάλυμα L-γλουταμίνης
- Χλωριούχο κάλιο σε σκόνη
- Μεθανόλη
- Οξικό οξύ
- Χλωριούχο νάτριο
- Απεσταγμένο νερό
- Διάλυμα χρώσης χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων Giemsa
- Ρυθμιστικό διάλυμα Sorensen
- Πιπέττες
- Δοκιμαστικοί σωλήνες από πολυστυρένιο
- Φλάσκες με φίλτρο
- Πιπέττες Pasteur μιας χρήσης
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Διηθητικό χαρτί
- Ακρορύγχια πιπετών μιας χρήσης τύπου Gilson (yellow tips, 1-200 μl)
- Ακρορύγχια πιπετών μιας χρήσης τύπου Gilson (blue tips, 100-1000 μl)
- Καλυπτρίδες
- Δοχείο χρώσης με ειδικές υποδοχές για τις αντικειμενοφόρες πλάκες
- Υλικό επικόλλησης καλυπτρίδων Entellan

Τα χημικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της εφαρμογής του πρωτοκόλλου που ακολουθήσαμε είναι το πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI 1640, το υπότονο διάλυμα KCl 0,14 M και οι δύο μονιμοποιητές fixative 1 και fixative 2. Σύνομη περιγραφή της παρασκευής τους ακολουθεί στην συνέχεια.

- Πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640

Για την παρασκευή 500 ml πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640 χρησιμοποιούνται 400 ml θρεπτικού υλικού RPMI 1640, 50 ml εμβρυϊκού ορού μόσχου FBS ως μέσο καλλιέργειας, 5 ml L-Γλουταμίνης η οποία δρα βοηθητικά στον διπλασιασμό του DNA κατά τη φάση της σύνθεσης (S φάση), και 5 ml πενικιλίνης – στρεπτομυκίνης όπου δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη μικροοργανισμών.

- Υπότονο διάλυμα KCl 0.14 M

Για την παρασκευή 150 ml υπότονου διαλύματος KCl 0.14 M, σε 150 ml απεσταγμένου νερού διαλύονται 1,56 g χλωριούχου καλίου και πραγματοποιείται καλή ανάμειξη.

- Μονιμοποιητής 1 (fixative 1)

Για την παρασκευή 100 ml μονιμοποιητή 1 αναμειγνύονται 42,86 ml μεθανόλης, 46,43 ml 0.9% Χλωριούχου νατρίου (NaCl) και 10.71 ml οξικού οξέος.

- Μονιμοποιητής 2 (fixative 2)

Για την παρασκευή του μονιμοποιητή 2 απαιτείται αναλογία μεθανόλης/οξικού οξέος 4:1 v/v, δηλαδή για 50 ml μονιμοποιητή 2 χρειάζονται 40 ml μεθανόλης και 10 ml οξικού οξέος.

Η μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης περιλαμβάνει την καλλιέργεια του αίματος, την μονιμοποίηση, την χρώση με Giemsa και τέλος την ανάλυση στο μικροσκόπιο και την καταγραφή των δεδομένων.

Αρχικά, γίνεται η λήψη του αίματος από τον δότη και στην συνέχεια ακολουθεί η ακτινοβόληση του με γ ακτινοβολία (πηγή ^{60}Co) με τις επιθυμητές δόσεις, στην περίπτωση μας 0,05 και 1 Gy. Στη συνέχεια, γίνεται σε χρονικό διάστημα μικρότερο των 15 λεπτών έναρξη των καλλιεργειών σε φλάσκες με φίλτρο (σχήμα 5.1). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε, για κάθε καλλιέργεια χρησιμοποιούνται 0.5 ml περιφερικού αίματος και 4,5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640. Επιπλέον, σε κάθε καλλιέργεια προστίθεται 100 μl φυτοαιμαγλουτινίνης (phytohemagglutinin-PHA) ώστε τα T-λεμφοκύτταρα από τη G0 φάση που βρίσκονται, να εισέλθουν στο κυτταρικό κύκλο. Οι φλάσκες καλλιέργειας τοποθετούνται στο κλίβανο για 72 ώρες.



Σχήμα 5.1.: Εικόνα κατά την προσθήκη 100 μ l PHA σε κάθε μία καλλιέργεια.

Μετά το πέρας 28 ωρών από την έναρξη των καλλιεργειών γίνεται προσθήκη 15 μ l κυτταροχάλασίνης-B (Cyt-B), η οποία αναστέλει την κυτταροκίνηση χωρίς να εμποδίζει την διαίρεση του πυρήνα, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να παραμείνουν στο διπύρρηνο στάδιο μέσα σε ένα ενιαίο κυτταρόπλασμα.

Οι καλλιέργειες ολοκληρώνονται 72 ώρες μετά την έναρξη τους. Οι φλάσκες εξέρχονται από τον κλίβανο και το περιεχόμενό τους μεταφέρεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι στην συνέχεια φυγοκεντρώνονται στις 900 στροφές/λεπτό για 10 min. Το επόμενο στάδιο είναι αυτό της μονιμοποίησης. Ακολουθεί ρίψη του υπερκείμενου κάθε δοκιμαστικού σωλήνα και εισαγωγή υπότονου διαλύματος KCl (0,14 M) σε αρκετά κλάσματα. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες φυγοκεντρώνονται για δεύτερη φορά στις 900 στροφές/λεπτό για 10 min και μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθεται σταδιακά ο μονιμοποιητής 1 (fixative 1). Ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρωση των καλλιεργειών στις 900 στροφές/λεπτό για 10 min και απόρριψη του υπερκείμενου. Στην συνέχεια, εισάγεται σταδιακά σε κάθε καλλιέργεια ο μονιμοποιητής 2 (fixative 2). Η διαδικασία εισαγωγής του μονιμοποιητή 2 (fixative 2) μπορεί να χρειαστεί να επαναληφθεί αν κριθεί το διάλυμα μη διαυγές.

Την παραπάνω διαδικασία ακολουθεί το στρώσιμο των κυττάρων σε υγρές αντικειμενοφόρες πλάκες (δύο σταγόνες ανά πλάκα). Για κάθε καλλιέργεια γίνεται μια πρώτη δοκιμαστική στρώση για τον έλεγχο της πυκνότητας στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης και ανάλογα με την όψη της πλάκας γίνεται αραιώση του διαλύματος με προσθήκη μια με δύο σταγόνων του διαλύματος fixative 2.

Μετά την ολοκλήρωση της τοποθέτησης των κυττάρων στις αντικειμενοφόρες πλάκες και το πέρας κάποιου χρονικού διαστήματος προκειμένου να στεγνώσουν ακολουθεί η διαδικασία της χρώσης τους. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται χρώση φωσφορισμού και Giemsa καθώς αυτό επιτρέπει την ανάλυση στο πρώτο στάδιο κυτταρικής διαίρεσης. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες μπαίνουν στο δοχείο που περιέχει τη χρωστική ουσία. Για αυτή τη διαδικασία προστίθεται SORENSEN μέχρι την οριακή γραμμή και εκχύνονται 2,5 ml χρωστικής ουσίας. Τα αντικειμενοφόρα πλακίδια παραμένουν βυθισμένα στο ειδικό δοχείο για 11-13 min. Κατόπιν, γίνεται έλεγχος της χρώσης στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης και αν είναι επαρκής οι πλάκες ξεπλένονται αρχικά σε νερό βρύσης και αμέσως μετά σε απεσταγμένο νερό, και αφήνονται να στεγνώσουν σε συνθήκες δωματίου. αφήνονται να στεγνώσουν. Για την προστασία των παρασκευασμάτων, γίνεται επικόλληση καλυπτρίδων με τη βοήθεια της κόλλας Entellan. πριν την παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

Για την ανάλυση των μικροπυρήνων χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο ZEISS Axioscope αρχικά σε μεγέθυνση x100 ή x200, ενώ η ακριβής ανάλυση με μεγέθυνση x1000 ή x2000. Η λήψη εικόνων μικροπυρήνων γίνεται με τη βοήθεια του υπολογιστικού συστήματος επεξεργασίας εικόνας IKAROS (Metasystems). Η ανάλυση των μικροπυρήνων βασίζεται στην εύρεση και καταμέτρηση των διπύρηνων κυττάρων που περιέχουν μικροπυρήνες, σύμφωνα με τα κριτήρια μέτρησης και καταγραφής του δημοσιευμένου πρωτόκολλου του Fenech για ένα σύνολο 1000 διπύρηνων κυττάρων.

5.2. Ανάλυση βλαβών DSBs με την μέθοδο της φωσφορυλιωμένης ιστονικής πρωτεΐνης H2AX (γ-H2AX/foci)

Το δεύτερο τμήμα της εργασίας αφορά την διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των επιδιορθωτικών μηχανισμών στην αντιμετώπιση βλαβών επαγόμενων από ακτινοβολία χαμηλών δόσεων για τα πέντε δείγματα των υγείων δοτών. Πιο συγκεκριμένα, σκοπός είναι η εξέταση των επιπέδων των DSBs 24 ώρες μετά την έκθεση σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας. Όπως αναφέραμε και στην ενότητα 4.3 η ανίχνευση DSBs των γίνεται έμμεσα μέσω της καταμέτρησης γ-H2AX εστιών (foci), δηλαδή ιστονικών πρωτεϊνών H2AX που έχουν φωσφορυλιωθεί ως αντίδραση στην αναγνώριση δίκλωνων θραύσεων.

Τα υλικά και αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου είναι τα εξής:

- Φικόλη
- Θρεπτικό υλικό RPMI 1640 - w 2.2g/l NaHCO₃, w/o L-Glutamine (Biochrom AG, Germany)
- Εμβρυϊκός ορός μόσχου FBS (Foetal Bovine Serum)
- Διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης
- Διάλυμα L-γλουταμίνης
- Χλωριούχο κάλιο KCl σε σκόνη MW: 74,56g/mol
- Διάλυμα φορμαλδεΐδης 4%
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS (Phosphate Buffered Saline Dulbecco)
- Διάλυμα Tris-HCl (pH 7,4, 1 M)
- Διάλυμα EDTA (0,5 M)
- Διάλυμα Triton TM X-100
- Σκόνη BSA (Bovine Serum Albumin)

- Πρωτεύον αντίσωμα gamma H2AX
- Δευτερεύον αντίσωμα Rhodamine Red-X Goat 0.5 ml
- Αιθανόλη 100% MW: 46,07g/mol
- Διαφανές βερνίκι νυχιών
- Απεσταγμένο νερό
- Φθοριόχρωμα αντίχρωσης 2,6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη DAPI
- Πιπέττες (Gilson, France)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες από πολυστυρένιο (14ml)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Σωληνάρια κωνικά τύπου Eppendorf (1,5 ml)
- Διηθητικό χαρτί
- Ακρορύγχια πιπετών μιας χρήσης τύπου Gilson (yellow tips, 1-200 μl)
- Ακρορύγχια πιπετών μιας χρήσης τύπου Gilson (blue tips, 100-1000 μl)
- Φιαλίδιο με ειδικές θήκες για τις αντικειμενοφόρες πλάκες (jar)
- Υδρόφοβο στυλό
- Καλυπτρίδες

Τα χημικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της εφαρμογής του πρωτοκόλλου που ακολουθήσαμε είναι το πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI 1640, υπότονο διάλυμα KCl 0,75 M, διάλυμα Triton X 1%, P-Solution, Blocking solution (PBG), αραιωμένο πρωτεύον αντίσωμα γ-H2AX και αραιωμένο δευτερεύον αντίσωμα Rhodamine red-X Goat. Σύντομη περιγραφή της παρασκευής τους ακολουθεί στην συνέχεια.

- Πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640

Για την παρασκευή 500 ml πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640 χρησιμοποιούνται 400 ml θρεπτικού υλικού RPMI 1640, 50 ml εμβρυϊκού ορού μόσχου FBS ως μέσο καλλιέργειας, 5 ml L-Γλουταμίνης η οποία δρα βοηθητικά στον διπλασιασμό του DNA κατά τη φάση της σύνθεσης (S φάση), και 5 ml πενικιλίνης – στρεπτομυκίνης όπου δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη μικροοργανισμών.

- Υπότονο διάλυμα KCl 0,75 M

Για την παρασκευή 1000 ml υπότονου διαλύματος KCl 0,75 M, σε 1000 ml απεσταγμένου νερού διαλύονται 5,6 g χλωριούχου καλίου και πραγματοποιείται καλή ανάμειξη.

- Διάλυμα Triton X 1%

Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος Triton X 1%, χρησιμοποιούνται 1 ml διαλύματος Triton TM X-100 και 99 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται ανάμειξη σε μαγνητικό αναδευτήρα.

- P-Solution

Για την παρασκευή 500 ml P-Solution χρησιμοποιούνται 50 ml 1M Tris-HCl (pH 7,4), 50 ml 0,5 M EDTA και 400 ml απεσταγμένο νερό.

- Blocking solution (PBG)

Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος Blocking solution (PBG), διαλύονται 10 gr σκόνης BSA σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS, και στην συνέχεια προστίθενται στη 6 ml διαλύματος FBS και 2 ml διαλύματος Triton-X 1%.

- Αραιωμένο πρωτεΐον αντίσωμα γ -H2AX [pSer139] Antibody (EP854(2)Y) σε 1/1000

Προκύπτει με την αραιώση 1 ml πρωτεΐοντος αντισώματος σε 1 ml διαλύματος blocking.

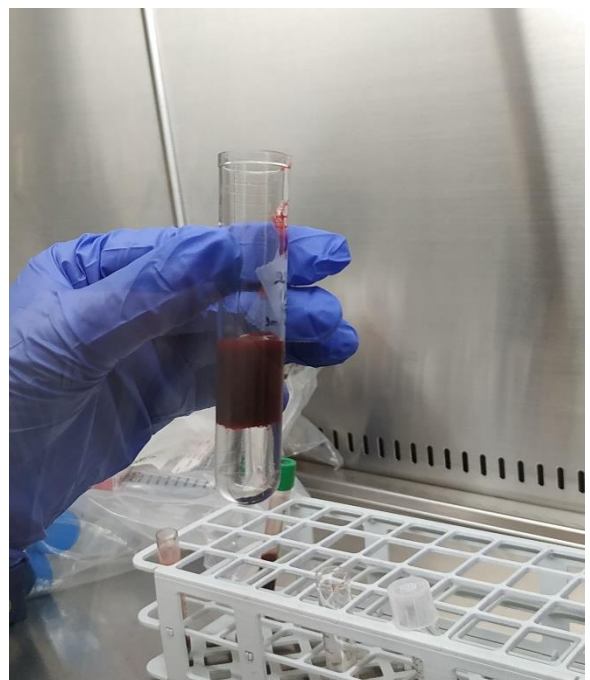
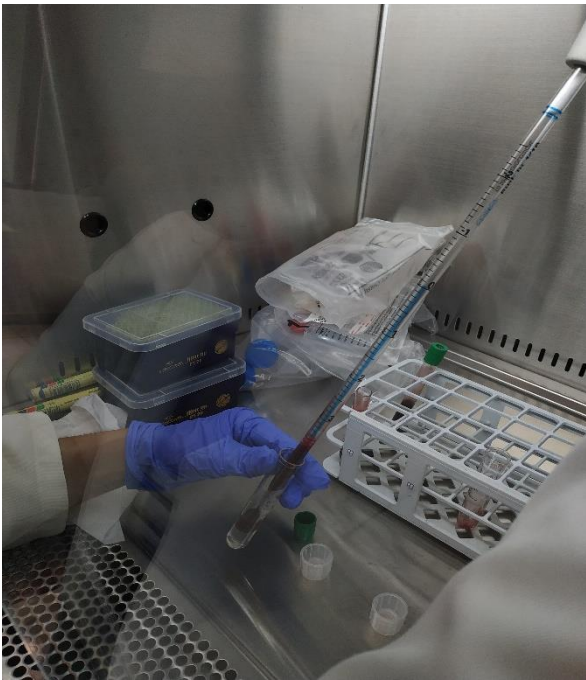
- Αραιωμένο δευτερεύον αντίσωμα Rhodamine red-X Goat σε 1/4000

Προκύπτει με την αραιώση 1 ml δευτερεύοντος αντισώματος σε 4 ml διαλύματος blocking.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει απομόνωση λεμφοκυττάρων, μονιμοποίηση, χρήση ειδικών αντισωμάτων, εναπόθεση ανοσοφθοριζουσών ουσιών και ανίχνευση γ -H2AX εστιών στο μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού.

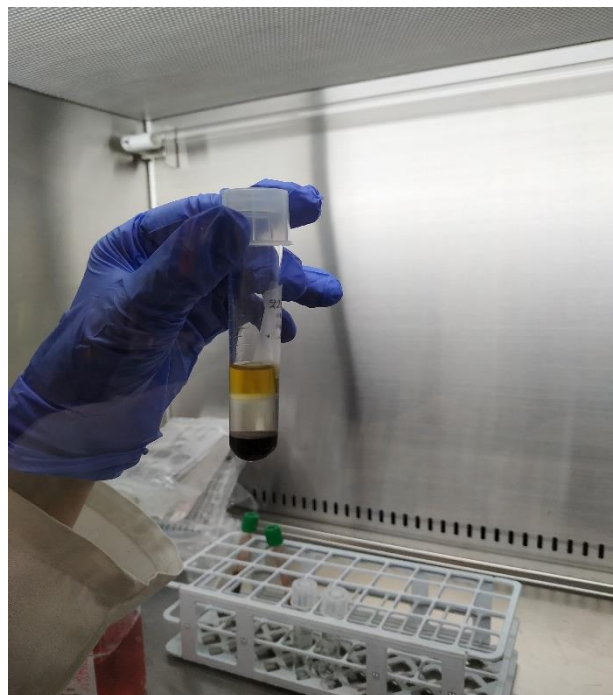
Μετά την λήψη των δειγμάτων και την ακτινοβολήση τους με την επιθυμητή δόση με πηγή ^{60}Co , στην περίπτωση μας 0,05 Gy, απομονώνονται από το περιφερικό αίμα τα λεμφοκύτταρα τα οποία στην συνέχεια υφίστανται την κατάλληλη επεξεργασία ανοσοφθορισμού.

Η απομόνωση των λεμφοκυττάρων γίνεται με τη μέθοδο καθίζησης σε φικόλη. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα εγχέονται 2,5 ml φικόλης. Στην συνέχεια, εισάγεται σταδιακά το αίμα με την βοήθεια πιπέτας ώστε να μην βυθιστεί (σχήμα 5.2). Η αναλογία φικόλης-αίματος είναι 1:1. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 1850 στροφές/λεπτό για 30 min σε πρόγραμμα επιτάχυνσης/επιβράδυνσης 1:1.



Σχήμα 5.2 : Εικόνες από την διαδικασία απομόνωσης των λεμφοκυττάρων με την χρήση φικόλης. Γίνεται σταδιακή εισαγωγή του αίματος με την βοήθεια πιπέτας ώστε να μην βυθιστεί.

Παράλληλα με την φυγοκέντριση γίνεται προετοιμασία νέων δοκιμαστικών σωλήνων στο εσωτερικό των οποίων τοποθετούνται 4 ml πλήρες θρεπτικού υλικού RPMI-1640. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρισης ακολουθεί απομόνωση της ενδιάμεσης υπόλευκης περιοχής στην οποία περιέχονται τα λεμφοκύτταρα και τοποθέτηση τους στους δοκιμαστικούς σωλήνες με το θρεπτικό υλικό (σχήμα 5.3).



Σχήμα 5.3: Εικόνα του δοκιμαστικού σωλήνα μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρισης στην οποία φαίνεται ο

διαχωρισμός των τριών στοιβάδων (η ενδιάμεση υπόλευκη περιοχή περιέχει τα λεμφοκύτταρα).

Ακολουθεί νέα φυγοκέντριση στις 1500 στροφές/λεπτό για 15 min προκειμένου να γίνει έκπλυση των λεμφοκυττάρων με το πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640.

Μετά το πέρας της φυγοκέντρισης και της ρήψης του υπερκείμενου από το εσωτερικό των δοκιμαστικών σωλήνων σταδιακά εισάγεται περίπου 1 ml KCL (0,75 M) ενώ παράλληλα γίνεται «σπάσιμο». Το υπότονο διάλυμα προστίθενται προκειμένου να γίνει διόγκωση των κυττάρων λόγω του φαινομένου της ώσμωσης καθώς για να εξισορροπηθεί η προκύπτουσα διαφορά στις ωσμωτικές πιέσεις, το κύτταρο προσλαμβάνει νερό μέσω της ημιδιαπερατής του μεμβράνης.

Ακολουθεί επίστρωση των λεμφοκυττάρων σε αντικειμενοφόρες πλάκες με τη βοήθεια της ειδικής διάταξης cytospin (σχήμα 5.4), στην οποία εισάγεται μικρή ποσότητα από το διάλυμα λεμφοκυττάρων-υπότονου (περίπου 120 μl) σε μία περιορισμένη περιοχή. Η προσκόληση των λεμφοκυττάρων στις αντικειμενοφόρες πλάκες επιτυγχάνεται με φυγοκέντρηση στις 800 στροφές/λεπτό για 4 min σε πρόγραμμα επιτάχυνσης/επιβράδυνσης 1:1. Γίνεται έλεγχος της πυκνότητας των κυττάρων στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης και στην περίπτωση που χρειάζεται αραιώση με τοποθέτηση 100 μl KCL (0,75 M), σπάσιμο, στρώσιμο και εκ νέου φυγοκέντρηση των νέων αντικειμενοφόρων πλακών στην διάταξη cytospin.

