



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

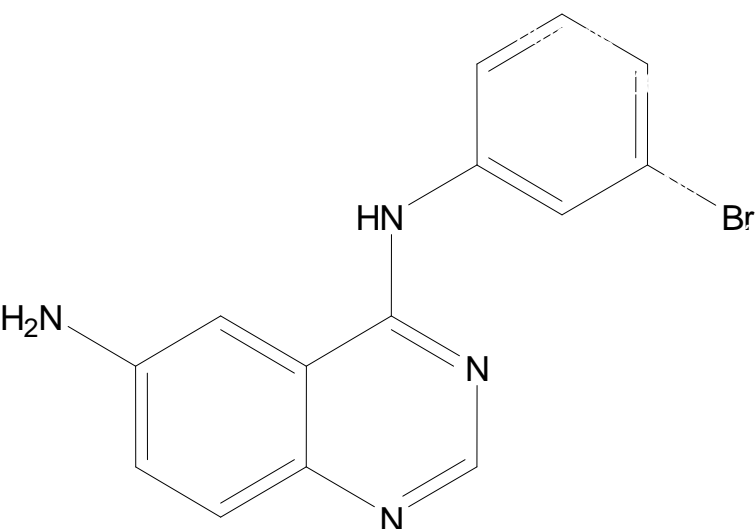
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΦΥΣΙΚΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

**Ανίχνευση σύνθετων βλαβών DNA σε καρκινικά και
υγιή κύτταρα
έπειτα από έκθεση σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας γ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μαγγέλης Αναστάσιος

Φυσικός Εφαρμογών, ΕΜΠ



Μάθαινε και τ' απλούστερα! Γι' αυτούς
που ο καιρός τους ήρθε
ποτέ δεν είναι πολύ αργά!

Μάθαινε το α β γ, δε σε φτάνει, μα συ
να το μαθαίνεις! Μη σου κακοφανεί!
Ξεκίνα! Πρέπει όλα να τα ξέρεις!
Εσύ να πάρεις πρέπει την εξουσία.

Μάθαινε, άνθρωπε στο άσυλο
Μάθαινε, άνθρωπε στη φυλακή!
Μάθαινε, γυναίκα στην κουζίνα!
Μάθαινε, εξηντάχρονοι!
Εσύ να πάρεις πρέπει την εξουσία.

Ψάξε για σχολείο, άστεγε!
Προμηθεύσου γνώση, παγωμένε!
Πεινασμένε, άρπαξε το βιβλίο: είν' ένα όπλο.
Εσύ να πάρεις πρέπει την εξουσία.

Μην ντρέπεσαι να ρωτήσεις, Σύντροφε!
Μην αφεθείς να πείθεσαι
μάθε να βλέπεις συ ο ίδιος!
Ό,τι δεν ξέρεις ο ίδιος
καθόλου δεν το ξέρεις.
Έλεγε το λογαριασμό
εσύ θα τον πληρώσεις.

Ψάξε με τα δάχτυλα κάθε σημάδι
Ρώτα: πώς βρέθηκε αυτό εδώ.
Εσύ να πάρεις πρέπει την εξουσία.

Μπ. Μπρεχτ - Εγκώμιο στη μάθηση

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	8
1.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΩΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΩΝ.....	8
1.1.1 Φυσικές πηγές Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών.....	8
1.1.2 Τεχνητές πηγές ιοντιζουσών ακτινοβολιών.....	12
1.2 ΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΩΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΩΝ.....	12
1.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ.....	13
1.3.1 Φυσικό στάδιο.....	13
1.3.2 Χημικό στάδιο.....	14
1.3.3 Βιολογικό στάδιο.....	14
1.4 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.....	16
1.4.1 Φάσεις του κυτταρικού κύκλου.....	17
1.4.2 Διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.....	19
1.4.3 Έλεγχος του κυτταρικού κύκλου.....	20
1.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΩΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΩΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	21
1.6 ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ.....	Error! Bookmark not defined.
1.7 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ - ΑΚΤΙΝΟΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ.....	Error! Bookmark not defined.
1.8 ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ Ο ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ.....	Error! Bookmark not defined.
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο : ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	33
5.1 ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	35
5.2 ΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ.....	36
5.3 ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ.....	36
5.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ ΜΕ ΑΙΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο : ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ^ο : ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	38
7.1 ΥΠΟΤΟΝΙΚΟ ΣΟΚ.....	39
7.2 ΕΠΙΣΤΡΩΣΗ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ.....	39
7.3 ΧΡΩΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ.....	39
7.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ^ο : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 ^ο : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	46

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 ^ο : ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	57

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία ασχολείται με τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης σύνθετων βλαβών DNA. Οι βλάβες στο γενετικό υλικό των κυττάρων, σε όλους τους οργανισμούς παρουσιάζουν πολλές διακυμάνσεις, όσον αφορά στην πολυπλοκότητα. Από αυτήν την άποψη, οι θραύσεις διπλής έλικας DNA και οι οξειδωτικές ομαδοποιημένες βλάβες είναι οι πιο σημαντικές. Ως εκ τούτου, η αδρανοποίηση των επιδιορθωτικών μηχανισμών των βλαβών αυτών αξιοποιείται εκτενώς στον κλάδο της ακτινοθεραπείας, αφού μπορεί να οδηγήσει, σε συνδυασμό με την χρήση ακτινοβολίας, σε κυτταρικό θάνατο ή απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, συμβάλλοντας έτσι στην θεραπεία. Η επιδιόρθωση των βλαβών αυτών συμβαίνει μέσω των δύο κύριων μηχανισμών επιδιόρθωσης στα κύτταρα των θηλαστικών, τον ομόλογο ανασυνδυασμό και τη μη ομόλογη επιδιόρθωση τελικής σύνδεσης. Στον τελευταίο, κύριο ρόλο παίζει η πρωτεϊνική κινάση DNA-PK. Η απενεργοποίηση της κινάσης αυτής, μπορεί να οδηγήσει στην απενεργοποίηση του μηχανισμού επιδιόρθωσης. Το τελευταίο διάστημα, πολλά μόρια που μπορούν να αξιοποιηθούν σε αυτήν την κατεύθυνση έχουν μελετηθεί, ανάμεσά τους και ο χημικός αναστολέας της DNA-PK, NU7026.

Η δράση του αναστολέα μελετήθηκε στην παρούσα εργασία σε μοριακό επίπεδο, με μεθόδους ανοσοφθορισμού (χρήση φωσφορυλιωμένης ιστόνης γH2AX), σε κυτταρογενετικό επίπεδο με μεθόδους κλωνογενετικής επιβίωσης και σε επίπεδο βιοδοσιμετρίας με την μέθοδο παραγωγής μικροπυρήνων.

Τα αποτελέσματα των πειραματικών διαδικασιών έδειξαν, ότι ο συνδυασμός της χρήσης του αναστολέα με ακτινοβολία μπορεί να επιφέρει σημαντική αύξηση στον αριθμό των μη επιδιορθωμένων βλαβών, σε σχέση με την μεμονωμένη δράση, χωρίς ακτινοβολία. Επίσης, έδειξαν ότι η δράση του αναστολέα σε συνδυασμό με ακτινοβολία είναι χρονοεξαρτημένη και θφίνει σημαντικά μετά το πέρας των 24 ωρών. Τα συμπεράσματα που ανέκτησαν, αποδείχθηκαν χρήσιμα για την κατανόηση της δράσης του αναστολέα, επιβεβαίωσαν την συμβολή της DNA-PK στην επιδιορθωτική διαδικασία και έδειξαν ότι η χρήση του αναστολέα μπορεί να επεκταθεί σε ανώτερο επίπεδο μελέτης, *in vivo*.

ABSTRACT

The main subject of the present master thesis is the repair mechanisms of DNA. Damage on the genetic material of cells, in all organisms, display a huge variety, mostly regarding complexity. From this point of view, double strand breaks(DSB) and non DSB, oxidatively-induced clustered DNA lesions are the most important ones. Given that, the inactivation of repair mechanisms of these damages, is being widely used in radiotherapy, as it is able, combined with the use of radiation, to lead to cell death or apoptosis of cancer cells. The repair of this kind of damage is happening through two main mechanisms, the homologous recombination (HR) and non-homologous end joining(NHEJ). In NHEJ, DNA-PK(DNA dependent protein kinase) has a very important role in the repair pathway. Deactivation of this kinase can lead to the deactivation of the hole repair pathway. In the last few years, lots of chemical molecules that can deactivate DNA-PK have been tested and amongst them, NU7026, an inhibitor which can chemically deactivate DNA-PK.

The action of the inhibitor has been studied on molecular level, by using immunofluorescence techniques(with use of γ H2AX phosphorylated histone as a biomarker), on cytogenetic level by using clonogenic survival assays and on a biodosimetry level by using micronuclei detection assay. Results of the experimental procedures showed that the combination of the inhibitor with radiation may result in an increase the amount of non repaired damage , compared to the increase of damage caused by the inhibitor alone. In addition, results showed that the action of the inhibitor combined with radiation is time dependent and it decreases after 24 hours of induction. The conclusions that arrived have been proven to be useful in understand the mechanism of action of the inhibitor, have confirmed the contribution of DNA-PK in the repair procedure and showed that the use of NU7026 can be extended to a higher level of research, that is in vivo.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

1.8 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΩΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΩΝ

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι ακτινοβολία που έχει ενέργεια ικανή να αλληλεπιδράσει με την ύλη. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να έχει την μορφή ιονισμού ατόμων, διάσπασης χημικών δεσμών ή απλώς διέγερσης ατόμων σε ανωτέρα ενεργειακά επίπεδα. Στην αλληλεπίδραση της με την ύλη μπορεί να προκαλέσει βλάβες στους ζωντανούς οργανισμούς σε επίπεδο κυττάρου καθώς και σε επίπεδο οργάνων και οργανισμού. Η ιοντίζουσα ακτινοβολία, από όπου και αν προέρχεται, αποτελείται είτε από φορτισμένα σωματίδια με μάζα, όπως φορτισμένα πρωτόνια, ηλεκτρόνια και νετρόνια, είτε από κβάντα ενέργειας χωρίς μάζα, τα φωτόνια και τα νετρίνα [1].

Οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες μπορεί να προέρχονται είτε από φυσικές πηγές είτε από τεχνητές.

6.8.1 Φυσικές πηγές Ιοντιζουσών Ακτινοβολιών

Κοσμική Ακτινοβολία

Η κοσμική ακτινοβολία είναι ακτινοβολία που προέρχεται από το διάστημα. Έχει την μορφή ελαφρών πυρήνων κυρίως σωματιδίων α (πυρήνες ηλίου), πρωτονίων και ηλεκτρονίων καθώς και νετρίνων και ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων. Για τη Γη, η πιο κοντινή πηγή τέτοιων κοσμικών ακτινοβολιών είναι ο Ήλιος. Ένα μεγάλο ποσοστό των φορτισμένων ηλεκτρονίων και πρωτονίων που εισέρχονται στην ατμόσφαιρα της γης προέρχεται από τις ηλιακές εκρήξεις και τις ηλιακές κηλίδες που λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια του Ήλιου. Τα σωματίδια αυτά, μόλις έρθουν σε επαφή με τα σωματίδια της ατμόσφαιρας της γης, προκαλούν την δημιουργία αντιδράσεων και άρα επανεκπομπή ακτινοβολίας και άλλων ανιχνεύσιμων σωματιδίων, όπως τα βραχύβια μεσόνια και λεπτόνια. Υπάρχουν επίσης και οι ακτινοβολίες που προέρχονται από το εσωτερικό του ηλίου, λόγω κυκλικών αντιδράσεων πυρηνικής σύντηξης, οι οποίες είναι νετρίνα υψηλής ενέργειας. Η ανίχνευση αυτής της ακτινοβολίας καθώς και η μέτρηση της ενεργειακής της κατανομής γίνεται από ειδικές ανιχνευτικές εγκαταστάσεις, οι οποίες βρίσκονται σε διάφορα ύψη, όπως πάνω από την ατμόσφαιρα με χρήση αερόστατων, δορυφόρων και διαστημοπλοίων, αλλά ακόμα και από υποθαλάσσιες εγκαταστάσεις, κυρίως για ανίχνευση νετρίνων (π.χ. ανιχνευτής νετρίνων NESTOR στην Πύλο ή υποβρύχιος ανιχνευτής ANTARES - εικόνα 1.1).

Πηγές του εδάφους

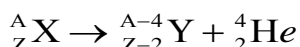
Μια δεύτερη φυσική πηγή ιοντιζουσών ακτινοβολιών είναι το έδαφος ή πιο ειδικά, ουσίες που βρίσκονται στο υπέδαφος. Η πηγή αυτή βρέθηκε από τον Becquerel το 1896 όταν παρατήρησε εκπομπή ενέργειας από ορυκτά Ουρανίου. Οι πυρήνες Ουρανίου και των άλλων ραδιενεργών στοιχείων είναι βαρείς πυρήνες, οι οποίοι διασπώνται σε άλλους ελαφρύτερους πυρήνες εκπέμποντας ακτινοβολία. Στο έδαφος και στα διάφορα πετρώματα περιέχονται κάποιες ποσότητες Ουρανίου και Θορίου μαζί με τα παράγωγα τους. Η συγκέντρωση αυτών των στοιχείων διαφέρει ανάλογα με το είδος του πετρώματος και ουσιαστικά αυτή καθορίζει το ποσό της ακτινοβολίας που εκπέμπει μια ουσία, δηλαδή το πόσο ραδιενεργή είναι. Οι ζωντανοί οργανισμοί είναι λοιπόν εκτεθειμένοι σε ραδιενέργεια, από τον αέρα που αναπνέουν έως τις τροφές και τα υλικά που βρίσκονται γύρω τους. Σε αυτό συμβάλλουν ιδιαίτερος τα αέρια προϊόντα μετάπτωσης του Ουρανίου και του Θορίου, το Ραδόνιο και το Θορόνιο αντίστοιχα. Τα αέρια αυτά διαχέονται στην ατμόσφαιρα και άρα εισέρχονται στον άνθρωπο και τα ζώα με την αναπνοή και την τροφή. Το ανθρώπινο σώμα περιέχει μικρές ποσότητες ισοτόπων Άνθρακα-14 (^{14}C) και Κάλιου-40 (^{40}K), εκ των οποίων το πρώτο προέρχεται από την ατμόσφαιρα ενώ το δεύτερο εμφανίζεται φυσικά στο σώμα. Η ακτινοβολία που προέρχεται από φυσικές πηγές διαχωρίζεται σε τρία είδη, την εκπομπή σωματιδίων α (πυρήνες ηλίου), σωματιδίων β (ηλεκτρόνια) και ακτινών γ.



Εικόνα 1.1: Ο υποθαλάσσιος ανιχνευτής νετρίνων ANTARES σε μια σχηματική αναπαράσταση.

Εκπομπή σωματιδίων α

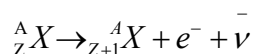
Η εκπομπή πυρήνων He δημιουργείται κατά την μετάπτωση βαρέων πυρήνων ραδιενεργών στοιχείων σε άλλους ελαφρύτερους πυρήνες. Είναι ένα φαινόμενο το οποίο έχει τη φυσική του ερμηνεία στο φαινόμενο σήραγγας, κατά το οποίο ένας πυρήνας ηλίου καταφέρνει να ξεπεράσει το δυναμικό Coulomb που δημιουργεί ο πυρήνας και διαφεύγει. Έτσι ο πυρήνας που προκύπτει είναι κατά 4 νουκλεόνια πιο ελαφρύτερος (2 πρωτόνια και 2 νετρόνια) άρα και πιο σταθερός. Η αντίδραση αυτή περιγράφεται σχηματικά ως εξής:



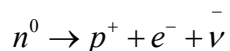
όπου X ονομάζεται ο μητρικός πυρήνας και Y ο θυγατρικός.