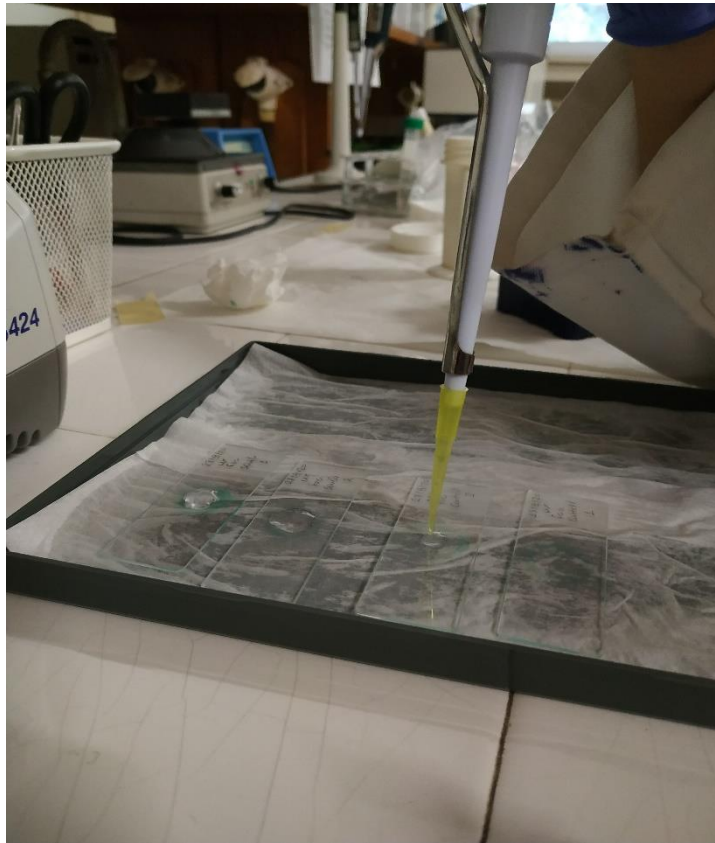


Σχήμα 5.4.: Εικόνα των θηκών στις οποίες τοποθετούνται τα πλακίδια για φυγοκέντριση στην διάταξη cytospin.

Η μονιμοποίηση των κυττάρων στις πλάκες γίνεται με την βύθιση τους σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 4% μέσα στο φιαλίδιο που διαθέτει ειδικές θήκες για την σταθερή τοποθέτησή τους (jar) σε θερμοκρασία δωματίου. Η βύθιση διαρκεί 20 min και έπειτα ξεπλένονται 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS. Η διαδικασία της έκπλυσης που ακολουθείται είναι ίδια και

περιλαμβάνει την βύθιση των πλακών σε φιαλίδιο (jar) που περιέχει PBS και τοποθέτηση αυτού πάνω στον αναδευτήρα orbital shaker διαρκεί περίπου 5 min στις 60 στροφές. Μετά από κάθε έκπλυση, το PBS ανανεώνεται. Μετά το ξέπλυμα, ακολουθεί βύθιση των πλακών σε φιαλίδιο που διαθέτει ειδικές θήκες για την σταθερή τοποθέτηση τους (jar) στο οποίο περιέχονται 50 ml P-Solution και 250 µl TritonX 1 %, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το Triton-X σε μικρές συγκεντρώσεις δρα ως «σαπούνι», ενώ σε μεγάλες δημιουργεί «τρύπες» στις κυτταρικές μεμβράνες και τις καθιστά διαπερατές. Ακολουθούν τρία ξεπλύματα με PBS και βύθιση των πλακών σε φιαλίδιο με Blocking solution (PBG), ένα διάλυμα το οποίο αποτρέπει τη μη-ειδική πρόσδεση του αντισώματος, μέχρι την επόμενη μέρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Την δεύτερη μέρα του πειράματος, με το υδρόφοβο στυλό (Liquid Blocker super rap pen) δημιουργούνται κυκλικές περιοχές στα πλακίδια, η οποίες περικλείουν την περιοχή που βρίσκονται προσκολλημένα και μονιμοποιημένα τα κύτταρα, και μέσα σε αυτές εγχέονται περίπου 100 µl από το αραιωμένο πρωτεΐον αντίσωμα γ -H2AX (σχήμα 5.5). Τα πλακίδια τοποθετούνται πάνω σε βρεγμένο διηθητικό χαρτί με απεσταγμένο νερό, προκειμένου να εξασφαλιστούν συνθήκες υγρασίας, καλύπτονται και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για μιάμιση ώρα.



Σχήμα 5.5.: Εικόνα κατά την έγχυση περίπου 100 µl από το αραιωμένο πρωτεΐον αντίσωμα γ -H2AX στο εσωτερικό των κυκλικών περιοχών που σχηματίστηκαν με το υδρόφοβο στυλό.

Ακολουθεί απομάκρυνση των σταγόνων αραιωμένου πρωτεΐοντος αντισώματος από τα πλακίδια ενώ στην συνέχεια γίνονται τρεις πλύσεις με PBS με χρονική διάρκεια 5 min/ξέπλυμα σε ρύθμιση 60 στροφών. Έπεται η εισαγωγή περίπου 100 µl του δευτερεύοντος αντισώματος ροδαμίνης και αφήνεται να δράσει για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Είναι πολύ σημαντικό τα πλακίδια να είναι καλυμμένα και προστατευμένα από το φως, όπως επίσης και ο δοκιμαστικός σωλήνας που

περιέχει το αραιωμένο δευτερεύον αντίσωμα, καθώς το δευτερεύον αντίσωμα χαρακτηρίζεται από φωτοευαισθησία γι' αυτό και η εφαρμογή του καθώς και οι επόμενοι χειρισμοί πρέπει να γίνονται σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού.

Το επόμενο βήμα είναι η απομάκρυνση των σταγόνων αραιωμένου δευτερεύοντος αντισώματος από τα πλακίδια και η έκπλυση τους με PBS για χρονική διάρκεια 5 min/ξέπλυμα σε ρύθμιση 60 στροφών. Η έκπλυση και σε αυτό το σημείο επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Τα πλακίδια αφήνονται να στεγνώσουν και στην συνέχεια σε κάθε ένα από αυτά εφαρμόζονται 20-30 μl του φθοριοχρώματος αντίχρωσης 2,6-διαμινο-2-φαινυλινδόλη DAPI. Πρόκειται για έναν πυρηνικό ιχνηθέτη που δεσμεύεται ισχυρά στις A-T πλούσιες περιοχές του κυτταρικού DNA.

Τέλος, πραγματοποιείται σφράγισμα των πλακών με καλυπτρίδες 22 x 22 mm οι οποίες στερεοποιούνται περιφερειακά με διάφανο βερνίκι.

Είναι πολύ σημαντικό η φύλαξη των πλακιδίων να γίνεται σε συνθήκες ψύξης και σκότους. Η ανάλυση τους περιλαμβάνει καταμέτρηση 200 κυττάρων σε μικροσκόπιο φθορισμού.

5.3. Ανάλυση ανευπλοειδικών κυττάρων με συνδυασμό της μεθόδου των μικροπυρήνων και της μεθόδου φθορισμού *in situ* υβριδισμού (CBMN i-FISH)

Το τελευταίο μέρος της διπλωματικής αφορά την μελέτη της γενωμικής αστάθειας μέσω της ανίχνευσης ανευπλοειδίας μετά από έκθεση σε χαμηλή δόση ακτινοβολίας για δύο δείγματα υγείων δοτών. Η μελέτη της γενωμικής αστάθειας γίνεται μέσω της ανάλυσης ανευπλοειδικών κυττάρων με την εφαρμογή συνδυασμού της μεθόδου μικροπυρήνων (CBMN) και της μεθόδου που φθορισμού *in situ* υβριδισμού (FISH).

Η μέθοδος περιλαμβάνει απομόνωση λεμφοκυττάρων, μονιμοποίηση, χρήση κεντρομεριδιακών ιχνηθετών (probes) που λειτουργούν ως μαγνήτες και επικάθονται στο κεντρομερίδιο του επιθυμητού χρωμοσώματος και χρώση με DAPI.

Τα υλικά και αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν, επιπρόσθετα αυτών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εφαρμογή της μεθόδου CBMN όπως περιγράφονται στην ενότητα (5.1), για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου είναι τα εξής:

- Χλωριούχο νάτριο
- Κιτρικό νάτριο
- Υδροχλωρικό οξύ
- Tween 20
- Κόλλα ελαστικού Fixogum Rubber Cement
- Ιχνηθέτης 1 : Vysis CEP 15 SpectrumRed Probe (πράσινο σήμα)
- Ιχνηθέτης 2 : Vysis CEP 6 SpectrumGreen Probe (πράσινο σήμα)
- Μεθανόλη
- Οξικό οξύ
- Φθοριόχρωμα αντίχρωσης 2,6-διαμινο-2-φαινυλινδόλη DAPI
- Απεσταγμένο νερό
- Αποστειρωμένες γυάλινες πιπέττες μίας χρήσεως των 10, 5 και 2 ml
- Σωληνάρια κωνικά τύπου Eppendorf (1.5 ml)
- Σωληνάρια κωνικά τύπου Eppendorf (1.5 ml)
- Πιπέττες
- Ακρορύγχια πιπετών μιας χρήσης τύπου Gilson (yellow tips, 1-200 μl)

- Ακρορύγχια πιπετών μιας χρήσης τύπου Gilson (blue tips, 100-1000 μl)
- Πιπέττες Pasteur μιας χρήσης
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Καλυπτρίδες διαστάσεων 22 x 22 mm και 24 x 50 mm
- Ογκομετρικοί κύλινδρο

Τα χημικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, επιπρόσθετα αυτών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εφαρμογή της μεθόδου CBMN όπως περιγράφονται στην ενότητα (5.1), στα πλαίσια της εφαρμογής του πρωτοκόλλου που ακολουθήσαμε είναι το διάλυμα 20xSSC (3M χλωριούχου νατρίου, 0.3M κιτρικού νατρίου, pH 5.3), διάλυμα 2xSSC 0,005% Tween 20, διάλυμα 0,4xSSC, διάλυμα ιχθυέτη Vysis και διάλυμα ιχθυέτη Cytocell. Σύνομη περιγραφή της παρασκευής τους ακολουθεί στην συνέχεια.

- Διάλυμα 20xSSC (3M χλωριούχου νατρίου, 0.3M κιτρικού νατρίου, pH 5.3)

Για την παρασκευή 1 L διαλύματος αναμυγνούνται 88,2 gr Tri-Natrium citrate-2H₂O σε σκόνη (C₆H₅Na₃O₇-2H₂O, MW: 294.10 g/mol), 175,3 gr χλωριούχου νατρίου (NaCl) και απεσταγμένου νερού έως ότου ο συνολικός όγκος να γίνει 1 L.

- Διάλυμα 2xSSC 0,05% Tween 20

Για την παρασκευή 50 ml διαλύματος αραιώνονται 5ml του διαλύματος 20x SSC σε 45ml απεσταγμένου νερού (pH 8.3) και προστίθενται 2,5 ml Tween 20. Ακολουθεί πολύ καλή ανάμειξη του μείγματος με την χρήση μαγνητικού αναδευτήρα.

- Διάλυμα 0,4xSSC

Για την παρασκευή 50 ml διαλύματος αραιώνεται 1 ml του διαλύματος 20xSSC σε 49ml απεσταγμένου νερού.

- Διάλυμα ιχθυέτη Vysis

Για την παρασκευή 10 ml διαλύματος αναμειγνύονται και αναδεύονται σε ependorf 3 ml probe και 7 ml hybridization buffer.

- Διάλυμα ιχθυέτη Cytocell

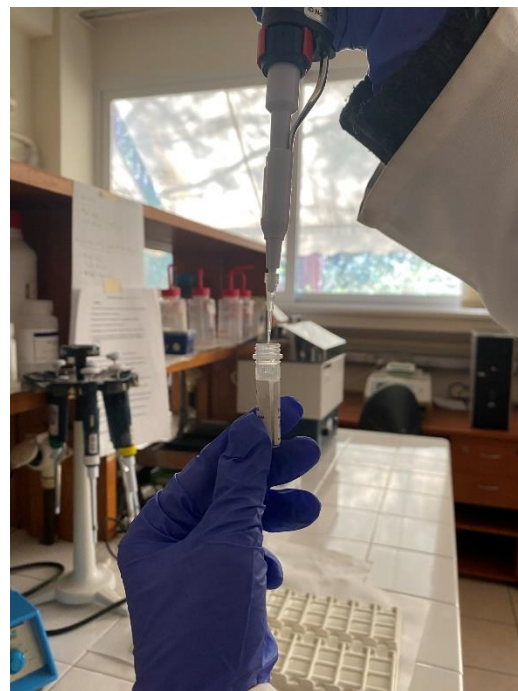
Για την παρασκευή 10 ml διαλύματος αναμειγνύονται και αναδεύονται σε ependorf 2 ml probe, 2 ml απεσταγμένο νερού και 6 ml hybridization buffer.

Για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου CBMN i-FISH, σε πρώτο χρόνο ακολουθείται κατά γράμμα το πρωτόκολλο της μεθόδου αναστολής της κυτταροκίνησης, όπως περιγράψαμε αναλυτικά στην ενότητα 5.1. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται λήψη του αίματος από τον δότη και στην συνέχεια ακτινοβολήση του σε πηγή ⁶⁰Co με την επιθυμητή δόση, στην περίπτωση μας με 0,05 και 2 Gy και

ακολουθώς εκτελούνται κατά γράμμα τα βήματα της μεθόδου αναστολής της κυτταροκίνησης. Στόχος μας ήταν να εξετάσουμε την συχνότητα των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων σε διαφορετικά χρονικά σημεία του κυτταρικού κύκλου και τον λόγο αυτό εξετάσαμε δύο διαφορετικούς χρόνους προσθήκης κυτταροχλασίνης-B. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε δόση πραγματοποιήθηκαν δύο καλλιέργειες όπου η πρώτη έληξε στις 72 ώρες και η κυτταροχλασίνη-B προστέθηκε στις 44 ώρες ενώ η δεύτερη έληξε στις 96 ώρες και η κυτταροχλασίνη-B προστέθηκε στις 72 ώρες.

Το πρωτόκολλο CBMN i-FISH διαφοροποιείται από το πρωτόκολλο της μεθόδου αναστολής της κυτταροκίνησης στο σημείο της στρώσης των αντικειμενοφόρων πλακών, όπου εναποτίθεται μια σταγόνα μόνο στο κέντρο κάθε πλάκας.

Στη συνέχεια, ξεκινά η προετοιμασία των ιχνηθετών. Οι probes που χρησιμοποιήσαμε ήταν κατασκευασμένοι από τις εταιρείες Cytocell και Visis και για την παρασκευή του διαλύματος που περιέχει τον κάθε probe ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της κάθε εταιρείας. Οι ιχνηθέτες και των δύο εταιριών περιλαμβάνουν ήδη το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) (σχήμα 5.6).



Σχήμα 5.6.: Εικόνα ιχνηθετών για διαφορετικά χρωμοσώματα (αριστερά) και εικόνα από την λήψη του ιχνηθέτη (δεξιά).

Στο κάθε στεγνό πλακάκι και σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού, επιστρώνονται 10 μl διαλύματος ιχνηθέτη (χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε τους ιχνηθέτες 1 και 1) στη περιοχή υβριδισμού (περιοχή της σταγόνας).

Ακολουθεί κάλυψη των περιοχών υβριδισμού με την καλυπτρίδα διαστάσεων 22 x 22 mm και στεγανοποίηση των αντικειμενοφόρων πλακών με προσθήκη κόλλας ελαστικού (Cement glue) περιφερικά κάθε καλυπτρίδας.

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται στην ειδική επωαστική συσκευή Thermobridge στο πρόγραμμα Common 2 (2 min, 75°C, overnight) σε περιβάλλον υγρασίας. Με την ρύθμιση αυτή επιτυγχάνεται ταυτόχρονη αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων του γενωμικού DNA και των μοριακών ιχνηθετών σε θερμοκρασία 75°C για τα πρώτα 2 min και υβριδισμός των

συμπληρωματικών μορίων DNA (ιχνηθέτη και DNA στόχου) στους 37°C για περίπου 16 ώρες (overnight). Στο πρώτο στάδιο της αποδιάταξης πραγματοποιείται ο πλήρης αποχωρισμός των δύο αλυσίδων του DNA έτσι ώστε να μπορέσουν να εισχωρήσουν οι μοριακοί ιχνηθέτες και να προσκολληθούν στον αντίστοιχο κεντρομερίδιο.

Την δεύτερη μέρα του πειράματος οι αντικειμενοφόρες πλάκες απομακρύνονται από την συσκευή επώασης Thermobrite και αφαιρείται προσεκτικά η κόλλα ελαστικού αλλά και η καλυπτρίδα με τη βοήθεια λεπτής λαβίδας, σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού.

Μετά την ολοκλήρωση της παραπάνω διαδικασίας γίνεται βύθιση των αντικειμενοφόρων πλακών σε διάλυμα 0,4xSSC σε θερμοκρασία 72°C για 2 λεπτά προκειμένου να γίνουν διαπερατές οι κυτταρικές μεμβράνες. Στην συνέχεια, οι πλάκες βυθίζονται για 30 δευτερόλεπτα σε διάλυμα 2xSSC, 0,05%. Οι εκπλύσεις στα συγκεκριμένα διαλύματα βοηθούν στην αποφυγή της λήψης μη ειδικών σημάτων.

Τα πλακίδια αφήνονται να στεγνώσουν σε σκοτεινό περιβάλλον και στη συνέχεια, προστίθενται 35μl χρωστικής αντίχρωσης DAPI σε κάθε περιοχή υβριδισμού.

Τέλος, σφραγίζονται με την μεγάλη καλυπτρίδα διαστάσεων 24 x 50 mm.

Η ανάλυση των πλακιδίων, μετά το πέρας τουλάχιστον 30 min, γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού, όπου καταμετρούνται 1000 διπύρρηνα λεμφοκύτταρα.

Σε φυσιολογικά διπύρρηνα κύτταρα κάθε ιχνηθέτης πρέπει να παράγει ένα σήμα για κάθε αντίγραφο της αλληλουχίας στόχου του. Συνεπώς, από τον υβριδισμό του ιχνηθέτη 1 και ιχνηθέτη 2 αναμένεται να ληφθούν τέσσερα πράσινου χρώματος σήματα στα κύτταρα με δύο φυσιολογικά αντίγραφα των χρωμοσωμάτων 6 και 15.

Κάθε άλλη περίπτωση περίσσειας ή απώλειας σήματος ενός ιχνηθέτη σε κάποιο πυρήνα υποδεικνύει την προσθήκη ή την απώλεια της αντίστοιχης χρωμοσωματικής περιοχής για την οποία είναι ειδικός ο συγκεκριμένος ιχνηθέτης, καθιστώντας το κύτταρο μη φυσιολογικό (ανευπλοειδικό).

Πρακτικά η ανάλυση των αντικειμενοφόρων πλακών περιλαμβάνει την καταμέτρηση φυσιολογικών κυττάρων καθώς και την ανίχνευση ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων, δηλαδή κυττάρων με ασύμμετρο αριθμό εστιών και άρα ασύμμετρο αριθμό χρωμοσωμάτων.

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα

6.1. 1η Σειρά πειραμάτων: Μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης (Μικροπυρήνες)

Στην πρώτη σειρά πειραμάτων εφαρμόστηκε η μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης μετά από *in vitro* έκθεση δειγμάτων περιφερικού αίματος σε χαμηλή δόση ακτινοβολίας προκειμένου να διαπιστωθεί αν είναι αυξημένη η συχνότητα εμφάνισης τους. Οι μικροπυρήνες χρησιμοποιούνται ως δείκτης γονιδιωματικής αστάθειας και πρώιμης καρκινογένεσης αφού η αύξησή τους έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκινογένεσης.

Έχει διαπιστωθεί πως πέρα από την έκθεση σε ακτινοβολία και άλλοι παράγοντες όπως το κάπνισμα, το περιβάλλον και η σύσταση του αέρα ευθύνονται για την αύξηση της συχνότητας των μικροπυρήνων.

Επομένως, είναι αναμενόμενο να υπάρχει αυξημένη συχνότητα εμφάνισης τους στα μη-ακτινοβολημένα δείγματα (control).

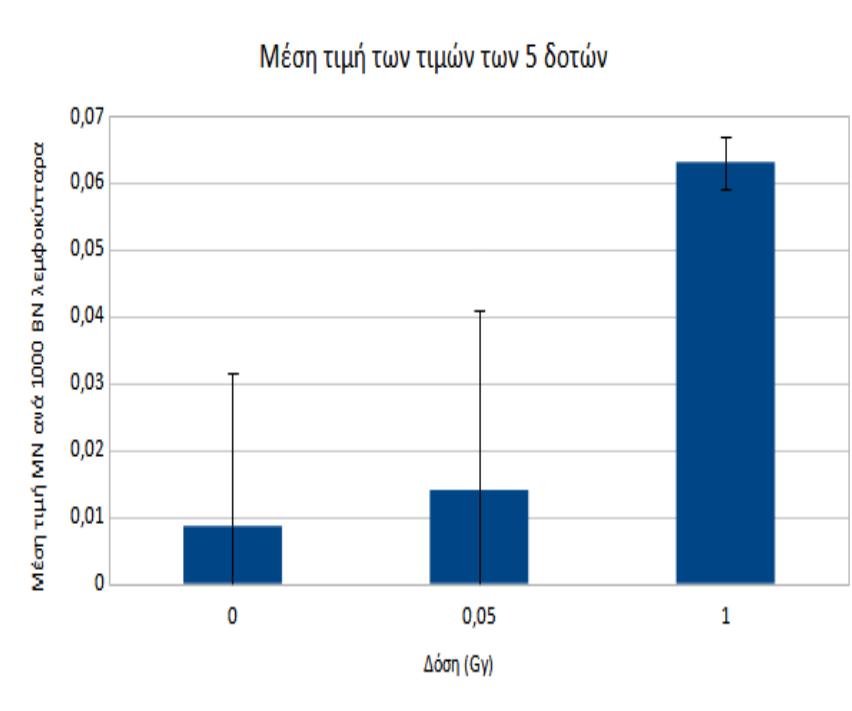
Η μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης εφαρμόστηκε σε δείγματα περιφερικού αίματος 5 δοτών μετά από *in vitro* έκθεση τους σε δόσεις ακτινοβολίας 50 mGy και 1 Gy.

Στην συνέχεια, ακολούθησε για κάθε δότη ανάλυση 1000 διπύρηνων λεμφοκυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο και καταγράφηκε ο αριθμός των μικροπυρήνων.

Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις του αριθμού των μικροπυρήνων για κάθε δότη αλλά και οι μέσες τιμές όλων των δοτών των 5 πειραμάτων βρίσκονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 6.1 ενώ στο σχήμα 6.1 παρουσιάζονται γραφικά οι μέσες τιμές των μικροπυρήνων όπως προκύπτουν από τα 5 πειράματα.