Εκπομπή σωματιδίων β

Η εκπομπή β περιγράφει ουσιαστικά δύο διασπάσεις: τη διάσπαση β⁺ και τη διάσπαση β⁻. Η διάσπαση β⁻ είναι μια πυρηνική αντίδραση κατά την οποία έχουμε μεταστοιχείωση ενός πυρήνα από ατομικό αριθμό N σε ατομικό αριθμό N+1, με ταυτόχρονη εκπομπή ενός ηλεκτρονίου. Η αντίδραση αυτή έχει την μορφή:



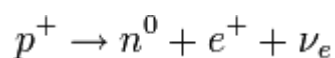
Παρατηρούμε ότι κατά την αντίδραση ο μαζικός αριθμός του ατόμου παραμένει σταθερός. Αυτό συμβαίνει διότι κατά τη διάσπαση επί της ουσίας πραγματοποιείται η παρακάτω μετατροπή, δηλαδή η μετατροπή ενός νετρονίου σε ένα πρωτόνιο, ένα ηλεκτρόνιο και ένα αντινεutrino του ηλεκτρονίου:



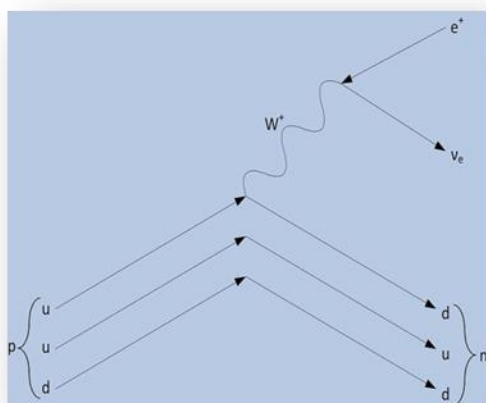
Η αντίδραση αυτή μάλιστα είναι και ο ουσιαστικός λόγος της εισαγωγής του νετρίνο ως σωματίδιο στην θεωρία στοιχειωδών σωματιδίων από τον Pauli το 1930, στην προσπάθεια του να ερμηνεύσει την ενεργειακή διάφορα που πρόεκυπτε στις διασπάσεις β. Συγκεκριμένα, το σωματίδιο β που εκπεμπόταν, σε αντίθεση με μια προσδοκώμενη σταθερή τιμή ενέργειας, παρουσίαζε ένα

συνεχές φάσμα ενεργειών. Η ερμηνεία ήταν ότι θα έπρεπε να υπάρχει και κάποιο άλλο, μη ανιχνεύσιμο σωματίδιο που θα κάλυπτε την διάφορα ενέργειας και ορμής που παρατηρούνταν. Εν τέλει το νεutrίνο βρέθηκε και πειραματικά το 1956.

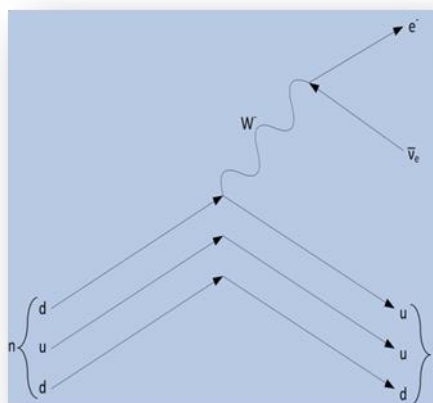
Κατά τη διάσπαση β^+ έχουμε αντίστοιχα την μετατροπή ενός πρωτονίου του θυγατρικού πυρήνα σε ένα νετρονίο, ένα ποζιτρόνιο και ένα νεutrίνο του ηλεκτρονίου αντίδραση που παίρνει σχηματικά την μορφή:



Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 1.2, Εικόνα 1.3) φαίνονται τα διαγράμματα Feynman για τις διασπάσεις του πρωτονίου και του νετρονίου.



Εικόνα 1.2: Διάγραμμα Feynman της διάσπασης β^+ .

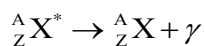


Εικόνα 1.3: Διάγραμμα Feynman της διάσπασης β^- .

Εκπομπή ακτίνων γ

Εκπομπή ακτίνων γ παρατηρείται κατά την αποδιέγερση ενεργειακά διεγερμένων πυρήνων. Η διαδικασία της πυρηνικής αυτοδιέγερσης συμβαίνει όταν διεγερμένοι πυρήνες εκπέμπουν ένα ποσοστό της ενέργειας που έχουν υπό την μορφή φωτονίων έτσι ώστε να επιστρέψουν σε μια λιγότερο διεγερμένη κατάσταση ή ακόμα και στην θεμελιώδη. Τα φωτόνια που εκπέμπονται κατά την διαδικασία ονομάζονται ακτινοβολία γ . Είναι φωτόνια υψηλής ενέργειας, που κυμαίνεται από 1MeV έως 1GeV. Οι πυρήνες που εκπέμπουν την ακτινοβολία γ είναι συνήθως πυρήνες οι οποίοι έχουν

προέρθει από μια άλλη πυρηνική διάσπαση και κατά τη διάρκεια της αυτοδιέγερσης δεν μεταστοιχειώνονται. Έτσι μπορούμε σχηματικά να περιγράψουμε την διαδικασία ως εξής:



όπου το X^* συμβολίζει τον πυρήνα σε διεγερμένη κατάσταση.

6.8.2 Τεχνητές πηγές ιοντιζουσών ακτινοβολιών

Ο άνθρωπος εφηύρε τεχνητές πηγές παραγωγής ακτινοβολιών κατά τα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Έκτοτε η συστηματική έρευνα οδήγησε τόσο στην εκτεταμένη χρήση τους, όσο και στη λήψη μέτρων για την προστασία από τις ενδεχόμενες βλαβερές επιπτώσεις τους.

1.9 ΔΙΕΙΣΔΥΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΩΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΩΝ

Οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες έχουν την ιδιότητα να εισχωρούν μέσα στην ύλη, να αλληλεπιδρούν και να χάνουν ένα μέρος της ενέργειας τους, το οποίο απορροφά η ύλη στην οποία εισήλθαν. Βέβαια, δεδομένων των χαρακτηριστικών κάθε ακτινοβολίας ο τρόπος αλληλεπίδρασης διαφέρει.

Η ακτινοβολία α είναι ακτινοβολία μικρής εμβέλειας. Αυτό συμβαίνει διότι είναι πολύ βαριά σωματίδια και κινούνται σχετικά αργά μέσα από την ύλη με αποτέλεσμα η πιθανότητα αλληλεπίδρασης να είναι πολύ μεγάλη. Τα σωματίδια χάνουν έτσι πολύ γρήγορα όλη τους την ενέργεια άρα δεν μπορούν και να εισχωρήσουν σε μεγάλο βάθος. Δεν μπορούν να διαπεράσουν ένα φύλλο χαρτί, ούτε και το δέρμα μας, πράγμα που τις κάνει ακίνδυνες για τον άνθρωπο. Παρόλα αυτά η ακτινοβολία είναι επικίνδυνη αν με οποιοδήποτε τρόπο εισέρθει στο ανθρώπινο σώμα.

Η ακτινοβολία β αποτελείται από ηλεκτρόνια ή ποζιτρόνια, άρα είναι πολύ πιο ελαφριά από την ακτινοβολία α , άρα αλληλεπιδρά λιγότερο με την ύλη. Αυτό την κάνει πιο διεισδυτική ακτινοβολία από την α , αφού μπορεί να διαπεράσει λίγα λεπτά φύλλα πλαστικού ή μετάλλου. Η διεισδυτικότητα της στα κύτταρα φτάνει το 1 cm, πράγμα που την καθιστά σχετικά ακίνδυνη για τον άνθρωπο, εκτός από περιπτώσεις όπου ένας β -εκπομπός εισέρθει στο σώμα.

Οι ακτινοβολίες γ και x είναι ακτινοβολίες υψηλής ενέργειας, άρα και πολύ διεισδυτικές μέσα στην ύλη. Μπορούν να διασχίσουν μεγάλες αποστάσεις και έτσι θεωρούνται επικίνδυνες για τον άνθρωπο. Για την προστασία από τις ακτινοβολίες αυτές απαιτούνται αρκετά φύλλα μολύβδου ή κάποιο άλλο πυκνό μέσο.

Εξαιρετικά δεισδυτική και επικίνδυνη είναι η ακτινοβολία νετρονίων. Τα νετρόνια προέρχονται κατά κύριο λόγο από πυρηνικές διασπάσεις και χάνουν την ενέργειά τους με μια σειρά από αλληλεπιδράσεις. Για το λόγο αυτό χωρίζονται σε τουλάχιστον 3 κατηγορίες, τα θερμικά, τα γρήγορα και τα μεσαία. Η προστασία που απαιτείται είναι πολύ μεγάλη και επιτυγχάνεται συνήθως με πολλαπλά στρώματα μπετόν και ειδικά συστήματα ψύξης. [1]

1.10 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ

Κατά την ακτινοβόληση έμβιας ύλης, η ενέργεια που απορροφάται επιφέρει αλλαγές στο βιολογικό υλικό. Οι βιολογικές αυτές μεταβολές κατηγοριοποιούνται στα εξής τρία στάδια:

- το φυσικό στάδιο, το οποίο έχει διάρκεια περίπου 10^{-13} sec,
- το χημικό στάδιο διάρκειας περίπου 10^{-10} sec και
- το βιολογικό στάδιο με διάρκεια που εκτείνεται από μερικά λεπτά έως και ολόκληρες γενεές κι εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, οι οποίοι θα αναλυθούν παρακάτω.

Το φυσικό στάδιο και το βιολογικό έχουν μελετηθεί εκτενώς ενώ το χημικό όχι. Το σίγουρο είναι πως τα στάδια αυτά είναι διαδοχικά και αλληλένδετα καθώς και ότι οι βιολογικές επιδράσεις εξαρτώνται άμεσα από το φυσικό στάδιο, δηλαδή από παράγοντες όπως η δόση της ακτινοβολίας καθώς και από παράγοντες που σχετίζονται με την απορρόφησή της από την ύλη.

6.10.1 Φυσικό στάδιο

Κατά το στάδιο αυτό η ιοντίζουσα ακτινοβολία που εισχωρεί στην υλη, αποδίδει ενέργεια υπό την μορφή ιοντισμού ατόμων, δημιουργώντας δηλαδή ιόντα, και διεγέρσεων. Το ποσό της ενέργειας που αποτίθεται με εξαρτάται από το είδος της ακτινοβολίας και από τη γραμμική μετάδοση ενέργειας (L.E.T.). Η LET είναι ένα μέγεθος που μετρά την εναπόθεση της ενέργειας μιας δέσμης ακτινοβολίας καθώς διέρχεται μέσα από την ύλη. Είναι ένα μέγεθος το οποίο περιγράφεται από τη σχέση:

$$L = \frac{\Delta E}{\Delta l} \quad (\text{KeV/cm στο SI})$$

Όπου ΔE είναι η απώλεια ενέργειας της δέσμης που έχει διανύσει Δl απόσταση μέσα στην βιολογική υλη. Το ουσιαστικό κομμάτι του σταδίου αυτού είναι φυσικά οι ιοντισμοί που λαμβάνουν χώρα κατά μήκος της διαδρομής της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Το εύρος του ιοντισμού του βιολογικού υποθέματος έχει να κάνει με τον δείκτη LET της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Ακτινοβολίες με υψηλό LET προκαλούν αυξημένη συγκέντρωση ιοντισμών και διεγέρσεων. Αντίθετα ακτινοβολίες με χαμηλό δείκτη προκαλούν λίγους ιοντισμούς. Η σημασία των ιοντισμών στην επίδραση της ακτινοβολίας έχει

να κάνει με τους χημικούς δεσμούς που δημιουργούνται ή σπάνε κατά τη διαδικασία αυτή και θα αναλυθεί στην επομένη παράγραφο. [2]

6.10.2 Χημικό στάδιο

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στο προηγούμενο στάδιο της αλληλεπίδρασης δημιουργούνται ιοντισμένα άτομα και ελεύθερα ηλεκτρόνια στην έμβια ύλη. Όπως είναι γνωστό, η έμβια ύλη αποτελείται σε ένα μεγάλο ποσοστό της, περίπου 60 – 80 %, από νερό. Άρα κατά κύριο λόγο με την επίδραση της ακτινοβολίας συντελείται η αντίδραση της ραδιόλυσης του νερού. Κατά την ραδιόλυση παράγονται ιόντα H_2O^- και H_2O^+ σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:



Τα ιόντα αυτά διασπώνται σχεδόν αμέσως παρέχοντας ελεύθερες ρίζες υδρογόνου και υδροξυλίου οι οποίες είναι εξαιρετικά δραστικές και επιφέρουν μια πληθώρα αλληλεπιδράσεων. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ελεύθερων ριζών, παράγουν προϊόντα όπως H_2O_2 , H_2O ή H_2 , ενώ οι αλληλεπιδράσεις ελεύθερων ριζών με τα παράγωγα τους μπορούν να παράξουν περαιτέρω ελεύθερες ρίζες. Ακόμα, δημιουργούνται αλληλεπιδράσεις των ελεύθερων αυτών ριζών με μόρια οργανικών ριζών με αποτέλεσμα την μετατροπή των μορίων αυτών σε εξαιρετικά δραστικές ελεύθερες ρίζες σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:

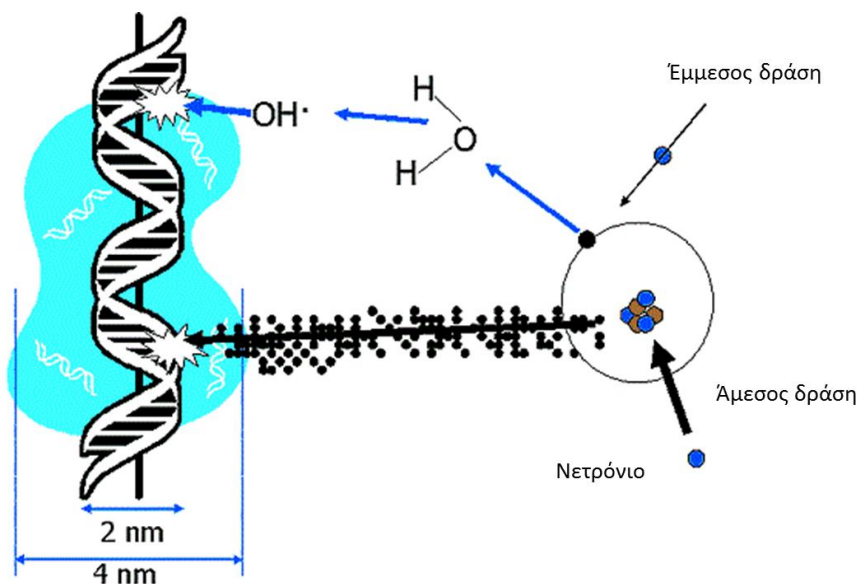


Όπου RH συμβολίζει ένα μόριο μεγαλομοριακής οργανικής ουσίας. Οι βλάβες που προκαλούνται στα έμβια συστήματα από την δράση αυτή των ελεύθερων ριζών καλούνται *έμμεσο δράση* της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Οι βλάβες οι οποίες προκαλούνται από την έμμεσο δράση είναι εξαιρετικά επιβλαβείς, όπως και οι βλάβες που προκαλούνται από τον απευθείας ιοντισμό των ατόμων, δηλαδή στην άμεσο δράση των ιοντίζουσών ακτινοβολιών, κατά την οποία συντελούνται αλλαγές λόγω ιοντισμού σε μακρομόρια όπως το DNA, τα οποία λόγω μοναδικότητας προκαλούν σημαντικές βλάβες στα κύτταρα. [2]