Δότης	Δόση (Gy)	MN/BN
1	0	0,011+/- 0,114
	0,05	0,017+/-0,129
	1	0,069+/-0,254
2	0	0,008+/-0,089
	0,05	0,014+/-0,116
	1	0,059+/-0,271
3	0	0,01+/-0,099
	0,05	0,013+/-0,11
	1	0,065+/-0,026
4	0	0,005+/-0,07
	0,05	0,01+/-0,09
	1	0,06+/-0,237
5	0	0,009+/-0,09
	0,05	0,016+/-0,125
	1	0,064+/-0,248
Μέση τιμή	0	0,0086+/-0,023
	0,05	0,014+/-0,027
	1	0,063+/-0,004

Πίνακας 6.1: Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις των πειραματικών αποτελεσμάτων της μεθόδου αναστολής της κυτταροκίνησης για τους 5 δότες αλλά και μέση τιμή αυτών (MN/BN: Ο αριθμός των μικροπυρήνων ανά 1000 διπύρηνα λεμφοκύτταρα).



Σχήμα 6.1: Γραφική απεικόνιση των μέσων τιμών των μικροπυρήνων όπως προκύπτουν για τους πέντε δότες.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι υπάρχει μια μικρή αύξηση στην συχνότητα εμφάνισης των μικροπυρήνων για τα δείγματα που έχουν ακτινοβοληθεί με 0,05 Gy. Όμως, η διακύμανση μεταξύ των δοτών είναι πολύ μεγάλη, επομένως δεν μπορούμε να θεωρήσουμε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στην συχνότητα των μικροπυρήνων μεταξύ των δειγμάτων control και των ακτινοβολημένων δειγμάτων με 0,05 Gy.

Παρακάτω ακολουθούν εικόνες μικροπυρήνων σε διπύρηνα λεμφοκύτταρα όπως λήφθηκαν από το οπτικό μικροσκόπιο του εργαστηρίου.



Σχήμα 6.2.: Εικόνα διπύρηνου κυττάρου με μικροπυρήνα.



Σχήμα 6.3.: Εικόνα διπύρηνου κυττάρου με τρεις μικροπυρήνες.

6.2. 2η Σειρά πειραμάτων: Μέθοδος ανάλυσης εστιών γ -H2AX (γ -H2AX foci)

Η δεύτερη σειρά πειραμάτων περιλάμβανε την εφαρμογή της μεθόδου φωσφορυλιωμένης ιστονικής πρωτεΐνης H2A (γ -H2AX) μετά από *in vitro* έκθεση δειγμάτων περιφερικού αίματος σε χαμηλή δόση.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε για δείγματα που λήφθηκαν από πέντε υγιής δότες μετά από *in vitro* έκθεση τους σε καθορισμένες δόσεις ακτινοβολίας με σκοπό την εκτίμηση των επαγομένων DSBs στο DNA αλλά και την διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της δράσης των ενζυμικών μηχανισμών επιδιόρθωσης.

Το δείγματα ακτινοβολήθηκαν με δόση 0,05 Gy και στην συνέχεια ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην ενότητα για δύο χρονικά σημεία, 0 και 24 ώρες μετά την έκθεση.

Η ανάλυση των πλακιδίων πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού και περιλάμβανε την καταμέτρηση των εστιών σε κάθε λεμφοκύτταρο στα δείγματα control και στα ακτινοβολημένα δείγματα.

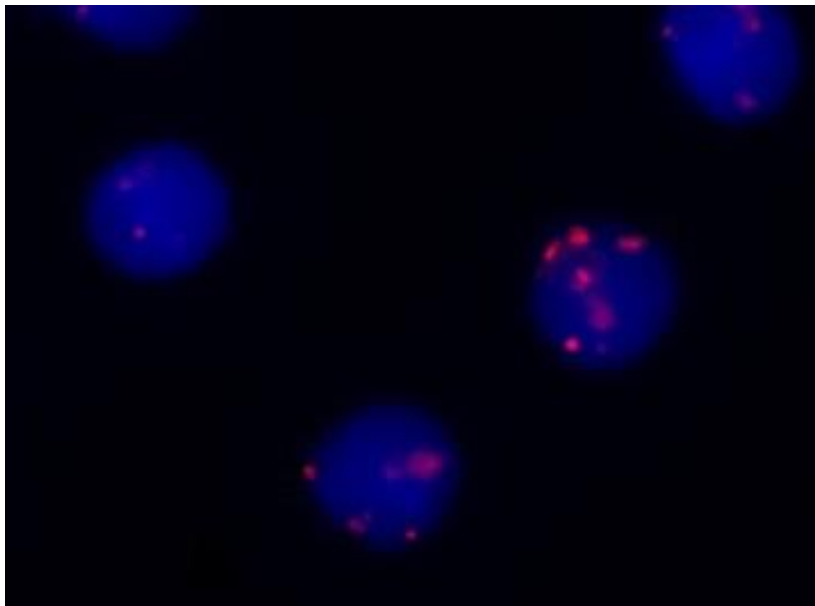
Στον 6.2 φαίνονται για κάθε δότη η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των καταμετρούμενων εστιών για την δόση ακτινοβολίας των 0,05 Gy για τα διαφορετικά χρονικά σημεία αλλά και η μέσες τιμές των 5 δοτών.

Δότης	Foci control	Foci 0h	Foci 24h
1	0,07+/-0,38	0,15+/-0,39	0,13+/-0,33
2	0,23+/-0,54	0,9+/-1,21	0,41+/-0,69
3	0,01+/-0,16	0,12+/-0,4	0,08+/-0,27
4	0,35+/-0,57	0,88+/-1,46	0,64+/-1,02
5	0,79+/-1,62	1,16+/-1,92	1,03+/-1,31
Μέση τιμή	0,29+/-0,31	0,48+/-0,5	0,46+/-0,39

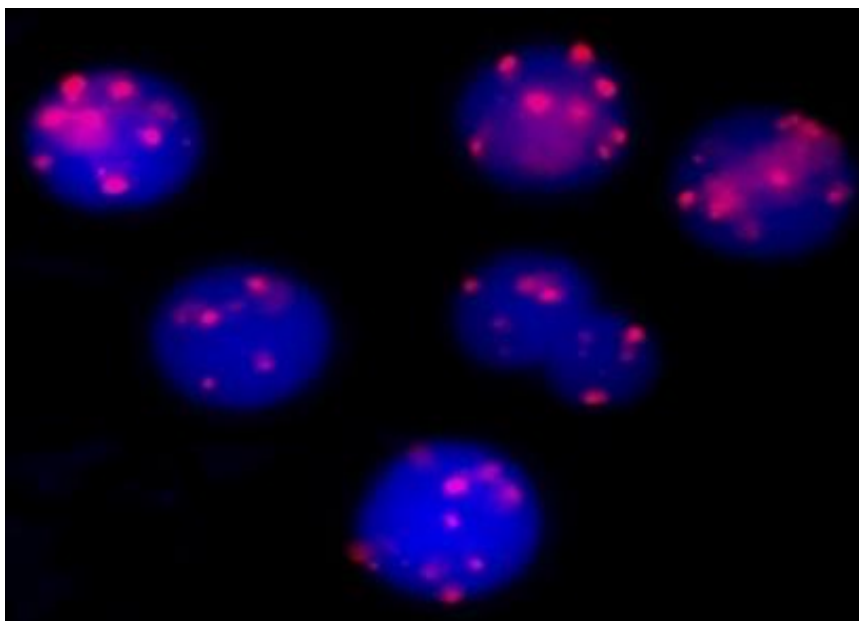
Πίνακας 6.2 : Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις των πειραματικών αποτελεσμάτων της μεθόδου φωσφορυλιωμένης ιστονικής πρωτεΐνης H2A (γ -H2AX) για τους 5 δότες αλλά και μέση τιμή αυτών για τα χρονικά σημεία 0 h και 24 h μετά την ακτινοβόληση (Foci: Ο αριθμός των εστιών ανά 200 λεμφοκύτταρα).

Τέλος, τα αποτελέσματα της ανάλυσης πριν και μετά την έκθεση στην χαμηλή δόση ακτινοβολίας των 0,05 Gy για τους 5 διαφορετικούς δότες και για τα χρονικά σημεία των 0 και 24 ωρών μετά την έκθεση αξιολογήθηκαν στατιστικά με το Student's t-test, από το οποίο προέκυψε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p=0,038$) στον αριθμό των foci που καταμετρούνται στα δείγματα control και στα ακτινοβολημένα δείγματα αμέσως μετά την ακτινοβόληση (0h). Για τον σύνολο των 5 δοτών η στατιστική σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων control και των ακτινοβολημένων δειγμάτων 24 ώρες μετά την έκθεση έδειξε, επίσης, σημαντική διαφορά στον αριθμό των foci ($p=0,021$). Τέλος, είναι εμφανής η μεγάλη διακύμανση στην επιδιόρθωση των DSBs μεταξύ των δοτών.

Παρακάτω ακολουθούν εικόνες λεμφοκυττάρων με εστίες foci όπως λήφθηκαν από το μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού του εργαστηρίου.



Σχήμα 6.4.: Εικόνα λεμφοκυττάρων (μπλε) με εστίες foci (κόκκινες).



Σχήμα 6.5: Εικόνα λεμφοκυττάρων (μπλε) με εστίες foci (κόκκινες).

6.3. 3η Σειρά πειραμάτων: Μέθοδος μελέτης ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων (CBMN-iFISH)

Τα πειράματα στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής ολοκληρώθηκαν με την πραγματοποίηση δύο πειραμάτων που αφορούσαν την ανίχνευση ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων, μετά από έκθεση σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας, οι οποίες ενδέχεται να προκαλέσουν χρωμοσωματική αστάθεια και ανευπλοειδία, φαινόμενα που έχουν συσχετιστεί με καρκινογένεση. Για τον σκοπό αυτό ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο CBMN i-FISH, δηλαδή συνδυασμός της μεθόδου Μικροπυρήνων και της μεθόδου FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στους τρεις πρώτους δότες μετά από *in vitro* έκθεση τους περιφερικού αίματος σε δόσεις ακτινοβολίας 0,05 Gy και 2 Gy με σκοπό την εκτίμηση των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων 72 και 96 ώρες μετά την έναρξη των καλλιέργειών. Στις καλλιέργειες που έληξαν 72 ώρες μετά την ακτινοβολία ο αναστολέας της κυτταροκίνησης προστέθηκε στις 44 ώρες, ενώ στις καλλιέργειες που έληξαν στις 96 ώρες ο αναστολέας προστέθηκε 72 ώρες μετά την έναρξη τους.

Η επίδραση χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας στην επαγωγή ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων εκτιμήθηκε με τη χρήση κεντρομεριδιακών ανιχνευτών (probes). Σε όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν κεντρομεριδιακοί ανιχνευτές για το κεντρομερίδια των χρωμοσωμάτων 6 και 15 (CEP6 και CEP15).

Όπως έχουμε αναφέρει η επίδραση της κυτταροχλασίνης-B (Cyt-B) εμποδίζει την κυτταροκίνηση και τα θυγατρικά κύτταρα παραμένουν στο ίδιο κυτταρόπλασμα, καθιστώντας δυνατή την ανίχνευση μίας πιθανά ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης.