6.10.3 Βιολογικό στάδιο

Το βιολογικό στάδιο είναι αυτό που ακολουθεί τα δύο προηγούμενα. Πρόκειται για το στάδιο όπου μελετάται η επίδραση της ακτινοβολίας στη λειτουργία απλών και σύνθετων πολυκύτταρων

οργανισμών. Ενώ τα προηγούμενα στάδια συμβαίνουν σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα, το βιολογικό στάδιο μπορεί να διαρκέσει από λίγα λεπτά έως και γενεές. Αυτό οφείλεται στην πολυπλοκότητα των βιολογικών συστημάτων και κυρίως στο ότι είναι ανοικτά συστήματα. Η αλλοίωση για παράδειγμα μιας πρωτεΐνης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ελλιπή της λειτουργία στην παρασκευή ενός ενζύμου, το οποίο ευθύνεται για μια συνολικότερη λειτουργία του οργανισμού. Αυτό βέβαια οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι αλλοιώσεις που συμβαίνουν σε επίπεδο μακρομορίων ή κυττάρων δρουν πολλαπλασιαστικά καθώς ανεβαίνουμε τα επίπεδα οργάνωσης ενός οργανισμού. Βέβαια κατά την διάρκεια αυτού του σταδίου ο κάθε οργανισμός θέτει σε λειτουργία επιδιορθωτικούς μηχανισμούς που είναι σε θέση να επιδιορθώσουν τις προσκληθείσες βλάβες. Η έκταση των βλαβών σε αυτό το επίπεδο, ακόμα και μετά την δράση των επιδιορθωτικών μηχανισμών, διαφέρει από ένα σύστημα σε ένα άλλο. Αυτό εξαρτάται από παράγοντες όπως η ένταση της ακτινοβολίας, η διάρκεια της έκθεσης σε αυτήν, καθώς και η ακτινοευαισθησία του συστήματος, ένας παράγοντας ο οποίος απασχολεί την παρούσα εργασία . [2]

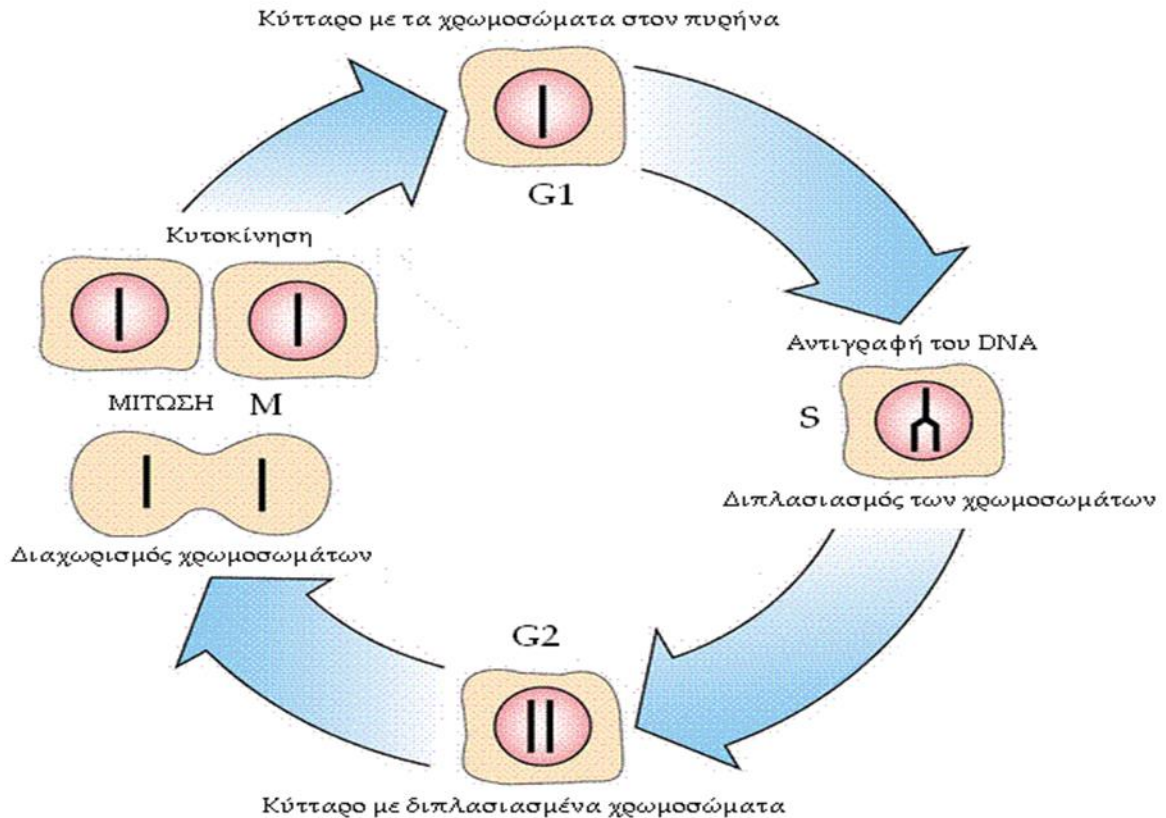


Εικόνα 1.4: Άμεσος (Direct action) και Έμμεσος (Indirect action) δράση της ακτινοβολίας στο DNA των κυττάρων.

1.11 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

«Εκεί όπου εμφανίζεται ένα κύτταρο πρέπει να προϋπάρχει ένα άλλο κύτταρο, όπως ακριβώς τα ζώα προέρχονται μόνο από άλλα ζώα και τα φυτά από άλλα φυτά». Αυτό το κυτταρικό δόγμα που διατυπώθηκε το 1858 από τον Γερμανό παθολογοανατόμο Rudolf Virchow, μετέδωσε ένα σημαντικό μήνυμα για τη συνέχεια της ζωής. Τα κύτταρα παράγονται από κύτταρα και ο μοναδικός τρόπος για την παραγωγή περισσότερων κυττάρων είναι η διαίρεση των ήδη υπαρχόντων.

Ένα κύτταρο αναπαράγεται διεκπεραιώνοντας μια ιεραρχική ακολουθία γεγονότων κατά τη διάρκεια των οποίων διπλασιάζει το περιεχόμενό του και κατόπιν διαιρείται στα δύο. Αυτός ο κύκλος διπλασιασμού και διαίρεσης, γνωστός ως κυτταρικός κύκλος (cell cycle), είναι ο βασικός μηχανισμός με τον οποίο αναπαράγονται όλα τα έμβια όντα. Οι λεπτομέρειες του κυτταρικού κύκλου ποικίλλουν από οργανισμό σε οργανισμό όπως επίσης και ανάλογα με τη διαφορετική φάση της ζωής του. Ωστόσο, ορισμένα χαρακτηριστικά είναι οικουμενικά: ο κυτταρικός κύκλος περιλαμβάνει τουλάχιστον ορισμένες διεργασίες τις οποίες πρέπει να διεκπεραιώσει ένα κύτταρο για να επιτύχει το βασικότερο στόχο του, δηλαδή να αντιγράψει τις γενετικές πληροφορίες του και να τις μεταβιβάσει στην επόμενη κυτταρική γενιά. Για να παραχθούν δύο γενετικώς ταυτόσημα θυγατρικά κύτταρα, το DNA κάθε χρωμοσώματος πρέπει να αντιγραφεί με πιστό τρόπο και στη συνέχεια, τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα πρέπει να διαχωριστούν επακριβώς, έτσι ώστε καθένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα να παραλάβει ένα αντίγραφο ολόκληρου του γονιδιώματος. Τις περισσότερες φορές, σε κάθε κυτταρικό κύκλο τα κύτταρα διπλασιάζουν επίσης και τα οργανίδια και τα μακρομόρια τους ειδάλλως, σε κάθε διαίρεση θα γίνονταν μικρότερα.



Εικόνα 1.5: Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Φαίνονται τα στάδια διπλασιασμού του γενετικού υλικού σε κάθε μια φάση(Πηγή διαδύκτιο).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα ο κύκλος της κυτταρικής διαίρεσης χωρίζεται σε δύο περιόδους. Η μεσόφαση είναι η περίοδος κατά την οποία το κύτταρο αυξάνεται, προσλαμβάνοντας θρεπτικές ουσίες απαραίτητες για τον αναδιπλασιασμό του DNA και για την μίτωση. Η μίτωση είναι η περίοδος κατά την οποία το κύτταρο διαιρείται σε δύο ανεξάρτητα θυγατρικά κύτταρα. [3]

6.11.1 Φάσεις του κυτταρικού κύκλου

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από τέσσερις διακριτές φάσεις. Η φάση G_1 , η φάση S (σύνθεση) και η φάση G_2 αποτελούν τη μεσόφαση. Τελευταία φάση του κυτταρικού κύκλου είναι η M (μίτωση). Η φάση M αποτελείται από δύο διαδικασίες: τη μίτωση, στην οποία τα χρωμοσώματα του κυττάρου διανέμονται στα δύο θυγατρικά κύτταρα και την κυτταροκίνηση, στην οποία το κυτταρόπλασμα του κυττάρου διαιρείται σχηματίζοντας δύο διακριτά κύτταρα. Η ενεργοποίηση της κάθε φάσης εξαρτάται από τη σωστή εξέλιξη και συμπλήρωση της προηγούμενης φάσης. Τα κύτταρα τα οποία προσωρινά ή αντιστρεπτά έχουν σταματήσει να διαιρούνται μπαίνουν σε μία κατάσταση

ηρεμίας, τη φάση G_0 . Μετά τη διαίρεση του κυττάρου, κάθε ένα από τα θυγατρικά κύτταρα ξεκινάει τη μεσόφαση ενός νέου κύκλου. Παρόλο που τα διάφορα στάδια της μεσόφασης συνήθως δεν διακρίνονται μορφολογικά, κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου χαρακτηρίζεται από βιοχημικές διαδικασίες που προετοιμάζουν το κύτταρο για την έναρξη της κυτταρικής διαίρεσης.

Φάση αναμονής – ηρεμίας (Φάση G_0)

Τα κύτταρα που δεν πολλαπλασιάζονται στους πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς μπαίνουν από τη φάση G_1 στην G_0 και μπορεί να παραμείνουν εκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, πιθανώς και επ' αόριστον όπως συχνά συμβαίνει στην περίπτωση των νευρώνων. Αυτό το γεγονός είναι πολύ συχνό για κύτταρα τα οποία είναι πλήρως διαφοροποιημένα (εξειδικευμένα να επιτελούν ένα έργο – π.χ. μυϊκά κύτταρα).

Μεσόφαση

Φάση G_1 : Η πρώτη φάση της μεσόφασης, από το τέλος της προηγούμενης φάσης M ως την αρχή της σύνθεσης του DNA ονομάζεται G_1 (G από την αγγλική λέξη Gap που σημαίνει χάσμα). Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης οι βιοσυνθετικές διαδικασίες του κυττάρου, οι οποίες είχαν επιβραδυνθεί σημαντικά κατά τη διάρκεια της μίτωσης (φάσης M), συνεχίζουν με υψηλό ρυθμό. Αυτή η φάση χαρακτηρίζεται από τη σύνθεση διαφόρων ενζύμων κυρίως αυτών που χρειάζονται για την αντιγραφή του DNA, τα οποία είναι απαραίτητα για την φάση S. Η διάρκεια της φάσης αυτής διαφέρει πολύ, ακόμα και ανάμεσα σε διαφορετικά κύτταρα του ίδιου είδους.

Φάση Σύνθεσης (Φάση S): Η επόμενη φάση, φάση S, ξεκινάει όταν αρχίζει η σύνθεση του DNA. Μόλις ολοκληρωθεί, όλα τα χρωμοσώματα έχουν αντιγραφεί, δηλαδή κάθε χρωμόσωμα (πατρικό και μητρικό) έχει δύο αδερφές χρωματίδες. Έτσι κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, η ποσότητα του DNA στο κύτταρο έχει διπλασιαστεί. Ο ρυθμός της μεταγραφής του RNA και της σύνθεσης των πρωτεϊνών, είναι πολύ αργός κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης. Η διάρκεια της φάσης S είναι σχετικά σταθερή ανάμεσα σε κύτταρα του ίδιου είδους.

Φάση G_2 : Το κύτταρο μετά την σύνθεση του DNA μπαίνει στην φάση G_2 , η οποία διαρκεί μέχρι να μπει στη μίτωση. Και σε αυτή τη φάση πάλι, γίνεται η σύνθεση σημαντικών πρωτεϊνών, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διαδικασία της μίτωσης. Η αναστολή της σύνθεσης των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της φάσης G_2 εμποδίζει το κύτταρο να μπει στη μίτωση.

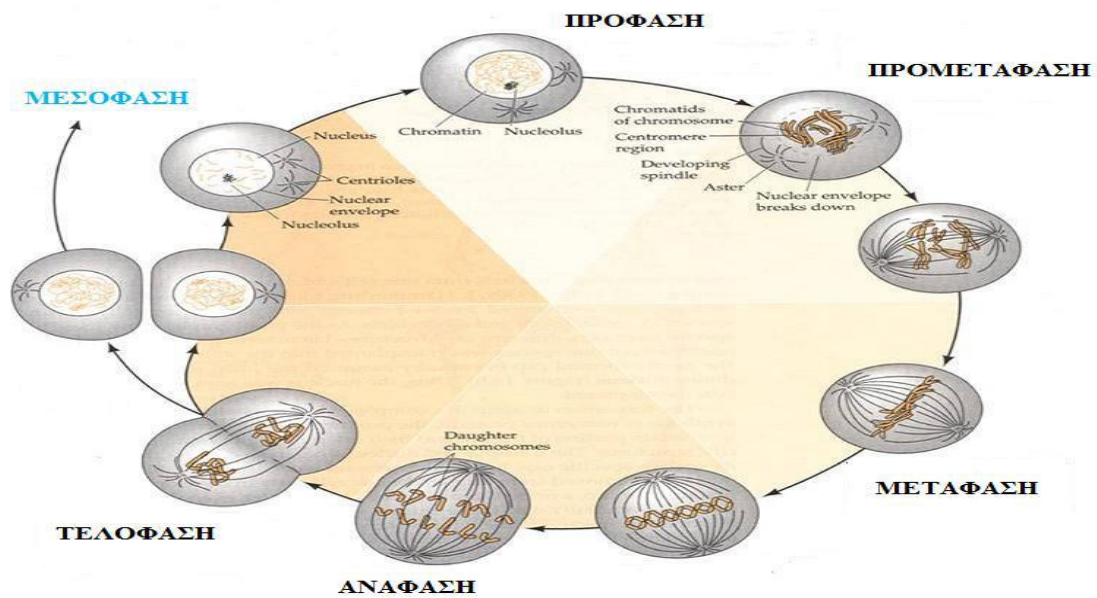
Μίτωση (Φάση Μ)

Η φάση Μ διακρίνεται στη διαίρεση του πυρήνα (καρυοκίνηση) και στην κυτταροπλασματική διαίρεση (κυτταροκίνηση). Η φάση Μ διαιρείται επίσης σε διάφορες επιμέρους φάσεις που σχετίζονται με την συσπείρωση της χρωματίνης και τη θέση των χρωμοσωμάτων, οι οποίες είναι γνωστές ως πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση που οδηγούν στην κυτταροκίνηση. Η Μ φάση είναι σχετικά σύντομη.

6.11.2 Διάρκεια του κυτταρικού κύκλου

Η διάρκεια του κυτταρικού κύκλου είναι διαφορετική για τους διάφορους οργανισμούς. Στα θηλαστικά ο κυτταρικός κύκλος διαρκεί περίπου 24 ώρες. Ο χρόνος του κυτταρικού κύκλου εξαρτάται επίσης και από το χρόνο που χρειάζεται το κύτταρο να επιδιορθώσει τυχόν βλάβες ώστε να μην μεταβιβαστούν στα θυγατρικά κύτταρα.

Η G1 φάση του κυτταρικού κύκλου είναι η μεγαλύτερη, διαρκεί περίπου 10-12 ώρες. Η S φάση διαρκεί περίπου 5-7 ώρες. Η G2 φάση διαρκεί 3 με 4 ώρες και η φάση Μ μισή με 2 ώρες.



Εικόνα 1.6: Σχηματική αναπαράσταση των φάσεων της μίτωσης(πηγή διαδύκτιο)

6.11.3 Έλεγχος του κυτταρικού κύκλου – σημεία ελέγχου (check points)

Για την διασφάλιση της αμιγούς μεταφοράς της γενετικής πληροφορίας στα θυγατρικά κύτταρα, αλλά και την επιβεβαίωση της επιτυχημένης ολοκλήρωσης της μίας κυτταρικής φάσης για την είσοδο στην άλλη, το κύτταρο διαθέτει μία σειρά από μηχανισμούς ελέγχου μεταξύ των διαδοχικών φάσεων του κυτταρικού κύκλου, **τα σημεία ελέγχου**.

Αναφορικά με τη δομή της χρωματίνης στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου σωματικών κυττάρων, παρουσιάζεται με διαφορετικές μορφές ανάλογα με τον βαθμό συμπίκνωσης. Ο μέγιστος βαθμός συμπίκνωσης παρατηρείται στην φάση της μετάφασης όπου η χρωματίνη οργανώνεται στα χρωμοσώματα για να ακολουθήσει η διαίρεση του κυττάρου. Μετά το τέλος της κυτταρικής διαίρεσης τα χρωμοσώματα αποσυμπιέρονται και παίρνουν ξανά τη μορφή των ινιδίων χρωματίνης, προκειμένου να αντιγραφεί και να εκφραστεί η γενετική πληροφορία του DNA. Ο βαθμός συμπίκνωσης και αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης ρυθμίζεται μέσω των φαινομένων φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης (δηλαδή της προσθήκης ή της αφαίρεσης φωσφορικής ομάδας) των ιστονών (H1 ιστόνη 1). Η H1 με την σειρά της ελέγχεται από παράγοντες του κυτταρικού κύκλου (π.χ. συμπλέγματα **κυκλινών και κινασών**). Τα φαινόμενα αυτά της φωσφορυλίωσης λαμβάνουν χώρα καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και τη Μίτωση, κατά την οποία παρατηρούνται και τα υψηλότερα επίπεδα συμπίκνωσης της χρωματίνης και ενεργότητας του **παράγοντα που προωθεί τη μίτωση, MPF (mitosis promoting factor)**. [3]

Η επαγωγή χρωμοσωματικών αλλοιώσεων και γενικότερα αλλαγών στο γενετικό υλικό του κυττάρου προκαλεί ενεργοποίηση, ανάλογα με το είδος της γενετικής βλάβης, των κατάλληλων μηχανισμών επιδιόρθωσης με σκοπό τη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος. Σε περίπτωση μη επιδιόρθωσης των βλαβών το κύτταρο οδηγείται ή στον κυτταρικό θάνατο ή επιβιώνει φέροντας συγκεκριμένες μεταλλάξεις ή χρωμοσωματικές αλλοιώσεις οι οποίες με την σειρά τους μπορούν να αποτελέσουν αίτιο καρκινογένεσης.

Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου εμποδίζουν σε συγκεκριμένα σημεία την εξέλιξή του, όταν αυτό είναι αναγκαίο για το κύτταρο, επιτρέποντας έτσι την επαλήθευση της ολοκλήρωσης των απαραίτητων διαδικασιών της φάσης και την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Το κύτταρο δε μπορεί να προχωρήσει στην επόμενη φάση μέχρι να ικανοποιηθούν οι απαιτήσεις του σημείου ελέγχου.

Υπάρχουν αρκετά σημεία ελέγχου για να επιβεβαιώνουν ότι το επιβλαβές ή το ατελές DNA δε θα περάσει στα θυγατρικά κύτταρα. Ενδεικτικά αναφέρονται δύο κύρια σημεία ελέγχου: το G_1/S και το G_2/M . Η G_1/S μετάβαση είναι γνωστό και ως περιοριστικό σημείο – σημείο χωρίς επιστροφή.

Τα κύτταρα αντιδρούν στις ιονίζουσες ακτινοβολίες και στις αλλοιώσεις του DNA ενεργοποιώντας τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Τα σημεία ελέγχου ανασχέθουν τον κυτταρικό κύκλο σε συγκεκριμένα σημεία και επιτρέπουν στο κύτταρο να επιδιορθώσει τις βλάβες. Οι ιονίζουσες ακτινοβολίες μπορούν να προκαλούν αναστολή στην G₁, S και στην G₂ φάση του κυτταρικού κύκλου(Πίνακας 1.7) . [4]

<u>Περίοδος</u>	<u>Φάση</u>	<u>Συμβολισμός</u>	<u>Περιγραφή</u>
Ηρεμίας	Gap 0 Gap 1	G0, G1	Μια κατάσταση ηρεμίας όπου το κύτταρο έχει εγκαταλείψει τον κύκλο και έχει σταματήσει να διαιρείται. Το κύτταρο αυξάνει σε μέγεθος. Το σημείο ελέγχου G1/S είναι ένας μηχανισμός ελέγχου που βεβαιώνει ότι όλα είναι έτοιμα για τη σύνθεση του DNA.
Μεσόφαση	Σύνθεση	S	Σε αυτή τη φάση γίνεται η αντιγραφή του DNA. Η δράση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών επάγει όχι όμως για όλα τα κύτταρα ένα σημείο ελέγχου στην S/G2
Μεσόφαση	Gap 2	G2	Το κύτταρο συνεχίζει να αυξάνεται. Το σημείο ελέγχου G2 είναι ένας μηχανισμός ελέγχου που επιβεβαιώνει ότι όλα είναι έτοιμα ώστε το κύτταρο να μπει στη μίτωση και να διαιρεθεί. Δύο διακριτοί μοριακοί μηχανισμοί ελέγχουν τη μετάβαση από την G2 στην M
Μετάφαση	Μίτωση	M	Η αύξηση του κυττάρου σταματάει σε αυτό το στάδιο και η ενέργεια του κυττάρου επικεντρώνεται στη σωστή διαίρεσή του σε δύο θυγατρικά κύτταρα. Ένα σημείο ελέγχου στη μέση της μίτωσης (σημείο ελέγχου μετάφασης) επιβεβαιώνει ότι το κύτταρο είναι έτοιμο να ολοκληρώσει την κυτταρική διαίρεση.

Πίνακας 1.7: Οι διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

1.12 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΩΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΩΝ ΣΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

Τα κύτταρα αποτελούν τις βασικές μονάδες δομής και λειτουργίας των οργανισμών. Συνεπώς η μελέτη της επίδρασης ακτινοβολίας στους οργανισμούς ξεκινά από το επίπεδο των κυττάρων. Όπως προαναφέρθηκε οι βλάβες που προκαλούνται από την ακτινοβολία χωρίζονται στις άμεσες και στις έμμεσες. Οι ιονίζουσα ακτινοβολία προκαλεί μια πλειάδα κυτταρικών αποκρίσεων που μπορεί να έχουν πολύ ισχυρή επίδραση σε κομβικές λειτουργίες των κυττάρων όπως οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί. Επίσης οι ιονίζουσες ακτινοβολίες είναι δυνατό να οδηγήσουν το κύτταρο σε απευθείας κυτταρικό θάνατο ή στην απόπτωση

1.13 Αλλοιώσεις γενετικού υλικού

Οι βλάβες στο DNA των κυττάρων μπορούν να προκληθούν από μια σειρά αιτίες και με βάση την προέλευση των αιτιών αυτών χωρίζονται σε ενδογενείς και εξωγενείς βλάβες. Οι ενδογενείς βλάβες προκαλούνται κατά την διάρκεια κυτταρικών διαδικασιών όπως η αντιγραφή του DNA καθώς και κατά

την διάρκεια κυτταρικών λειτουργιών, δηλαδή από το μεταβολισμό του κυττάρου. Οι εξωγενείς βλάβες προκαλούνται από ιοντίζουσες ακτινοβολίες, από θερμική διάσπαση ουσιών, τοξίνες, μεταλλαξογόνα κτλ.

Η τυχαία εναπόθεση ενέργειας από ιοντίζουσες ακτινοβολίες, μπορούν να προκαλέσουν μια πλειάδα διαφορετικών αλλοιώσεων στο DNA όπως:

- Ρήξη μονής αλυσίδος-μονόκλωνη θραύση (SSB, single strand break)
- Ρήξη διπλής αλυσίδος-διπλόκλωνη θραύση (DSB, double strand break)
- Οξειδωμένες βάσεις (πουρίνες και πυριμιδίνες)
- Αλλοίωση των οργανικών βάσεων και δημιουργία απουρινικών και απυριμιδινικών σημείων (αβασικών σημείων – abasic sites).
- Σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου που προκαλεί μόνιμη παραμόρφωση της δομής του DNA. [5], [6]

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία προκαλεί βλάβες στο DNA μέσω άμεσου ιονισμού και με την παραγωγή υδροξυλικών ριζών που επιτίθενται στο μόριο του DNA και προκαλούν κάποιες, ίσως και όλες τις παραπάνω αλλοιώσεις (έμμεσες βλάβες) [7]. Σε πολλές περιπτώσεις αυτές οι βλάβες, ίδιας ή διαφορετικής φύσεως, μπορούν να προκληθούν σε στενή εγγύτητα σε αντίθετες αλυσίδες, σε μήκος μίας ή δύο περιελίξεων της έλικας[8]. Πολλές θεωρητικές και πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι αυτές οι συγκεντρωμένες βλάβες δεν είναι απαραίτητο να έχουν προκληθεί από πολλαπλές ακτινοβολίας, αλλά μπορούν να προκληθούν από μια μόνη δέσμη. [9], [10]. Τέτοιου είδους ποικιλόμορφες κοντινές αλλοιώσεις στους δύο κλώνους της έλικας του DNA ονομάζονται συγκεντρωμένες αλλοιώσεις του DNA (clustered DNA lesions) [8].

Οι συγκεντρωμένες βλάβες του DNA χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τις δίκλωνες θραύσεις DNA (Double Strand Breaks, DSBs) και τις μη διπλόκλωνες- οξειδωτικές ομαδοποιημένες βλάβες (non-DSB oxidative clustered DNA lesions, OCDLs) [11].

1.14 Διπλόκλωνες και Μονόκλωνες βλάβες του γενετικού υλικού: DSB's, OCDL's

Οι δίκλωνες θραύσεις DNA ορίζονται ως ένα σύμπλεγμα θραύσεων μονής αλυσίδας, με τουλάχιστον ένα σπάσιμο και στις δύο απέναντι αλυσίδες, σε πολύ κοντινή απόσταση[12]. Πρόκειται για πολύ κρίσιμες βλάβες, γιατί η επιδιόρθωση τους θεωρείται πολύ δύσκολη και αν παραμείνουν προκαλούν σοβαρές αλλοιώσεις στο γενετικό υλικό, ικανές να δημιουργήσουν καρκινώματα [13]. Οι μη δίκλωνες - οξειδωτικές συγκεντρωμένες αλλοιώσεις (non-DSB oxidative clustered DNA lesions, OCDLs) ορίζονται ως δύο ή περισσότερες αλλοιώσεις

DNA μέσα σε ένα μικρό τμήμα DNA 1-10 ζευγών βάσεων, συμπεριλαμβανομένων των αβασικών σημείων, των οξειδωμένων πουρίνων/πυριμιδίνων ή των θραύσεων μονής αλυσίδας[14]. Οι βλάβες αυτές μπορούν να προκληθούν από χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας 0-1 Gy, από χημειοθεραπευτικά φάρμακα ή να είναι το αποτέλεσμα ενδογενούς οξειδωτικού στρες. Και αυτού του είδους οι αλλοιώσεις θεωρούνται πολύ δύσκολες στην επιδιόρθωση. [15], [16]

Η βιολογική σημασία των βλαβών DNA έγκειται στην ικανότητα των επιδιορθωτικών μηχανισμών να διορθώσουν τις βλάβες αυτές. Οι πιο απλές βλάβες μπορούν επαρκώς να επιδιορθωθούν μέσω μηχανισμών που χρησιμοποιούν την μία αλυσίδα ως δείκτη για την επιδιόρθωση της άλλης, ώστε να επιδιορθώσουν μια αλλοιωμένη περιοχή είτε συνδέσμους μιας τέτοιας[17]. Όμως, τέτοιοι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί μπορεί να μην λειτουργήσουν σωστά στην περίπτωση που και οι δύο αλυσίδες του DNA έχουν υποστεί βλάβη. Γι αυτό το λόγο οι συγκεντρωμένες βλάβες και στις δύο αλυσίδες μπορεί να δυσκολεύουν το κύτταρο να επιδιορθώσει, ή τουλάχιστον να επιδιορθώσει σωστά, και άρα είναι βαρύνουσας σημασίας στην εξέλιξη ενός όγκου [18].