Στο μικροσκόπιο φθορισμού παρατηρούνται συνολικά 4 σήματα φθορισμού για κάθε θυγατρικό κύτταρο καθώς σε μία φυσιολογική κυτταρική διαίρεση, κάθε θυγατρικό κύτταρο αναμένεται να φέρει δύο χρωμοσώματα 6 και δύο 15, ενώ αναμένονται 8 σήματα ανά διπύρρηνο κύτταρο (4 και

4).

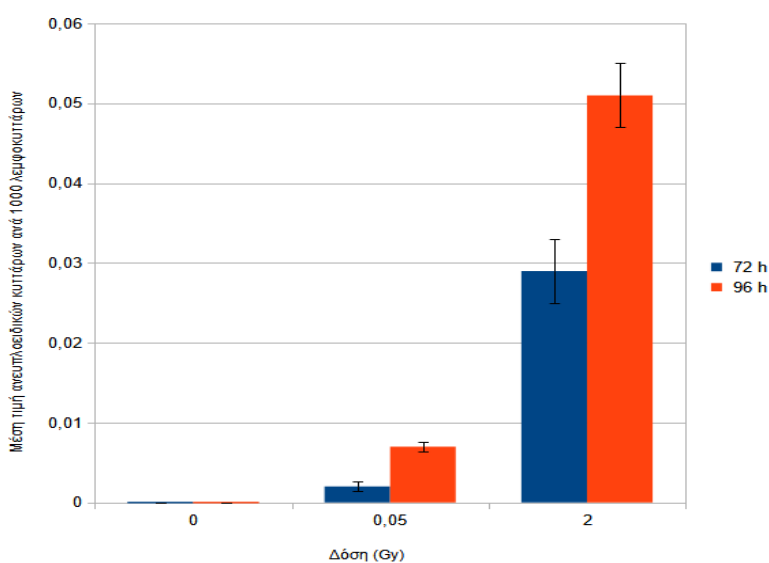
Τα παραπάνω κύτταρα φέρουν φυσιολογικό πρότυπο υβριδισμού και ορίζονται ως φυσιολογικά διαιρεμένα λεμφοκύτταρα, ενώ οποιοδήποτε άλλο πρότυπο θεωρείται ως ανώμαλο (ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση).

Στον πίνακα 6.3 φαίνονται συγκεντρωτικά για τους τρεις δότες, η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των μη φυσιολογικών κυττάρων (αριθμός μη φυσιολογικών κυττάρων σε 1000 φυσιολογικά λεμφοκύτταρα) για τα δύο διαφορετικά χρονικά σημεία (72 και 96 ώρες) και για τις διαφορετικές δόσεις ακτινοβολήσης των δειγμάτων καθώς και οι μέσες τιμές των παραπάνω τιμών. Στο σχήμα 6.6 περιλαμβάνεται η γραφική παράσταση των μέσων τιμών.

Δότης	Δόση (Gy)	72h	96h
1	0	0	0
	0,05	0,002+/-0,044	0,006+/-0,077
	2	0,025+/-0,15	0,049+/-0,21
2	0	0	0
	0,05	0,002+/-0,044	0,007+/-0,083
	2	0,028+/-0,16	0,051+/-0,22
3	0	0	0
	0,05	0,003+/-0,054	0,008+/-0,089
	2	0,033+/-0,17	0,053+/-0,22
Μέση τιμή	0	0	0
	0,05	0,002+/-0,0006	0,007+/-0,001
	2	0,029+/-0,004	0,051+/-0,002

Πίνακας 6.3: Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις των πειραματικών αποτελεσμάτων της μεθόδου μελέτης ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων για τους 3 δότες αλλά και μέση τιμή αυτών για τα χρονικά σημεία 72 h και 96 h.

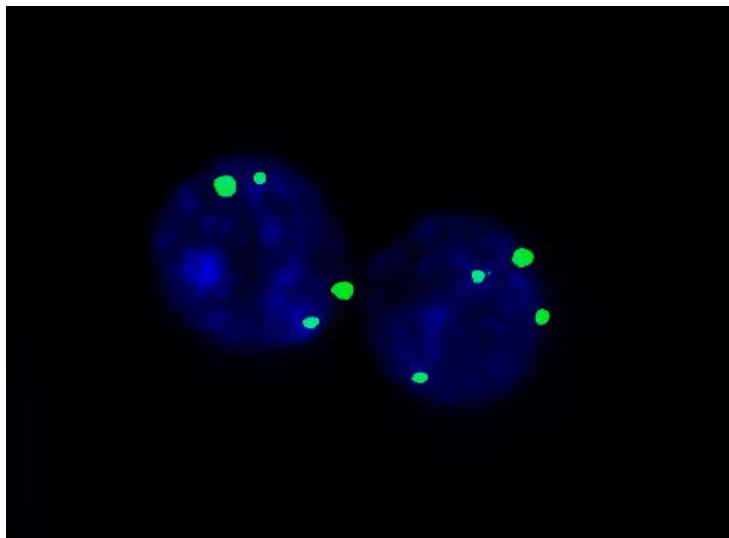
Μέση τιμή 3 δοτών



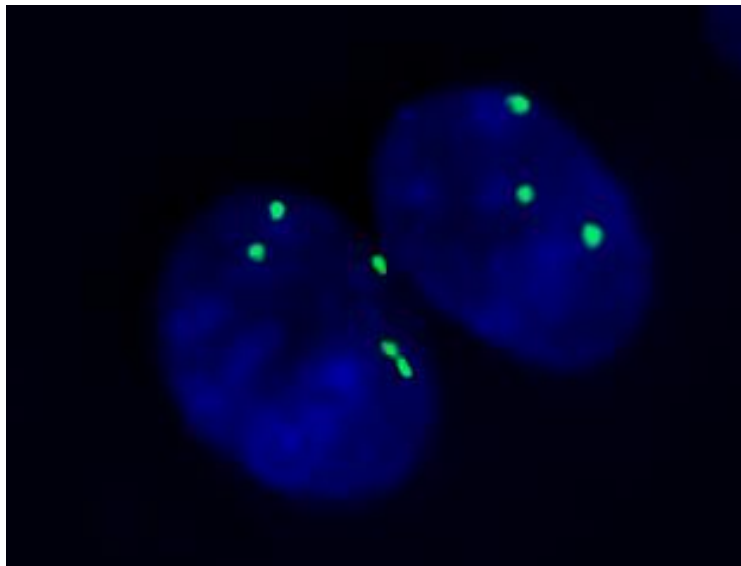
Σχήμα 6.6 : Γραφική απεικόνιση των μέσων τιμών των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων για τους τρεις δότες.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης πριν και μετά την έκθεση στην χαμηλή και στην υψηλή δόση ακτινοβολίας (0,05 Gy και 2 Gy) για τους 3 διαφορετικούς δότες αξιολογήθηκαν στατιστικά με το Student's t-test από το οποίο προέκυψε στατιστικώς σημαντική διαφορά αριθμού ανευπλοειδικών κυττάρων μεταξύ 72 και 96 ωρών ($p=0,0050633$ και $p= 0,0028835$ αντίστοιχα).

Παρακάτω ακολουθούν εικόνες φυσιολογικά και ανώμαλα διαιρεμένων λεμφοκυττάρων όπως λήφθηκαν από το μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού του εργαστηρίου.



Σχήμα 6.7: Εικόνα φυσιολογικού διπύρηνου κυττάρου (μπλε) με ίσο αριθμό μαρκαρισμένων χρωμοσωμάτων με χρήση κεντρομεριδιακών ιχνιθετών (πράσινο).



Σχήμα 6.8: Εικόνα μη φυσιολογικού διπύρηνου κυττάρου (μπλε) με άνισο αριθμό μαρκαρισμένων χρωμοσωμάτων με χρήση κεντρομεριδιακών ιχνιθετών (πράσινο).

Κεφάλαιο 7: Συζήτηση

7.1. 1η Σειρά πειραμάτων: Μέθοδος μικροπυρήνων

Η πρώτη σειρά πειραμάτων περιλάμβανε την εφαρμογή της μεθόδου ανάλυσης μικροπυρήνων με στόχο την εκτίμηση βλαβών μετά από έκθεση σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας. Όπως αναφέραμε και σε προηγούμενη ενότητα, οι μικροπυρήνες μπορεί να περιέχουν χρωμοσωματικά θραύσματα χωρίς κεντρομερίδια (ακεντρικά θραύσματα) ή/και ολόκληρα χρωμοσώματα των οποίων οι χρωματίδες δεν διαχωρίστηκαν σωστά κατά την κυτταρική διαίρεση.

Η εμφάνιση μικροπυρήνων μπορεί να οφείλεται στην έκθεση σε διάφορους κλαστογονικούς παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, το κάπνισμα, οι διατροφικές συνήθειες αλλά και γενικότερα περιβαλλοντικοί παράγοντες. Όπως γνωρίζουμε η ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι ένας ισχυρός κλαστογονικός και μεταλλαξιόγόνος παράγοντας και επομένως ισχυρός επαγωγέας μικροπυρήνων, με αποτέλεσμα η μέθοδος της αναστολής της κυτταροκίνησης να αποτελεί μία αξιόπιστη και επικυρωμένη τεχνική βιοδοσιμετρίας.

Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα 5 υγείων δοτών μετά από *in vitro* ακτινοβόληση τους με δόσεις 0,05 Gy και 1 Gy. Τα αποτελέσματα συνολικά έδειξαν μια μικρή αύξηση της μέσης τιμής των μικροπυρήνων για τα δείγματα που έχουν ακτινοβοληθεί με 0,05 Gy (μέση τιμή 0,014+/- 0,007) συγκριτικά με την μέση τιμή των δειγμάτων control (μέση τιμή 0,0086+/-0,023), όμως η ύπαρξη μεγάλης διακύμανσης μεταξύ των μέσων τιμών δεν μας επιτρέπει να θεωρήσουμε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων control και των ακτινοβολημένων δειγμάτων με 0,05 Gy.

Ο M. Bauchinger και οι συνεργάτες του (28) στην δημοσιευμένη αναφορά τους υπογραμμίζουν την μεγάλη διακύμανση της συχνότητας των μικροπυρήνων στο υπόβαθρο. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές του ποικίλλουν από 2 έως 36 μικροπυρήνες για 1000 κύτταρα που καταμετρούνται, με αποτέλεσμα η μεταβλητότητα αυτή να θέτει περιορισμούς ως προς την χρήση των μικροπυρήνων για βιοδοσιμετρία, κυρίως όταν πρόκειται για χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας εξαιτίας του ήδη υπάρχοντος υποβάθρου.

Καταλήγουμε, λοιπόν, στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος αναστολής της κυτταροκίνησης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για βιοδοσιμετρία και αξιολόγηση των βιολογικών επιπτώσεων της ακτινοβολίας στην περίπτωση των χαμηλών δόσεων (50 mGy).