1.15 Επιδιόρθωση του γενετικού υλικού

Κάθε ένα από τα 10^{14} κύτταρα του ανθρωπίνου σώματος υφίσταται περίπου 10.000 βλάβες στο γενετικό του υλικό κάθε μέρα. Χωρίς το καλύτερο και πιο ακριβές επιδιορθωτικό σύστημα του κόσμου, ο ανθρωπίνος, αλλά και οποιοσδήποτε άλλος οργανισμός δεν θα μπορούσε να επιβιώσει παρά μόνο για λίγες μέρες. Υπεύθυνα για τον επιδιορθωτικό αυτό μηχανισμό είναι περίπου 100 επιδιορθωτικά μόρια τα οποία συμμετέχουν σε περίπου 10 επιδιορθωτικά μονοπάτια, δηλαδή σε αλληλουχίες χημικών αντιδράσεων που καταλήγουν στην επιδιόρθωση του γενετικού υλικού. Τα περισσότερα από αυτά τα μονοπάτια αφορούν στην επιδιόρθωση των αλλοιώσεων μονής αλυσίδας ενώ δύο από αυτά αφορούν στην επιδιόρθωση των αλλοιώσεων διπλής αλυσίδας. Αν κάποια επιδιόρθωση δεν είναι εντελώς ακριβής, το λάθος διατηρείται και μπορεί να περάσει στα θυγατρικά κύτταρα, συντελώντας έτσι σε μια αλληλουχία λαθών του οργανισμού που μπορεί εν τέλει να οδηγήσουν σε νοσήματα όπως ο καρκίνος.[19]

Η όλη διαδικασία περιλαμβάνει δύο στάδια: Τον εντοπισμό της βλάβης και την επιδιόρθωση. Ο εντοπισμός των βλαβών γίνεται από πρωτεΐνες οι οποίες σηματοδοτούν την έναρξη τριών πιθανών διεργασιών: α) Απόπτωση, δηλαδή τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, στην περίπτωση που οι βλάβες είναι μη επιδιορθώσιμες, β) Έναρξη μονοπατιών επιδιόρθωσης και γ) ανάσχεση του κυτταρικού κύκλου-αναμονή(cell cycle arrest).

Η διαδικασία της επιδιόρθωσης περιλαμβάνει, αμέσως μετά τον εντοπισμό της βλάβης, την παρουσία πληθώρας πρωτεϊνών γύρω από τα αλλοιωμένα σημεία ή τις θραύσεις. Συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον εντοπισμό σφαλμάτων σχηματίζει

Εστίες φθορισμού, εφόσον επισημανθούν με τις κατάλληλες θφορίζουσες ουσίες, foci πάνω ή πολύ κοντά σε περιοχές που όντως υπάρχουν θραύσεις διπλής έλικας του DNA (DSBs) [20].

γ – H2AX

Μια από τις πρώτες αποκρίσεις του κυττάρου στις DSBs είναι η φωσφορυλίωση της ιστόνης 2 A, μιας ιστόνης της οικογένειας X, της H2AX στην σερίνη 139(SER 139). Η φωσφορυλιωμένη ιστόνη γ-H2AX ενεργοποιεί μια πληθώρα άλλων πρωτεϊνών και δημιουργεί διακριτές περιοχές, εστίες φθορισμού, στην περιοχή της βλάβης [21], [22]. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ του αριθμού των εστιών και του αριθμού των DSBs μετά από μία βλάβη [23], [24] και ότι οι εστίες της φωσφορυλιωμένης ιστόνης H2AX είναι ένας αξιόπιστος δείκτης για την ποσοτικοποίηση των DSBs. Για την διαμόρφωση της γH2AX ενεργοποιούνται διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες, οι σημαντικότερες από τις οποίες είναι οι ATM-MRN, ATR και DNA-PKcs. Η ATM κινάση(ataxia telangiectasia mutated) παίζει κύριο ρόλο στην φωσφορυλίωση της H2AX καθώς είναι από τις πρώτες κινάσες που ενεργοποιούνται κατά την κυτταρική απόκριση στις DSBs [25]. Η κινάση ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related) ανήκει κι αυτή στην ευρύτερη οικογένεια κινασών PIKK(Phosphoinositide Kinase-Related Kinases) που βασικό ρόλο έχουν την έναρξη μηχανισμών κατά τον εντοπισμό αλλοιώσεων. Η DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα της DNA-PK, είναι δομικά συναφής με την ATM, της οποίας ο ρόλος θα αναλυθεί εκτενώς σε επόμενη παράγραφο, καθώς είναι ένα από τα βασικά εργαλεία για την ανίχνευση των DSBs.

6.15.1 Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί

Εν συνεχεία στη διαδικασία της επιδιόρθωσης, και μετά την ανίχνευση των αλλοιώσεων του γενετικού υλικού, βρίσκονται οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί. Σε αντίθεση με το ενδογενές οξειδωτικό στρες, το οποίο προκαλεί βλάβες χαμηλής πολυπλοκότητας και άρα εύκολες στην επιδιόρθωση, οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες έχουν αποδειχθεί ότι προκαλούν βλάβες στο DNA εξαιρετικής πολυπλοκότητας και άρα επιδιορθώνονται πολύ πιο δύσκολα [26].

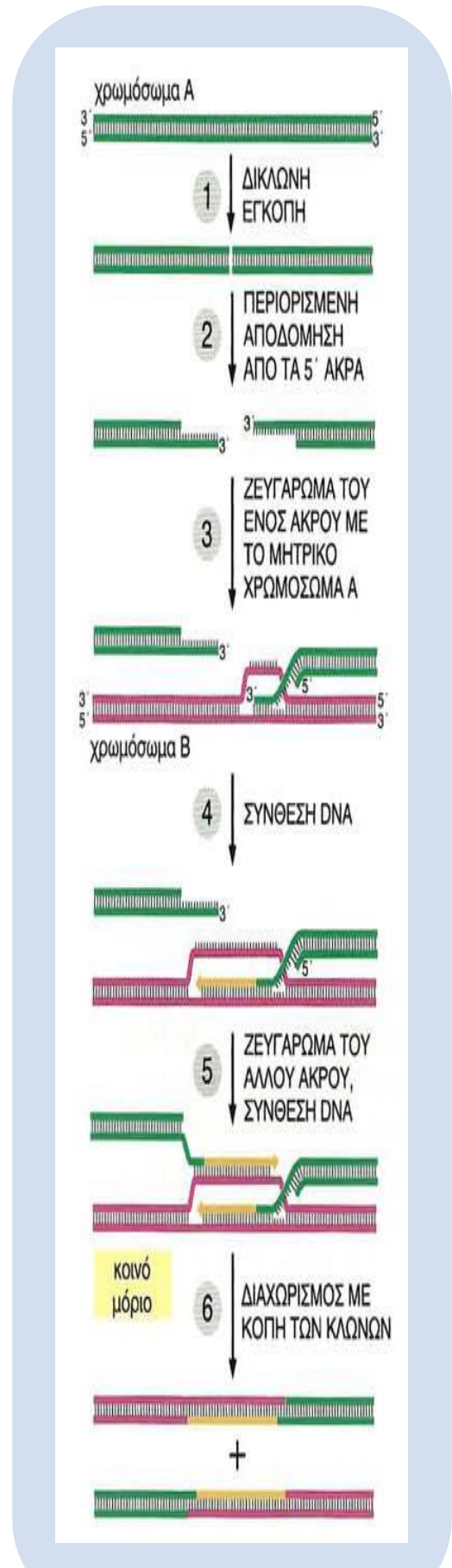
Οι αλλοιώσεις οξειδωμένων βάσεων επιδιορθώνονται κυρίως μέσω του μηχανισμού Base Excision Repair, ενώ οι θραύσεις διπλής έλικας επιδιορθώνονται κυρίως μέσω της μη-ομόλογης σύνδεσης άκρων non-homologous end joining (NHEJ) και του ομόλογου ανασυνδυασμού homologous

recombination(HR) [27]. Παρότι οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί είναι συνήθως πολύ ακριβείς, υπάρχει αυξημένη πιθανότητα κάποιες βλάβες (όπως η 8-oxodG) να επιβιώσουν της επιδιόρθωσης και να μπουν στο στάδιο της αντιγραφής. Σε αυτήν την περίπτωση, το κύτταρο ενεργοποιεί ακόμα έναν μηχανισμό, τον MMR (MisMatch Repair). Ο MMR λειτουργεί έτσι ώστε να εντοπίζει και να διορθώνει τον μικρό αριθμό των λαθών στα ζεύγη των βάσεων, τα οποία μπορούν να προκύψουν ακόμα και κατά την διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης ή μετά από την εμφάνιση βλάβης. Αλλοιώσεις και δυσλειτουργίες στα γονίδια του MMR έχουν εντοπιστεί σε καρκίνους του εντέρου και απώλεια του μηχανισμού αυτού σχετίζεται με ένα μεγάλο μέρος νεοπλασιών όπως της παιδικής λευχαιμίας και των καρκίνων του προστάτη και του παχέος εντέρου [28], [29].

Συνοπτικά οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί είναι:

Επιδιόρθωση βλαβών της μίας αλυσίδας του DNA
(Single Strand Breaks, SSBs ή OCDLs)

- **Mismatch repair (MMR):** Διορθώνει σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA τα οποία οδηγούν στην εισαγωγή μίας ή λίγων (2-4) λανθασμένων (αλλά όχι αλλοιωμένων) βάσεων
- **Base excision repair (BER):** Διορθώνει αλλοιώσεις μίας μόνο βάσης νουκλεοτιδίου (οξειδωση, μεθυλίωση, αποπουρίνωση ή απαμίνωση) και single strand breaks
- **Nucleotide excision repair (NER):** Διορθώνει αλλοιώσεις που εκτείνονται σε δύο ή περισσότερα νουκλεοτίδια(για παράδειγμα μερή θυμίνης) και την προσθήκη ογκωδών μορίων.



Σχημα 1.8: Ομόλογος ανασυνδυασμός(Πηγή: Alberts, Βασικές αρχές κυτταρικής Βιολογίας-Εισαγωγή στην μοριακή βιολογία του κυττάρου. Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2000)

Επιδιόρθωση βλαβών διπλής αλυσίδας (Double Strand Breaks, DSBs).

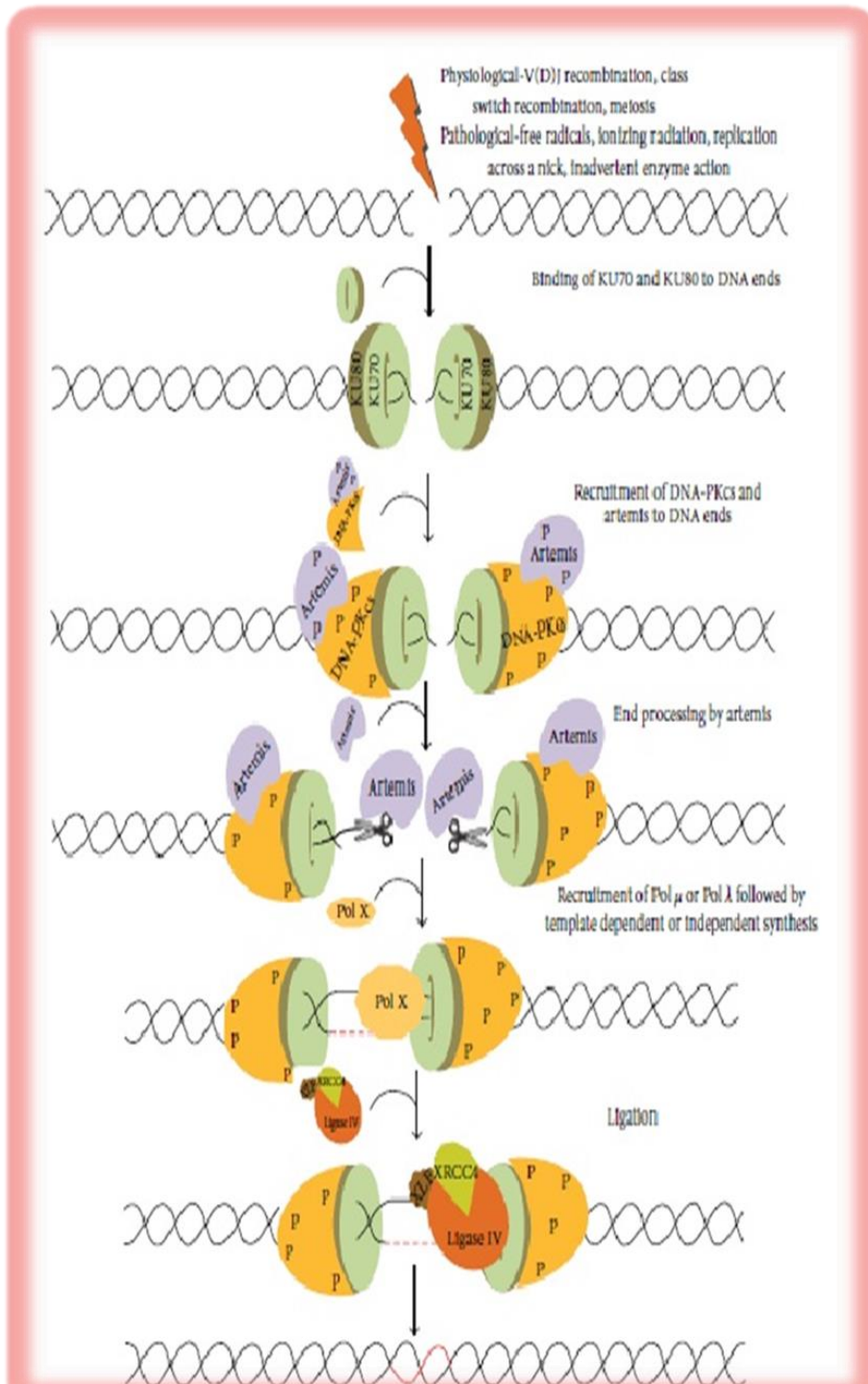
- **Ομόλογος Ανασυνδυασμός:**

Ο ομόλογος ανασυνδυασμός (Homologous Recombination) είναι ο πιο ακριβής μηχανισμός επιδιόρθωσης των δίκλωνων θραύσεων και περιλαμβάνει μια πληθώρα πρωτεϊνών όπως τις RAD50, MRE11, NBS1, RAD51, και RAD54. Η διαδικασία, αφού γίνει η ανίχνευση της βλάβης, ξεκινάει με την ενζυματική αποκοπή και των δύο κλώνων της έλικας, και τη δημιουργία ενός πλήρους ρήγματος στο μόριο του DNA. Στη συνέχεια, τα 5' άκρα του ρήγματος αποδομούνται από ένα ένζυμο που πέπτει το DNA αφήνοντας τα άκρα 3' να προεξέχουν. Καθένα από αυτά τα μονόκλινα τμήματα αναζητά μια ομόλογη συμπληρωματική αλυσίδα για να ζευγαρώσει. Οι εγκοπές στους κλώνους του DNA σφραγίζονται, ώστε τα δύο μόρια του DNA να συγκρατούνται χιαστί (cross-strand exchange). Σε αυτή την φάση πραγματοποιείται περιστροφή του χιαστί, έτσι ώστε το DNA να είναι από τοπολογικής άποψης σε θέση να διαχωριστεί έτσι ώστε οι δύο αρχικοί κλώνοι να μην επιχιαστούν [3].

Ο μηχανισμός αυτός, παρότι αργός, είναι εξαιρετικά ακριβής, αφού χρησιμοποιεί για τη σωστή επιδιόρθωση ομόλογες ακολουθίες βάσεων σε διάφορα μέρη στο γονιδίωμα (εκτός του σημείου διπλής θραύσης), όπως για παράδειγμα μια αδελφή χρωματίδη, ως σημείο αναφοράς για την επιδιόρθωση [30]. Παρά όμως την ακρίβεια του, ο μηχανισμός αυτός δεν είναι ο κύριος για τις δίκλωνες θραύσεις. Ο HR απαιτεί την ύπαρξη ομόλογης διπλής έλικας έτσι ώστε να λειτουργήσει, πράγμα που στα ευκαρυωτικά κύτταρα συναντάται στη φάση S έως την μίτωση, άρα ο μηχανισμός αυτός λαμβάνει χώρα κυρίως κατά το σημείο ελέγχου της φάσης G2 καθώς και σε διάφορες φάσεις της S [31]. Επίσης στο γενετικό υλικό υπάρχουν σε μεγάλη έκταση περιοχές με επαναλαμβανόμενη πληροφορία, με αποτέλεσμα η εύρεση ομολογίας να γίνεται αδύνατη.

- **Non homologous End-Joining:**

Σε αντίθεση με τον HR, ο NHEJ δεν χρειάζεται εκτεταμένη ομολογία για να λειτουργήσει. Ως εκ τούτου, λειτουργεί καθ' όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και είναι επιρρεπής σε λάθη. Όμως τα λάθη που παράγονται ή παραμένουν μετά τον μηχανισμό αυτό στα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν μικρή πιθανότητα να αφήσουν σημαντικό ελάττωμα, καθώς το μεγαλύτερο μέρος της αλυσίδας του DNA αποτελείται από ετεροχρωματίνη, δηλαδή από περιοχές που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Σε επίπεδο οργανισμού, αφού μόνο ένα μικρό ποσοστό από τα γονίδια κωδικοποιεί πρωτεΐνες. Η λειτουργία του NHEJ περιλαμβάνει την συνδυασμένη λειτουργία πρωτεϊνών όπως η DNA-PK, την ενδονουκλεάση ARTEMIS, την πολυμεράση και την DNA λιγκάση IV.



Στο σχήμα παρατηρούμε συνοπτικά τον μηχανισμό επιδιορθωσης NHEJ. Μετά την βλάβη DSB ο μηχανισμός ενεργοποιείται με την πρόσδεση του ετεροδιμερούς KU 70/80 στα δύο κομμένα άκρα του DNA και δένεται με την DNA-PKcs, δημιουργώντας έτσι την DNA-PK, η οποία φωσφορυλιώνεται. Στην συνέχεια τον κύριο ρόλο αναλαμβάνει η ARTEMIS, μια 5'-3' εξωνουκλεάση (όταν δεν είναι φωσφορυλιωμένη), η οποία μετατρέπεται σε ένδονουκλεάση αφού φωσφορυλιωθεί. Οι πρωτεΐνες της ARTEMIS δρουν ως εξωνουκλεάσες και βοηθούν στην εκτομή των άκρων του DNA. Έπειτα σειρά έχει η πολυμεράση X, τις οποίες τα μέλη ξεκινούν την σύνθεση του DNA. Τα επιδιορθωμένα κομμάτια του DNA έχουν επιδιορθωθεί συνδέονται με την βοήθεια της DNA λιγκάσης IV με διεγερτικούς παράγοντες (XRCC4 - LIGASE IV – XLF COMPLEX) όπου και αποκαθίσταται η ακεραιότητα του DNA.

Σχήμα 1.9: Μη ομόλογος ανασυνδυασμός τελικής σύνδεσης(Πηγή: Alberts, Βασικές αρχές κυτταρικής Βιολογίας- Εισαγωγή στην μοριακή βιολογία του κυττάρου. Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2000)

1.16 Ο ρόλος της DNA-PK ως μόριο κλειδί για τη μελέτη του μηχανισμού NHEJ

Η DNA-PK, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο, είναι ένα ένζυμο το οποίο [32] εμπλέκεται στην επιδιόρθωση των DSB. Το ένζυμο αυτό αποτελείται από μια καταλυτική υπομονάδα, την DNA-PKcs η οποία είναι μέρος της PIKK οικογένειας κινασών και από μια υπομονάδα στόχευσης, το ετεροδιμερές Ku70–Ku80 δύο πολυπεπτιδίων [33]. Η DNA-PK ανακαλύφθηκε στις αρχές του 1990 και από τότε η δράση της σε βιοχημικό επίπεδο έχει αναλυθεί εκτενώς. Η DNA-PK χαρακτηρίζεται από τη λειτουργία της ως πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης που ενεργοποιείται από το DNA (DNA-activated serine/threonine-directed protein kinase activity) και θεωρείται ως το χαρακτηριστικό παράδειγμα βιοχημικής λειτουργίας της οικογένειας PIKK, λειτουργία χαρακτηριστική εφόσον για την πραγματοποίησή της απαιτείται η παρουσία του ίδιου του DNA [34]. Η ενεργοποίηση της DNA-PKcs εξαρτάται άμεσα από την ενεργοποίηση του Ku του οποίου η δράση συνίσταται στο να προσκολλάται στην έλικα του DNA και λόγω της δομής του, να μπορεί να εισέρχεται μέσα από τις περιελίξεις του DNA στο σημείο της θραύσης. Έπειτα με την βοήθεια της DNA-PKcs συγκροτούν την DNA-PK, η οποία και *αυτοφωσφορυλιώνεται* ή/και φωσφορυλιώνεται με την βοήθεια της ATM μετά την πρόσδεση αυτή [30], με αποτέλεσμα την αποσύνδεση της DNA-PKcs από το ετεροδιμερές KU, λειτουργία αναγκαία για την πρόσβαση στο σημείο της θραύσης άλλων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διαδικασία της επιδιόρθωσης μέσω του NHEJ. Κατά συνέπεια, η μελέτη της DNA-PK, δίνει ένα ξεκάθαρο και αξιόπιστο δείκτη για τη μελέτη της λειτουργίας του NHEJ τόσο σε μοριακό επίπεδο αλλά και σε επίπεδο θεραπείας καθώς η απενεργοποίηση της μπορεί να συμβάλει στην ανικανότητα των καρκινικών κυττάρων να επιδιορθώνουν μηχανισμούς και να τα οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο.

1.17 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι μια πολυπαραγοντική νόσος. Όπως αναφέρθηκε στα προηγούμενα, η έκθεση σε εξωγενείς παράγοντες, όπως η ακτινοβολία, προκαλεί γονιδιακές αλλά και χρωμοσωματικές αλλοιώσεις και επάγει γονιδιωματική αστάθεια. Η καρκινογένεση είναι μία εξελικτική διαδικασία, χαρακτηρίζεται από μία πληθώρα γενετικών αλλοιώσεων (μοριακές μεταλλάξεις και χρωμοσωματικές αλλοιώσεις) που συσσωρεύονται κατά την εξέλιξη μίας μακράς διαδικασίας επιλογής κυτταρικών κλώνων. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται όταν το κύτταρο εξαλλάσσεται μετά από μία ή περισσότερες αλλοιώσεις που του δίνουν ένα γενναίο αυξητικό (proliferative) πλεονέκτημα.

Η παρουσία αυτή του όγκου δημιουργεί προβλήματα στην ομαλή λειτουργία του οργανισμού, αφού τα κύτταρα αφενός δεν επιτελούν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες ενώ αφετέρου, ο όγκος ως ένα νέο και άρα ξένο ως προς τα φυσιολογικά κύτταρα σώμα, δυσχεραίνει την λειτουργία των υγιών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν επίσης τη δυνατότητα μετάστασης, την μεταφορά τους δηλαδή

σε ένα άλλο όργανο ή ιστό και τη δημιουργία νέου όγκου εκεί. Αυτό συμβαίνει διότι τα καρκινικά κύτταρα που έχουν πολύ έντονο πολλαπλασιασμό διασπείρονται από την φυσιολογική τους θέση και εισβάλουν σε άλλους γειτονικούς ιστούς ή μεταφέρονται μέσω του αίματος σε άλλες περιοχές του σώματος (5).

Η θεραπεία του καρκίνου επικεντρώνεται στην θανάτωση ή στην απομάκρυνση των καρκινικών κυττάρων από το σώμα. Σε αυτό το στόχο, επιστρατεύονται πολλές ιατρικές τεχνικές όπως η χημειοθεραπεία, η χειρουργική θεραπεία ή η εσωτερική χορήγηση ραδιοφαρμάκων και η ακτινοθεραπεία. Στις περισσότερες των περιπτώσεων φυσικά, απαιτείται η συνδυαστική εφαρμογή τέτοιων μεθόδων.

Β. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο
ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΤΗΣ DNA-PK: NU 7026

Η επιδιόρθωση των DNA DSBs μέσω των ενζυματικών διεργασιών είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες αντίστασης στην ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία, και ως εκ τούτου η αναστολή αυτών των μονοπατιών συνιστά μια πολύ κρίσιμη στρατηγική για ακτινοευαισθητοποίηση. Πάρα πολλές μελέτες εξάλλου [35], [36], [37], έχουν δείξει ότι κύτταρα τα οποία λόγω γονιδιακών μεταλλάξεων ή άλλων λόγων παρουσίαζαν μειωμένη έκφραση και λειτουργία ενζύμων όπως το ετεροδιμερές KU70/80 ή τη DNA-PK εμφάνιζαν υπερευαισθησία στην ιοντίζουσα ακτινοβολία. Στην κατεύθυνση αυτή κινήθηκαν αρκετές έρευνες, που προσπάθησαν να μελετήσουν την ακτινοευαισθητοποιητική δράση αναστολέων, ειδικών μορίων όπως μεταβολίτες και άλλα είδη μορίων.

Ένα τέτοιο μόριο, σχετικά καινούριο αφού η μελέτη της δράσης του ξεκίνησε το 2003, είναι ο αναστολέας της DNA-PK NU7026, *2-(morpholin-4-yl)-benzo[h]chomen-4-one* [38]. Ο NU7026 είναι ένας εξαιρετικά επιλεκτικός αναστολέας της δράσης της DNA-PK, ενώ είναι ανενεργός ενάντια στις κινάσες ATM και ATR [38].

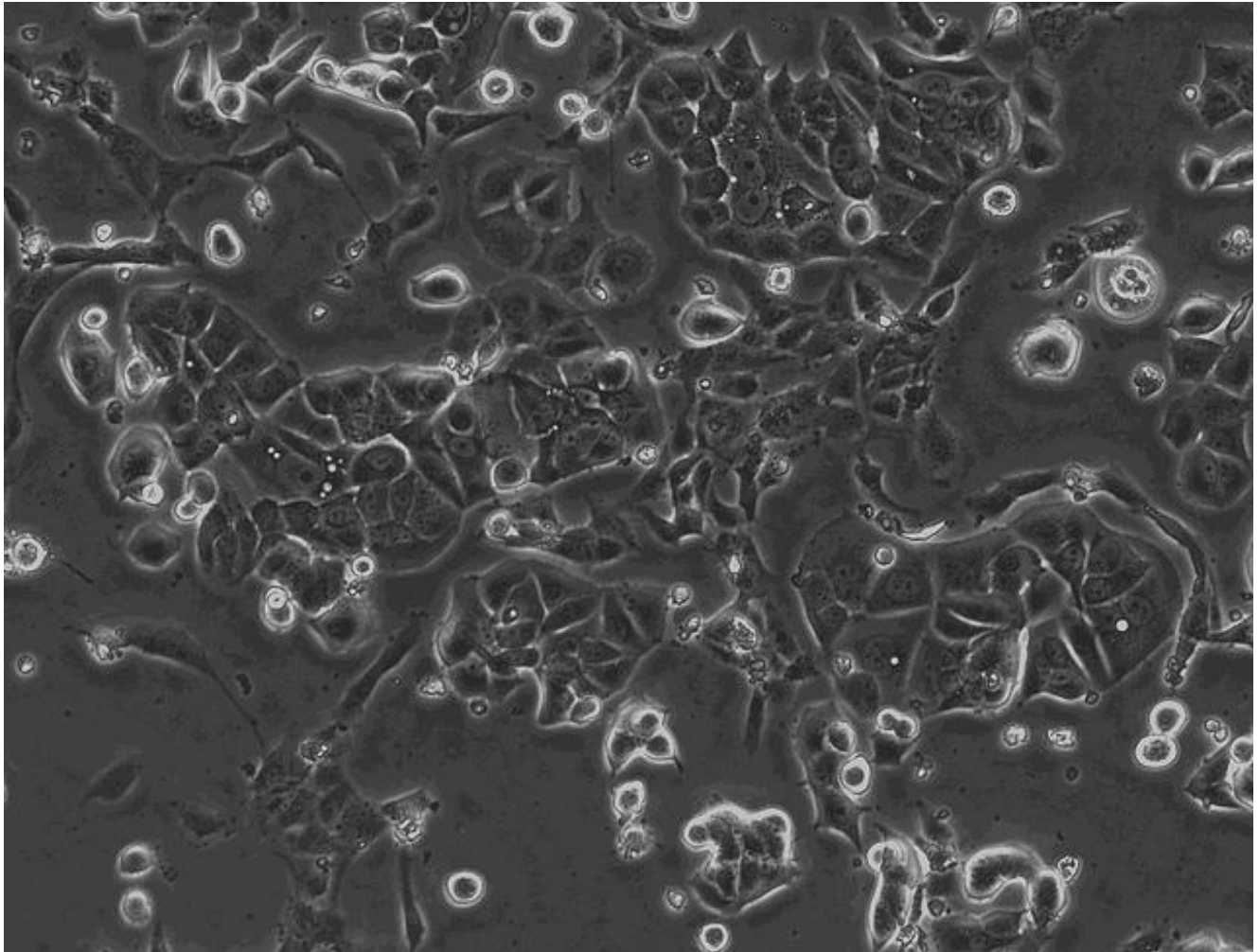
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο:
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να εξεταστεί η ακτινοευαισθητοποιητική δράση του αναστολέα στα καρκινικά κύτταρα MCF-7. Η αποδεδειγμένη ακτινοευαισθητοποιητική δράση του αναστολέα NU 7026 έχει προκαλέσει μια σειρά μελετών σε διαφορετικές καρκινικές σειρές με την προοπτική ο αναστολέας να χρησιμοποιηθεί ως ακτινοευαισθητοποιητής σε ραδιοθεραπεία. Κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης εξετάστηκε η επίδραση του αναστολέα κατά το πέρασ 48 και 72 ωρών, πείραμα που αποτελεί συνέχεια σειράς πειραμάτων της ομάδας του Δρ. Αλέξανδρου Γεωργακίλα. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση που έχει η ακτινοευαισθητοποιητική δράση του αναστολέα σε επίπεδο δημιουργίας αποικιών. Για την επίτευξη του στόχου χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι, ανοσοφθορισμός, μέθοδος κλωνογενετικής επιβίωσης και μέθοδος βιοδοσιμετρίας με ανίχνευση μικροπυρήνων.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5° :
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Η κυτταρική σειρά η οποία χρησιμοποιήθηκε στην διεξαγωγή του πειράματος είναι η MCF-7, κύτταρα καρκίνου του μαστού, θήλεος (Εικόνα 5.1).



Εικόνα 5.1: Καρκινικά κύτταρα μαστού, όπως φαίνονται από το μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.

Κυτταρική καλλιέργεια είναι η διαδικασία κατά την οποία γίνεται ελεγχόμενη ανάπτυξη κύτταρων σε συνθήκες εργαστηρίου. Ο σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι η αναπαραγωγή και άρα η μελέτη της ζωής του κύτταρου, αναφορικά με τον κυτταρικό κύκλο αλλά και διαφορές άλλες λειτουργίες και συμπεριφορές. Είναι μια διαδικασία που βοήθησε και βοηθά εξαιρετικά στην μελέτη

της λειτουργίας ανθρωπίνων κύτταρων και ιστών απαλλαγμένα από in vivo αλληλεπιδράσεις που θα είχαν στο περιβάλλον του οργανισμού από το οποίο προήλθαν.