Όπως θα συζητήσουμε και στην επόμενη ενότητα η πιο αξιόπιστη μέθοδος όπως προέκυψε και από τα αποτελέσματα μας είναι η μέθοδος της φωσφορυλιωμένης ιστόνης γ-H2AX. Ωστόσο, ένα μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου των μικροπυρήνων είναι η δυνατότητα εφαρμογής της μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (ημέρες-μήνες) μετά την έκθεση στην ακτινοβολία.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση της μεθόδου των για την εκτίμηση της συνεχούς έκθεσης των κατοίκων που ζούσαν σε γειτονικές περιοχές κοντά στο Chernobyl. Η μελέτη του G. K. Livingston και των συνεργατών του (29) αφορούσε 80 ανθρώπους που έμεναν 100-200km από το Chernobyl την περίοδο που έγινε το ατύχημα το 1986 και οι οποίοι αμέσως μετά μετανάστευσαν στις ΗΠΑ. Η μελέτη περιλάμβανε την εφαρμογή της μεθόδου αναστολής της κυτταροκίνησης με στόχο την καταμέτρηση μικροπυρήνων από το 1989 έως το 1991 και το αποτέλεσμα ήταν πως η συχνότητα των μικροπυρήνων σχετίζεται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με την απορροφούμενη δόση για το συνολικό αριθμό 20 ατόμων για τους οποίους αυτή η μέτρηση ήταν εφικτή να γίνει. Το

αποτέλεσμα της μελέτης για το σύνολο των ανθρώπων που συμμετείχαν ήταν πως η έκθεση τους σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας είναι ικανή να προκαλέσει γονιδιακή μετάλλαξη χωρίς όμως αυτές οι μεταλλάξεις να οφείλονται αποκλειστικά και μόνο στην έκθεση στο καίσιο.

7.2. 2η Σειρά πειραμάτων: Μέθοδος της φωσφορυλιωμένης ιστονικής πρωτεΐνης H2AX (γ -H2AX/foci)

Η δεύτερη σειρά πειραμάτων περιλάμβανε την εφαρμογή της μεθόδου ανάλυσης εστιών γ -H2AX (γ -H2AX foci) για την ανίχνευση δίκλωνων θραύσεων στο DNA μετά από έκθεση σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας αλλά και την εκτίμηση της αξιοπιστίας της μεθόδου αν αυτή εφαρμοστεί μεταγενέστερα της έκθεσης (24 ώρες μετά την έκθεση).

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης ιστόνης H2AX μετά την επαγωγή των δίκλωνων θραύσεων (DSBs) στο DNA μέσω της χρήσης ειδικών αντισωμάτων, τα οποία προσδένονται στις πρωτεΐνη σηματοδότησης/επισκευής ενδιαφέροντος. Η δέσμευση του αντισώματος ανιχνεύεται με δευτερεύον αντίσωμα, το οποίο φέρει μια ετικέτα φθορισμού. Έτσι, με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού γίνεται προσδιορισμός της θέσης και της έντασης της κάθε εστίας.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής πραγματοποιήθηκε *in vitro* ακτινοβόληση περιφερικού αίματος των πέντε υγιών δοτών με δόση ακτινοβολίας 0,05 Gy. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι η δόση των 0,05 Gy είναι ικανή να προκαλέσει στατιστικώς σημαντική αύξηση των ακτινο-επαγόμενων γ -H2AX εστιών ανά κύτταρο με μέση τιμή 0,48 \pm 0,5 σε σχέση με την μέση τιμή όπως προέκυψε για τα μη-ακτινοβολημένα δείγματα (0,29 \pm 0,31). Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, όπως η δημοσιευμένη πιλοτική μελέτη του Brunhild M. Halm και των συνεργατών του (30). Η μελέτη αφορά τρεις παιδιατρικούς ασθενείς οι οποίοι υπόκεινται σε εξέταση υπολογιστικής τομογραφίας χαμηλής δόσης (0.22–1.22 mGy). Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι η γ -H2AX είναι ένας αξιόπιστος και ευαίσθητος βιοδείκτης για την αξιολόγηση της επίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας ακόμα και σε πολύ χαμηλές δόσεις παρά το μικρό αριθμό των δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, έδειξαν ότι η μέθοδος ανάλυσης των εστιών γ -H2AX αποδεικνύεται η πιο ευαίσθητη για την ανίχνευση χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας <100 mGy, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες, όπως αυτές του Markus Lobrich και των συνεργατών του (31) και του Michael A. Kuefner και των συνεργατών του (32) (33), οι οποίες αναφέρουν ότι η ευαισθησία της μεθόδου αφορά το εύρος δόσεων 0,1-0,2 έως 5 Gy.

Η δεύτερη σειρά πειραμάτων είχε, επίσης, ως στόχο τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της μεθόδου αν αυτή εφαρμοστεί 24 ώρες μετά την έκθεση. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε μείωση του αριθμού των εστιών γ -H2AX 24 ώρες μετά από έκθεση σε 0,05 Gy, για το σύνολο των δοτών αλλά και για κάθε δότη ξεχωριστά λόγω της ταχείας επιδιόρθωσης των βλαβών, χωρίς όμως η συχνότητα εμφάνισης των εστιών να αγγίζει τα επίπεδα του control. Πιο συγκεκριμένα, η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών των μη ακτινοβολημένων δειγμάτων και των ακτινοβολημένων δειγμάτων 24 ώρες μετά την έκθεση με μέσες τιμές 0,29 \pm 0,31 και 0,46 \pm 0,39 αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να συγκριθεί με την μελέτη του Dominik Geisel και των συνεργατών του (34), στα πλαίσια της οποίας παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των γ -H2AX foci, άρα και αύξηση των δίκλωνων θραύσεων του DNA των ασθενών μετά από αγγειοπλαστική, όπως επίσης και ότι ο μέσος αριθμός των foci 24 ώρες μετά την επέμβαση ήταν σε υψηλά επίπεδα σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Παρόμοια ευρήματα είχαν και οι μελέτες του C. Vandevoorde και των συνεργατών του (35) αλλά και του Brunhild M. Halm και των συνεργατών του (36), όπου μελέτησαν την επίδραση χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας από υπολογιστική τομογραφία σε παιδιά και παρατήρησαν μια σημαντική αύξηση των γ -H2AX foci στα λεμφοκύτταρα των παιδιών μετά την έκθεσή τους.

Επομένως, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η ταχεία δράση των μηχανισμών επιδιόρθωσης ίσως δεν επιτρέπει την χρήση της μεθόδου ανίχνευσης των εστιών γ -H2AX για βιοδοσιμετρία κάποιες ώρες μετά την ακτινοβολία, όμως αποτελεί αρκετά ευαίσθητη μέθοδο ανίχνευσης των βλαβών που προκαλεί η ακτινοβολία αμέσως μετά την έκθεση ακόμα και στην περίπτωση των χαμηλών δόσεων. Επίσης, πρέπει να αναφέρουμε ότι υπήρχε μεγάλη διακύμανση στην επιδιόρθωση μεταξύ των δοτών για τα δείγματα που αναλύθηκαν 24 ώρες μετά την έκθεση, γεγονός που υπογραμμίζει την ανάγκη παρακολούθησης της πορείας επιδιόρθωσης των βλαβών για μεταγενέστερα χρονικά σημεία, όπως για παράδειγμα 72 ώρες μετά την έκθεση.

7.3. 3η Σειρά πειραμάτων: Μέθοδος μελέτης ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων

Η τελευταία σειρά πειραμάτων αφορούσε την ανίχνευση ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων ως αποτέλεσμα έκθεσης σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας μέσω συνδυασμού της μεθόδου FISH (Fluorescence in situ Hybridization) και της μεθόδου μικροκυρήνων.

Όπως αναφέραμε και στις προηγούμενες ενότητες οι ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις στα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα έχουν σαν επακόλουθο το σχηματισμό θυγατρικών κυττάρων με αριθμό χρωμοσωμάτων διαφορετικό του 46 (ανευπλοειδίες, πολυπλοειδίες) και ενδεχόμενη πρόκληση χρωμοσωματικής αστάθειας, φαινόμενο που έχει συσχετιστεί με την καρκινογένεση.

Για την μελέτη του φαινομένου της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης ως αποτέλεσμα έκθεσης σε χαμηλές δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας, πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα. Τα πειράματα περιλάμβαναν *in vitro* έκθεση περιφερικού αίματος σε δόσεις 0,05 και 2 Gy και εφαρμογή της κυτταροχλασίνης-B 44 και 72 ώρες μετά την ακτινοβολία με ολοκλήρωση των καλλιέργειών στις 72 και 96 ώρες αντίστοιχα. Η εφαρμογή της κυτταροχλασίνης-B επιβεβαιώνει ότι η ακτινοπροκληθείσα ασύμμετρη διαίρεση των θυγατρικών κυττάρων προέρχεται από το ίδιο πατρικό κύτταρο μιας και τα δύο θυγατρικά κύτταρα παραμένουν μέσα στο ίδιο κυτταρόπλασμα.

Η ανάλυση των πλακιδίων έδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση της συχνότητας των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων από 0,002+/-0,0006 στις 72 ώρες σε 0,007+/-0,001 στις 96 ώρες μετά την έκθεση στην χαμηλή δόση ακτινοβολίας και για τους 3 διαφορετικούς δότες

Στατιστικώς σημαντική αύξηση στην μέση τιμή των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων μεταξύ των δύο χρονικών σημείων παρατηρήθηκε και μετά από την έκθεση στην υψηλή δόση ακτινοβολίας των 2 Gy (0,029+/-0,004 και 0,051+/-0,002 για 72 και 96 ώρες αντίστοιχα).

Όπως προκύπτει, η συχνότητα της ανευπλοιδίας για τα χρωμοσώματα που διερευνήθηκαν αυξάνεται σε μεταγενέστερο χρονικό σημείο του κυτταρικού κύκλου ενώ επίσης, αυξάνεται και με την δόση της ακτινοβολίας.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μπορούν να συγκριθούν με αυτά της μελέτης του Yoon Hee Cho και των συνεργατών του (37) μιας και η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε προσεγγίζει αρκετά την δική μας. Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα ινοβλαστώματα και η ακτινοβολήση αφορούσε ακτίνες Χ. Η εφαρμογή της κυτταροχλασίνης-B έγινε 28 h πριν την λήξη κάθε καλλιέργειας και οι καλλιέργειες ολοκληρώθηκαν σε τρία χρονικά σημεία, 56 h, 88 h και 240 h.

Η καταμέτρηση των κυτταρικών διαιρέσεων στην μελέτη του Yoon Hee Cho και των συνεργατών του έδειξε αύξηση της συχνότητας εμφάνισης ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων με την πάροδο των κυτταρικών κύκλων αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα. Στο σύνολο της η μελέτη καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η συχνότητα της ανευπλοιδίας για τα χρωμοσώματα που διερευνήθηκαν αυξάνεται με την δόση της ακτινοβολίας και για τα τρία χρονικά σημεία λήξης των καλλιεργειών.

Τα αποτελέσματα μας μπορούν να συγκριθούν, επίσης, με αυτά που περιλαμβάνονται στην διπλωματική εργασία της Βασιλείου Μαρίας-Αικατερίνης για την απόκτηση του μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών στο πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών Ιατρικής Φυσικής-Ακτινοφυσικής (38). Η πειραματική διαδικασία αφορά έναν δότη για εκθέσεις σε δόσεις ακτινοβολίας 60 mGy και 100 mGy, για τα χρονικά των 72 και 96 ωρών μετά την ακτινοβολήση.

Τα πρώιμα αποτελέσματα της παραπάνω έρευνας δείχνουν στατιστικώς σημαντική δόσο-εξαρτώμενη αύξηση των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων ενώ ταυτόχρονα φανερώνουν μία πιθανή βιολογική επίδραση των χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας.

Επιπλέον, δείχνουν αύξηση του αριθμού των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων στις 96 ώρες μετά την ακτινοβολήση σε σχέση με τον αριθμό των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων στις 72 ώρες μετά την έκθεση, αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα μας.

Τα αποτελέσματα των τριών πειραμάτων μας επιβεβαιώνουν την βιολογική επίδραση των χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας. Βέβαια, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για μεγαλύτερο αριθμό δοτών και μεγαλύτερο εύρος χαμηλών δόσεων. Επιπλέον, μιας και μας ενδιαφέρει η πορεία των θυγατρικών κυττάρων πρέπει να πραγματοποιηθούν πειράματα σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα μετά την έκθεση στην ακτινοβολία για την αξιολόγηση τους σε μεταγενέστερες φάσεις.

Βιβλιογραφία

1. Podgorsak, E.B. . *Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students*. Vienna : IAEA, 2005.
2. Hall, Eric J. και Giaccia, Amato J. *Radiobiology for the Radiologists*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, 2012.
3. Alpen, Edward L. *Radiation Biophysics*. s.l. : Academic Press, 1998.
4. *Overview of the Current IAEA BSS*. 29, Ghana : IAEA, 2011, Τόμ. 45.
5. *Sources and Effects of Ionizing Radiation*. New York : UNSCEAR, 2008.
6. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας*. s.l. : Βασιλειάδης Ιατρικές εκδόσεις, 2018.
7. Τερζούδη, Γεωργία. *Βιοδοσιμετρία Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών και Μελέτη Μηχανισμών Ακτινοευαισθησίας με Κυτταρογενετικές Μεθόδους και Μοριακούς Ανιχνευτές*. 1998.
8. Δημητρίου Π., Παπαγιάννης Π. *Βιολογικά αποτελέσματα της έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία*.
9. Ψαρράκος, Κ. *Στοιχεία Ακτινοφυσικής και Εφαρμογές στην Ιατρική, Ακτινοβιολογία, Ακτινοπροστασία*. Θεσσαλονίκη : University Studio Press, 2009.
10. *Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. A Manual No. 405*. Vienna : IAEA, 2001.
11. *Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies*. s.l. : IAEA, 2011.
12. Καραχρήστου Ιωάννα, Γεωργία Τερζούδη, Γαβριήλ Παντελιάς. *Εκτίμηση απορροφούμενης δόσης και εξατομίκευση επικινδυνότητας της έκθεσης σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες βάσει των επαγόμενων χρωμοσωματικών αλλοιώσεων σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος*. 2017.
13. Γαβριήλ Παντελιάς, Γεωργία Τερζούδη. *Μέτρηση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων μετά από έκθεση σε γενοτοξικούς παράγοντες: νέες μέθοδοι για έγκυρες και αξιόπιστες εκτιμήσεις δόσεων και επιπτώσεων στην υγεία*. 2008-2009.
14. Χαδλά, Π. *Μοριακοί Μηχανισμοί Γενετικής Αστάθειας στον Καρκίνο του Παχέος Εντέρου στον άνθρωπο: ο ρόλος της σηματοδότησης από την Integrin-Linked-Kinase*. 2020.
15. *Mechanisms of chromosomal instability*. S. Thompson, S. Bakhoun, D. Compton. 2010, σσ. 285-295.
16. *The State of Art and Future Directions*. S. Sommer, I. Buraczewska, M. Kruszewski. 2020, Inter. Journal of Molecular Sciences.
17. *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*. Georgia I. Terzoudi, Maria Karakosta, Antonio Pantelias, Vasiliki I. Hatz, Ioanna Karachristou, Gabriel Pantelias. 2015, Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, σσ. 185-198.

18. *Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development*. Stephens, P.J. Greenman, C.D. Fu, B. Yang, F. Bignell, G.R. Mudie, L.J. Pleasance, E.D. Lau, K.W. Beare, D. Stebbings, L.A. 2011, Cell, σσ. 27-40.
19. *Chromothripsis and cancer: Causes and consequences of chromosome shattering*. Forment, J.V. Kaidi, A. Jackson. 2012, Nature Reviews Cancer, σσ. 663-670.
20. *Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation*. M. Fenech, A.A. Morley. 1986, Mutat Res, σσ. 193-198.
21. *Measurement of micronuclei in lymphocytes*. FENECH, J., MORLEY, A.A. 1985, Mutat.Res., σσ. 29-36.
22. *The HUMN Project — An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans*. FENECH, M., HOLLAND, N., CHANG, W.P., ZEIGER, E., BONASSI, S. s.l. : Mutat. Res. , 1999, σσ. 271-283.
23. , *Biological dosimetry using the micronucleus assay for lymphocytes: Interindividual differences in dose response*. THIERENS, H., VRAL, A., DERIDDER, L. 1991, Health Phys, σσ. 623-630.
24. Κ.Ε.Βοργιάς, Δρ. *Μοριακή Βιολογία. Δομή και ιδιότητες του DNA. Βακτηριακό χρωμόσωμα και χρωματίνη*.
25. *γH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair*. L-J Mah, A El-Osta and TC Karagiannis. Melbourne : Macmillan Publishers, 2010, Leukemia, σσ. 679-686.
26. *DNA damage-associated biomarkers in studying individual sensitivity to low-dose radiation from cardiovascular imaging*. Won Hee Lee, Patricia K. Nguyen, Dominik Fleischmann, Joseph C. Wu. s.l. : European Society of Cardiology, 2016, European Heart Journal Advance Access.
27. *Biodosimetry Techniques and the Biological Indicators of Radiation Exposure in Humans*. Nagesh N. Bhat, Rajesh Chaurasia, Usha Yadav, B. K. Sapra. 365, Mumbai : Bhabha Atomic Research Centre, 2018, Barc Newsletter.
28. *Quantification of low-level radiation exposure by conventional chromosome aberration analysis*. Bauchinger, Manfred. Oberschleiflheim : Elsevier, 1995, Mutation Research, σσ. 177-189.
29. *Radiobiological evaluation of immigrants from the vicinity of Chernobyl*. G. K. Livingston, R. H. Jensen, E. B. Silberstein, J. D. Hinnefeld, G. Pratt, W. L. Bigbee, R. G. Langlois, S. G. Grant, R. Shukla. 6, s.l. : Taylor & Francis Ltd, 1997, Int. J. Radiat. Biol, Τόμ. 72, σσ. 703-713.
30. *γ-H2AX foci are increased in lymphocytes in vivo in young children 1 h after very low-dose X-irradiation: a pilot study*. Brunhild M. Halm, Adrian A. Franke, Jennifer F. Lai, Helen C. Turner, David J. Brenner, Vatche M. Zohrabian, Robert DiMauro. s.l. : Springer, 2014, Pediatr Radiol.
31. *In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations*. Markus Loblrich, Nicole Rief, Martin Ku hne, Martina Heckmann, Jochen Fleckenstein, Christian Rube, Michael Uder. 25, Erlangen : s.n., 2005, PNAS, Τόμ. 102.
32. *DNA double-strand breaks and their repair in blood lymphocytes of patients undergoing angiographic procedures*. MA, Kuefner. 2009, Invest Radiol., σσ. 440-446.

33. *X-ray induced DNA double-strand breaks after angiographic examinations of different anatomic regions.* MA, Kuefner. 2009, σσ. 374-380.
34. *DNA Double-Strand Breaks after Percutaneous Transluminal Angioplasty.* Geisel, Dominik. 2008.
35. *γ-H2AX foci as in vivo effect biomarker in children emphasize the importance to minimize x-ray doses in paediatric CT imaging.* Vandevoorde, C. 2015, Eur. Radiol., σσ. 800-811.
36. *γ-H2AX foci are increased in lymphocytes in vivo in young children 1h after very low-dose X-irradiation: a pilot study.* Halm, Brunhild M. 2014, Pediatr. Radiol.
37. *Delayed Numerical Chromosome Aberrations in Human Fibroblasts by Low Dose of Radiation.* Yoon Hee Cho, Su Young Kim, Hae Dong Woo, Yang Jee Kim, Sung Whan Ha, Hai Won Chung. s.l. : MDPI, 2015, International Journal of Environmental Research and Public Health, σσ. 15162-15172.
38. Μαρία-Αικατερίνη, Βασιλείου. *Μελέτη χαμηλών δόσεων δόσεων ιοντίζουσων ακτινοβολιών σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος με κυτταρογενετικές και μοριακές μεθόδους.* Ηράκλειο : s.n., 2016.
39. Chris Maxwell, Cal Roskelley. *Genomic Instability and Cancer Metastasis: Mechanisms, Emerging Themes, and Novel Therapeutic Strategies.* s.l. : Springer International Publishing, 2015.
40. *Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation.* Michael Fenech, Alexander A. Morley. Bedford Park : Mutanon Research, 1986, Elsevier , σσ. 193-198.
41. *The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure.* Anne Vral 1, Michael Fenech, Hubert Thierens. 1, Adelaide : s.n., 2011, Mutagenesis, Τόμ. 26, σσ. 11-17.
42. *Dose–response curves for analyzing of dicentric chromosomes and chromosome translocations following doses of 1000 mGy or less, based on irradiated peripheral blood samples from five healthy individuals.* Yu Abe, Mitsuaki A. Yoshida , Kurumi Fujiok3 , Yumiko Kurosu , Risa Ujiie , Aki Yanagi , Naohiro Tsuyama , Tomisato Miura , Toshiya Inaba , Kenji Kamiya, aAkira Sakai. 1, 2017, Journal of Radiation Research, Τόμ. 59. 35–42.
43. *On the road to Cancer: Aneuploidy and Mitotic Checkpoint.* Geert J. P. L. Kops, Beth A. A. Weaver. s.l. : Nature Publishing Group, 2005, Nature Reviews| Cancer, Τόμ. 5.
44. *Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis.* Rodrigo Franco, Onard Schoneveld, Alexandros G. Georgakilas, Mihalis I. Panayiotidis. s.l. : Elsevier, 2008, Cancer Letters , σσ. 6-11.
45. *Prenatal Aneuploidy Detection in Interphase cells by Flourescence in situ Hybridization (FISH).* J. Philip, T. Bryndorf, B. Christensen. Denmark : s.n., 1994, Prenatal Diagnosis, Τόμ. 14, σσ. 1203-1215.
46. *Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts.* Saskia Grudzenskia, Antonia Rathsa, Sandro Conrada, Claudia E. Rube, Markus Löbrich. 32, Homburg/Saar : s.n., 2010, PNAS, Τόμ. 107.

47. *Laboratory Intercomparison on the c-H2AX Foci Assay*. K. Rothkamm, S. Horn, H. Scherthan, U. Roßler, A. De Amicis, S. Barnard, Ulrike Kulka, F. Lista, V. Meineke, H. Braselmann, C. Beinke, M. Abend. Munchen : y Radiation Research Society, 2013, Radiation Research, σσ. 149-155.

48. *DNA Double-Strand Breaks and Their Repair in Blood Lymphocytes of Patients Undergoing Angiographic Procedures*. Michael A. Kuefner, MD, Saskia Grudzenski, Siegfried A. Schwab, MD, Melanie Wiederseiner, Martina Heckmann, MD, Werner Bautz, MD, Markus Lobrich, PhD, Michael Uder, MD. 8, s.l. : Lippincott Williams & Wilkins, 2009, Investigative Radiology, Τόμ. 44.