Όλες οι διαδικασίες που αφορούν στην κυτταρική καλλιέργεια πραγματοποιούνται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (Εικόνα 5.2). Ο θάλαμος διαθέτει λάμπα UV ακτινοβολίας και ειδικό σύστημα κάθετου εξαερισμού το οποίο του επιτρέπει να διατηρεί άσηπτες συνθήκες εργασίας. Τα κύτταρα στα χρονικά διαστήματα ανάμεσα στις διαφορές εργασίες, επωάζονται στον επωαστικό κλίβανο (incubator) στους 37 °C σε κορεσμένες συνθήκες υγρασίας και παρουσία CO₂ 5% (Εικόνα 5.3). Τα υλικά και τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τις κυτταρικές καλλιέργειες βρίσκονται διαθέσιμα στο εμπόριο. Παρακάτω ακολουθεί μια αναγραφή των μηχανημάτων και των υλικών που χρησιμοποιούνται κατά την διάρκεια των κυτταρικών καλλιεργειών.



Εικόνα 5.2: Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής.

Υποδομές και υλικά

- Μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης, Axiovert 25 Zeiss
- Επωαστικός κλίβανος με παροχή CO₂, Format Scientific
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow), ELMED
- Δοχείο υγρού αζώτου, Forma
- Φιάλες κυτταροκαλιεργειών 75 cm³, Orange Scientific
- Φιάλη κυτταροκαλιεργειών 100 cm³, Orange Scientific
- Σιφώνια ακριβείας, Orange Scientific
- Ειδικά κρυοάντοχα σωληνάρια ψύξης κυττάρων των 2 mL, Orange Scientific
- Πιππέτες, Gilson

- Φυγόκεντρος, Heraeus Christ
- DMSO, Sigma
- Θρεπτικό υλικό: D-MEM HIGH GLUCOSE, PAA Laboratories.
- Διάλυμα πενικιλίνης / στρεπτομικίνης 100 Units/mL και 10mg/ mL, PAA Laboratories
- Διάλυμα θρυψίνης/EDTA: 0,05% / 0,02 % σε PBS χωρίς Ca²⁺, Mg²⁺, Biochrom AG
- Εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό: D-MEM HIGH GLUCOSE (10% FBS, 1% L-Glutamine, 1% Penicillin/Streptomycin)
- Διάλυμα ψύξης: 10% DMSO σε ορό μόσχου



Εικόνα 5.3: Επωαστικός κλίβανος.

1.8 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα κύτταρα καλλιεργούνται μέσα σε φλάσκες ή τρυβλία. Όταν τα κύτταρα καλύψουν ένα 80-90% της επιφάνειας της φιάλης, τότε πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια. Το ποσοστό κάλυψης του πυθμένα της φλάσκας εκτιμάται κάθε φορά από την παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.

Στην ουσία η ανακαλλιέργεια είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα μέρος των κυττάρων μεταφέρεται σε νέα φιάλη, ενώ αντικαθίσταται και το θρεπτικό υλικό των κυττάρων. Για την πραγματοποίηση της ανακαλλιέργειας εργαζόμαστε στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Αρχικά αφαιρούμε το ήδη υπάρχον θρεπτικό υλικό και ξεπλένουμε τη φιάλη με διάλυμα PBS. Αυτό βοηθά στο να καθαρίσει πλήρως η φιάλη από το θρεπτικό υλικό και να αφαιρεθούν τυχόν θραύσματα νεκρών κυττάρων. Αφού αφαιρέσουμε το διάλυμα PBS προσθέτουμε στη φιάλη 5 ml θρυψίνης. Η θρυψίνη είναι ένα ένζυμο που έχει την ιδιότητα να λύνει τους δεσμούς των κυτταρικών μεμβρανών, άρα και να βοηθά στην αποκόλληση των ταπήτιων κυττάρων από τη βάση της φιάλης. Έπειτα η

φιάλη με την θρυψίνη τοποθετείται στον κλίβανο επώασης για περίπου 3 - 5 λεπτά ενώ ανά τακτά χρονικά διαστήματα παρατηρείται στο μικροσκόπιο η πορεία της αποκόλλησης. Η παρατεταμένη δράση της θρυψίνης μπορεί να επιφέρει και την λύση των κυττάρων. Έπειτα το εναιώρημα χωρίζεται σε 3-4 φιάλες και προσθέτουμε ίση ποσότητα θρεπτικού μέσου σε κάθε μια (10 ml).

1.9 Ψύξη κυτταρικής σειράς

Η ψύξη κυτταρικής σειράς έχει ως στόχο την διατήρηση των κυττάρων της σειράς αυτής για μελλοντική χρήση. Κύτταρα τα οποία κατά την διαδικασία της κυτταρικής καλλιέργειας στην διάρκεια ενός πειράματος δεν είναι στην άμεση ανάγκη του εργαστηρίου, ψύχονται, έτσι ώστε οποιαδήποτε στιγμή κριθεί σκόπιμο, να ξαναχρησιμοποιηθούν .

Τα κύτταρα αρχικά ανακαλλιεργούνται σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Έπειτα το εναιώρημα υπόκειται σε φυγοκέντρηση στα 500 g. Κατά της διάρκεια της φυγοκεντρικής τα κύτταρα δημιουργούν ένα ίζημα στο κάτω μέρος της φιάλης το οποίο μας επιτρέπει να αφαιρέσουμε το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό και να απομονώσουμε τα κύτταρα. Στην ίδια την φιάλη φυγοκεντρικής προστίθεται 1 ml διαλύματος ψύξης.

Έπειτα το διάλυμα αυτό μεταφέρεται σε ειδικό σωληνάριο ψύξης το οποίο ψύχεται διαδοχικά στους -4°C για μία ώρα, στους -20°C για 4 ώρες, στους -80°C για 12 ώρες και τέλος μεταφέρονται στο υγρό άζωτο στους -186°C .

1.10 Απόψυξη κυτταρικής σειράς

Οι κυτταρικές σειρές συνήθως παραλαμβάνονται από συνθήκες βαθιάς ψύξης, από άζωτο στους -186°C ή από τα ειδικά ψυγεία φύλαξης που λειτουργούν στους -80°C .

Τα κύτταρα μεταφέρονται από τις συνθήκες ψύξης στο θάλαμο νηματικής ροής όπου και γίνεται αμέσως προσθήκη θρεπτικού υλικού (ήδη προθερμασμένου στους 37°C). Τα κύτταρα μετά την απόψυξη τοποθετούνται σε τρυβλία ή φιάλες σε 10ml διαλύματος θρεπτικού υλικού. Έπειτα τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο όπου συνεχίζεται η καλλιέργεια τους.

1.11 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ ΜΕ ΤΟ ΑΙΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ NEUBAUER

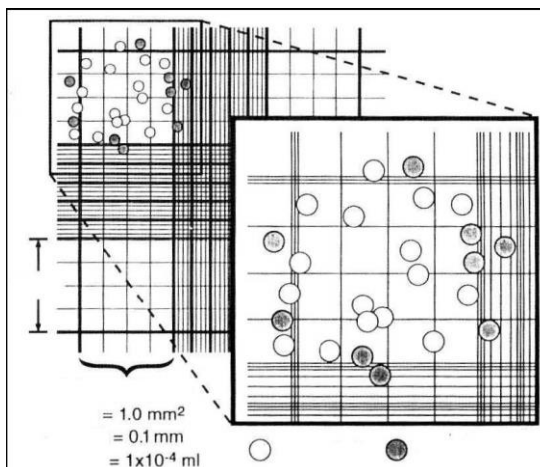
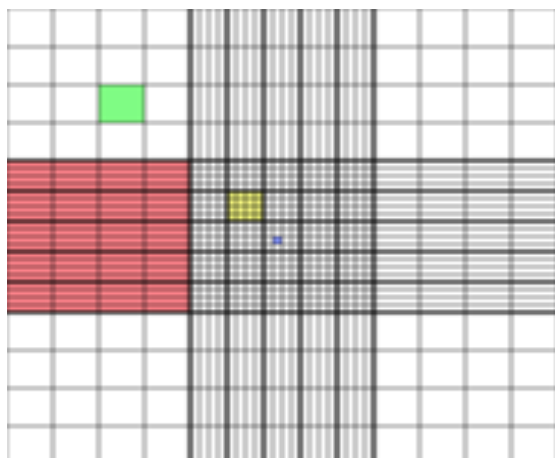
Η μέτρηση στο αιματοκυτταρόμετρο είναι μια σχετικά απλή διαδικασία με την οποία μπορούμε να μετρήσουμε προσεγγιστικά τον αριθμό κυττάρων σε ένα δείγμα γνωστού όγκου. Το αιματοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα με δυο κατάλληλα επεξεργασμένες επιφάνειες, οι οποίες φέρουν τομές οι οποίες ορίζουν επιφάνειες συγκεκριμένου

μεγέθους. Η κάθε επιφάνεια αποτελείται από εννέα μεγάλα τετράγωνα σε μορφή πλέγματος (Εικόνα 5.3). Κάθε ένα από τα τέσσερα τετράγωνα στις γωνίες χωρίζεται σε δεκαέξι μικρότερα τετράγωνα. Κάθε μεγάλο τετράγωνο (κόκκινο τετράγωνο) έχει επιφάνεια 1mm^2 , έτσι ώστε όταν καλύπτεται με καλυπτρίδα ο όγκος του υγρού σε κάθε τετράγωνο να είναι 10^{-4}mL . Γνωρίζοντας τον όγκο του κυτταρικού εναιωρήματος και μετρώντας τα κύτταρα σε ένα τετράγωνο μπορεί να προσδιορισθεί ο αριθμός και η συγκέντρωση τους.

Τοποθετείται η καλυπτρίδα στο αιματοκυτταρόμετρο και με πιπέττα Pasteur τοποθετούνται $10\mu\text{L}$ από το κυτταρικό εναιώρημα στην άκρη της καλυπτρίδας, έτσι ώστε να καλυφθεί η κατάλληλα επεξεργασμένη επιφάνεια λόγω του τριχοειδούς φαινομένου. Τα κύτταρα που βρίσκονται στα τέσσερα ακριανά τετράγωνα μετρώνται στο οπτικό μικροσκόπιο (Εικόνα 5.4).

Ο αριθμός των κυττάρων ανά mL αρχικού εναιωρήματος δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Αριθμός κυττάρων/mL αρχικού εναιωρήματος} = \frac{\text{Μέσος όρος των κυττάρων στα τέσσερα τετράγωνα}}{\text{mL αρχικού εναιωρήματος}} \times 10^4$$



Εικόνα 5.4: Αιματοκυτταρόμετρο, μια ειδικά τροποποιημένη, αντικειμενοφόρος πλάκα

Εικόνα 5.5: Μέτρηση κυττάρων σε αιματοκυτταρόμετρο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6° :
ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μέθοδος

Η ακτινοβόληση των δειγμάτων έγινε με πηγή κοβαλτίου (^{60}Co) Gamma Cell 220 Irradiator (Atomic Energy of Canada Ltd, Ottawa, Canada, Ιανουαρίου 1974) σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν την ακτινοβόληση έγινε μέτρηση του ρυθμού δόσης με την βοήθεια φορητού δοσίμετρου, που τοποθετείται στο σημείο που θα ακτινοβοληθούν τα δείγματα (Δρ. Γ. Τερζούδη, ΕΚΕΦΕ «Δ»). Ύστερα από βαθμονόμηση της πηγής βρέθηκε ότι τη στιγμή που έγινε η ακτινοβόληση χρειάζονταν 1 min και 45 sec για να δεχτούν τα κύτταρα ακτινοβολία 1 Gy.

Το Gy ή gray είναι μια μονάδα μέτρησης της ακτινοβολίας που δέχεται ένα σώμα από ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Ισοδύναμα, ένα Gy εκφράζει την απορρόφηση ενός Joule ενέργειας από ένα κιλό μάζας. Δηλαδή $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/Kg}$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7°
ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Το πρώτο και σημαντικότερο στάδιο στην κυτταρογενετική μελέτη είναι η απομόνωση και η συλλογή κυττάρων, των οποίων ο κυτταρικός κύκλος βρίσκεται στο στάδιο της μετάφασης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται η ουσία colcemid (κολχικίνη ή κολσεμίδιο), μια ένωση που εμποδίζει το σχηματισμό της ατράκτου κατά την κυτταρική διαίρεση, εμποδίζοντας έτσι τα κύτταρα να προχωρήσουν πέρα από το στάδιο της μίτωσης.

Στο πείραμα μας, η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε ήταν 5 μL κολχικίνης στα 5 mL του καλλιεργητικού υλικού. Έπειτα από την προσθήκη αυτή, οι φιάλες με το καλλιεργητικό υλικό μεταφέρονται στον επωαστικό κλίβανο, δηλαδή σε συνθήκες 37°C παρουσία 5% CO_2 για περίπου μια ώρα και τριάντα λεπτά. Στο διάστημα αυτό η κολχικίνη εισέρχεται στα κύτταρα που βρίσκονται στο καλλιεργητικό υλικό. Στη συνέχεια οι φιάλες μεταφέρονται στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, όπου αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα PBS. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει τα κύτταρα MCF-7 καλλιεργούνται σε ταπήτριο – δηλαδή προσκολλώνται στον πυθμένα της φιάλης, άρα απαιτείται η χρήση διαλύματος θρυψίνης/EDTA (2mL ανά φιάλη των 5 mL) έτσι ώστε τα

κύτταρα να αποκολληθούν και ώστε να περάσουν έπειτα στην διαδικασία του υποτονικού σοκ, που θα αναλυθεί στην συνέχεια. Για την δράση της θρυψίνης απαιτείται η παραμονή των φιαλών στον θάλαμο επώασης για περίπου 20 λεπτά. Η πορεία της αποκόλλησης των κυττάρων παρακολουθείται από το μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.

1.8 ΥΠΟΤΟΝΙΚΟ ΣΟΚ

Η διαδικασία του υποτονικού σοκ περιλαμβάνει την εναιώρηση των κυττάρων σε υποτονικό, για τα κύτταρα διάλυμα KCL συγκέντρωσης 0,75 M. Το διάλυμα KCL εισάγεται στο δείγμα έπειτα από φυγοκέντρηση διάρκειας 10 min στις 1300 rpm και απόχυση του υπερκειμένου. Σκοπός της εμβάπτισης των κυττάρων στο υπότονο διάλυμα είναι η διόγκωσή τους, μέσω του φαινομένου της ώσμωσης. Τα διογκωμένα κύτταρα, για την ακρίβεια οι διογκωμένοι πυρήνες είναι καλύτερα ορατοί στο μικροσκόπιο.

1.9 ΕΠΙΣΤΡΩΣΗ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ

Η διαδικασία της επίστρωσης των δειγμάτων στις αντικειμενοφόρες πλάκες, έπεται της διαδικασίας της μονιμοποίησης. Για την μονιμοποίηση χρησιμοποιείται παγωμένο διάλυμα μεθανόλης και οξικού οξέος, σε αναλογία 3/1. Όπως ήδη αναφέρθηκε, μετά το υποτονικό σοκ, το δείγμα φυγοκεντρείται και ακολουθεί απόχυση του εναιωρήματος. Το διάλυμα μεθανόλης/οξικού οξέος (fixative) προστίθεται στο σωλήνα φυγοκέντρησης, μέχρι να γεμίσει ο τελευταίος. Ακολουθεί πάλι φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1300 rpm, ενώ η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά. Μετά την τελευταία απόχυση το ίζημα επαναιωρείται σε λίγες σταγόνες διαλύματος fixative, ώστε να μειωθεί η συγκέντρωση των κυττάρων.

Σειρά έχει η τοποθέτηση των κυττάρων πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες. Σε κάθε μια πλάκα, τοποθετούνται 2 σταγόνες του εναιωρήματος, περίπου 40 μ L δηλαδή. Στη συνέχεια τα πλακάκια αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα, και ακολουθεί η διαδικασία της χρώσης τους.

1.10 ΧΡΩΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ

Για την χρώση των πλακών χρησιμοποιείται η χρωστική ουσία Giemsa (26). Η συγκεκριμένη χρωστική έχει την ικανότητα να δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες από τις οποίες αποτελούνται οι χρωματίδες και ο πυρήνας του κύτταρου. Οι πλάκες βυθίζονται στο διάλυμα της ουσίας με περιεκτικότητα 2 % v/v, για 8-10 λεπτά και στην συνέχεια ξεπλένονται με νερό βρύσης. Αμέσως μετά οι πλάκες ξεπλένονται με αποσταγμένο νερό και αφήνονται να στραγγίσουν στον αέρα, για περίπου

για μία ώρα. Έπειτα, μόλις στεγνώσουν πλήρως, τοποθετούνται πάνω στις πλάκες ειδικές καλύπτρες, οι οποίες επικολλώνται με χρήση της ειδικής κόλλας Endelan. Στο σημείο αυτό οι πλάκες είναι έτοιμες για μελέτη στο μικροσκόπιο.

1.11 ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

Τα δείγματα αναλύθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο (Εικόνα 7.1).



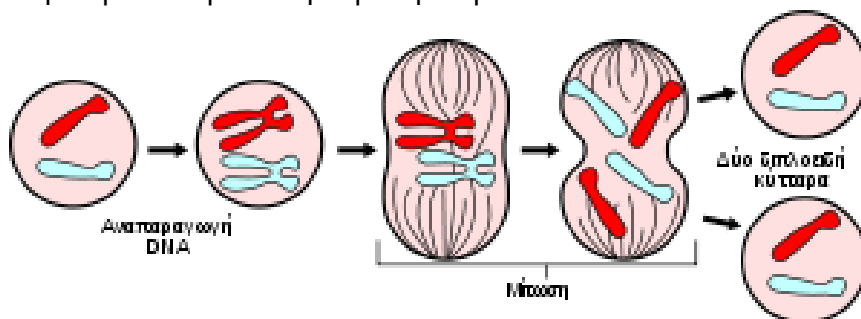
Εικόνα 7.1: Οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.

Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

1.12 Μέθοδος Cytokinesis-block Micronucleus (CBMN) Assay

Οι μικροπυρήνες είναι θραύσματα DNA ή ολόκληρα χρωμοσώματα ή αλλοιωμένα χρωμοσώματα που περιβάλλονται από πυρηνική μεμβράνη. Οι αλλοιώσεις των χρωμοσωμάτων που επάγουν γονιδιωματική αστάθεια, όπως είναι τα ακεντρικά θραύσματα και τα δικεντρικά χρωμοσώματα, βρίσκονται συχνά στους μικροπυρήνες καθώς δεν μπορούν να συνδεθούν με την άτρακτο και να περάσουν στην ανάφαση κατά την κυτταρική διαίρεση.



Εικόνα 8.1: Σχηματική αναπαράσταση της μίτωσης(Πηγή: Δυαδίκτυο)

Πρόκειται για μια μέθοδο βιοδοσιμετρίας:

Οι βλάβες που επάγει η ακτινοβολία συσσωρεύονται στο DNA των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος, τα οποία δεν διαιρούνται. Έπειτα η προσθήκη της PHA (φυτοαιματογλουταμίνη) βάζει τα κύτταρα στον κυτταρικό κύκλο, τα οποία και ακτινοβολούνται.

Η Cyt-B όταν προστίθεται 24 ή 48 ώρες μετά την αρχή της καλλιέργειας σταματά την κυτταροκίνηση της πρώτης ή της δεύτερης κυτταρικής διαίρεσης με αποτέλεσμα την διαιρεση του πυρήνα σε δυο θυγατρικούς, ενώ παράλληλα το κυτταρο δεν διαχωρίζεται σε δυο θυγατρικά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία κυττάρων με δύο πυρήνες. Κατά την διαδικασία αυτή το κύτταρο δημιουργεί πυρηνική μεμβράνη γύρω από τυχόντα θραύσματα, αφού τα αντιλαμβάνεται ως γενετικό υλικό, και έτσι μπορούμε να μετρήσουμε τον αριθμό των μικροπυρήνων που συνοδεύουν τα διπύρηνα κύτταρα.

Η cyt-B είναι αναστολέας τη κυττοκίνησης, η οποία είναι υπεύθυνη για τον διαχωρισμό του μητρικού κυττάρου στα δύο θυγατρικά κατά το τελικό στάδιο της Μίτωσης. Η εισαγωγή της Cyt-B, καθιστά δυνατή την εμφάνιση των μικροπυρήνων μέσα στο κυτταρόπλασμα. Με την διαδικασία αυτή είναι δυνατόν να προσδιοριστεί και το είδος των βλαβών που έχουν επαχθεί από την ακτινοβολία, όπως για παράδειγμα δικεντρικά χρωμοσώματα, καθώς και να εντοπιστούν βλάβες που περιέχονται στα κύτταρα για αρκετό καιρό πριν την δοκιμασία.

12 Πρωτόκολλο

Υλικά

1. **Complete Medium**, RPMI-1640 supplemented with 10% FBS, 1% L-Glu, 1% Pen/Strep
2. **PHA-M**, Sigma 25 mg/25mL H₂O - τελική συγκέντρωση στην καλλιέργεια 20 µg/mL
3. **Cyt-B**, 5 mg Cyt-B σε 8,3 mL DMSO [600µg/mL] - τελικής συγκέντρωσης 6 µg/mL καλλιέργειας

Αιμοληψία

1. Κατ' ελάχιστο 6 mL **περιφερικού αίματος** σε σωλήνες ηπαρίνης
2. Κατανομή του δείγματος σε 12 σωλήνες κυτταροκαλλιιεργειών (0,5 mL/σωλήνα)

Ακτινοβόληση δείγματος

1. Ακτινοβόληση δειγμάτων στις προαποφασισμένες δόσεις (0 και 1 Gy) στην πηγή ⁶⁰Co γ-ακτινοβολίας (1Gy/02:15 λεπτά)
2. Επώαση ακτινοβολημένων δειγμάτων στους 37 °C σε υγρή ατμόσφαιρα με 5% CO₂ για 2 ώρες.

Καλλιέργειες σε σωλήνες κυτταροκαλλιιεργειών

1. Σε 25 mL complete medium προστίθενται 500 µL διαλύματος PHA (20µg/mL)
2. Το υλικό κατανέμεται ανά 0,9 mL σε 24 well plates (1plate/donor)
3. Προστίθενται 0.100 mL περιφερικού αίματος / well
4. Οι καλλιέργειες επωάζονται για 24 ώρες στους 37 °C σε υγρή ατμόσφαιρα με 5% CO₂ 2 ώρες.
5. Προσθήκη 10 µL αρχικού διαλύματος cytochalasin-B σε κάθε καλλιέργεια

Συλλογή πυρήνων

1. Η καλλιέργεια τερματίζεται 72 ώρες μετά την προσθήκη της PHA. Προετοιμασία 24 σωληναρίων (RIA 3 mL) και μεταφορά των καλλιιεργειών σε αυτά.
2. Φυγοκέντρηση ήπια στα 180g για 10 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου μέσου της καλλιιεργειας.
3. Προσθήκη 1 mL υπότονου διαλύματος 0,075M KCl για λύση των ερυθροκυττάρων και επώαση των κυττάρων για 2 min.

4. Προσθήκη μονιμοποιητή που αποτελείται από μεθανόλη:οξικό οξύ (3:1)
5. Φυγοκέντρηση αμέσως στα 180g για 10 λεπτά.
6. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και αποκατάστασή του από φρεσκοπαρσκευασμένο μονιμοποιητή
7. Το στάδιο της μονιμοποίησης επαναλαμβάνεται 2 ή 3 φορές. Η επανάληψη επιφέρει σταδιακά τη διαύγεια στα δείγματα.
8. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου τα κύτταρα επαναιωρούνται ήπια και το εναιώρημα τοποθετείται σε καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα και αφήνεται στον αέρα να στεγνώσει.

Χρώση δειγμάτων

9. Για ανάλυση σε οπτικό μικροσκόπιο το δείγμα βάφεται με 5% Giemsa (δηλαδή Giemsa's Azur-Eosin-Methylene blue solution, Merck) σε HEPES ρυθμιστικό (0,03M, pH 6,5) για 30-45 λεπτά, ακολουθεί γρήγορο ξέπλυμα με νερό βρύσης και στέγνωμα στον αέρα.
10. Ακολουθεί η μέτρηση στο μικροσκόπιο, των μικροκυρήνων.

1.13 Μέθοδος ανοσοφθορισμού-foci

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί την δημιουργία foci στα σημεία επιδιόρθωσης. Μετά δημιουργία των συμπλεγμάτων αυτών, με χρήση αντισωμάτων, όπως περιγράφεται στην θεωρία, μπορούν να εντοπιστούν οι περιοχές στις οποίες έχει ξεκινήσει η διαδικασία της επιδιόρθωσης. Λόγω του ότι υπάρχει άμεση σχέση του αριθμού των βλαβών με τον αριθμό των foci, μπορούμε μετρώντας τα foci στο μικροσκόπιο να υπολογίσουμε την ελάττωση της επιδιορθωτικής ικανότητας των κυττάρων, παρουσία του αναστολέα.

11.13.1 ΥΛΙΚΑ

Primary antibody

rabbit: gamma H2AX [p Ser139] Antibody (EP854(2)Y) (NB100-79967) (0.1 ml).

Secondary Antibody

Anti-rabbit: Rhodamine Red™-X Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)

11.13.2 Πρωτόκολλο.

11.13.3 Ακτινοβόληση δείγματος

1. Ακτινοβόληση δειγμάτων στις προαποφασισμένες δόσεις (0 και 1 Gy) στην πηγή ⁶⁰Co γ-ακτινοβολίας (1Gy/00:02:15 λεπτά)
2. Επώαση 60 min. Μετά την ακτινοβόληση παραμένουν τα κύτταρα στον κλίβανο για 45-60 min.
3. Μονιμοποίηση. Βάζουμε τα πλακάκια στη φορμαλδεΐδη (έτοιμο διάλυμα 4%) για 15 min.
4. Ακολουθεί ξέπλυμα με PBS για 5 min στις 60 rpm. Αδειάζουμε το PBS και συνεχίζουμε για άλλα δύο πλυσίματα. (=3 x 5min)

5. Ακολουθεί ξέπλυμα με Triton x PBS 0.1 % . 3 φορές x 5 min.

6. Ακολουθεί παλι ξέπλυμα με PBS

Προσθήκη blocking solution 10% BSA (bovine serum albumin), 6% FBS (fetal bovine serum), 0.02% Triton-x σε PBS , το οποίο εμποδίζει τη μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος.

Συνοπτικά η πειραματική διαδικασία συμπεριλαμβάνεται στο παρακατω διαγραμμα.

<i>πρώτη μέρα</i>	<i>δεύτερη μέρα</i>
<i>Ακτινοβόληση</i>	<i>Ξέπλυμα με PBS 3x5 min</i>
<i>Επώαση 60 min</i>	<i>Προσθήκη Blocking solution</i>
<i>Φιξάρισμα 15 min σε φορμαλδεΰδη</i>	<i>Επώαση 45 min</i>
<i>Ξέπλυμα με PBS 3 x 5min</i>	<i>Προσθήκη 2^{ου} αντισώματος</i>
<i>Ξέπλυμα με Triton x 3 φορές x 5 min</i>	<i>ΕΠΩΑΣΗ 50 min</i>
<i>Ξέπλυμα με PBS Ακολουθεί ένα ξέπλυμα με PBS</i>	<i>Ξέπλυμα με PBS 3 x 5min</i>
<i>Προσθήκη Blocking solution</i>	<i>Ξέπλυμα με αιθανόλη</i>
<i>ΕΠΩΑΣΗ 60 min</i>	<i>Χρώση (Dapi)</i>
<i>Προσθήκη αντισώματος γ-H2AX rabbit</i>	<i>καλυπτρίδες</i>

Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίζονται κατελάχιστον για 15min σε 100 % παγωμένη αιθανόλη.

Ακολουθεί χρώση των δειγμάτων με μια σταγόνα Dapi σε κάθε πλακίδιο και τοποθετούνται από πάνω καλυπτρίδες.

Τελος, ακολουθεί παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού. Για να αποφεύγονται απώλειες φθορισμού, πρέπει η παρατήρηση να γίνεται όσο το δυνατόν πιο σύντομα μετά το πέρας της χρώσης.

1.14 Μέθοδος κλωνογενετικής επιβίωσης.

Ο όρος "survival"(επιβίωση) έχει την έννοια της αναπαραγωγικής ακεραιότητας. Πρόκειται για μια μέθοδο που αναδεικνύει την ικανότητα ενός κυττάρου να αναπαραχθεί και να πολλαπλασιάζεται επ' αόριστον έτσι ώστε να παράξει ορατή στο μάτι αποικία. Ως αποικία εννοούμε κάθε πληθυσμό κυττάρων που προέρχεται από ένα κύτταρο και αριθμεί 50 κύτταρα και άνω. Στη συγκεκριμενη δοκιμασία, τα κύτταρα σπέρνονται σε ένα σχετικά αραιό πληθυσμό και στη συνέχεια αφήνονται να πολλαπλασιαστούν. Ο αριθμός αυτός καθορίζεται από το ίδιο το πείραμα, καθώς το πρώτο στάδιο του πειράματος πρειλαμβάνει την καλλιέργεια διαφορετικού αριθμού κυττάρων, έτσι ώστε να βρεθεί ο βέλτιστος πληθυσμός για το πείραμα.

11.14.1 Πρωτόκολλο.

Μετά τη στρωση των κυττάρων στα τρυβλία, ακολουθούν τα εξής στάδια:

1. Προσθήκη του αναστολέα σε συγκέντρωση 10 μ M και αναμονή για 24 ώρες.
2. Στις συνθήκες που δεν περιείχαν αναστολέα προστέθηκε DMSO σε ίδια συγκέντρωση.

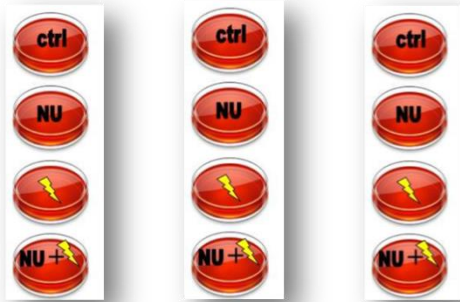
3. Ακτινοβόληση των κυττάρων με 1 Gy (0,48Gy /min) (πηγή Κοβαλτίου 60, Gamma Cell Irradiator, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος).
4. Αναμονη για 14 ημερες.
5. Μετά από πάροδο 14 ημερών έγινε μονιμοποίηση και βαφή με crystal violet clonogenic (dye) και οι αποικίες μετρήθηκαν με χρήση μικροσκοπίου ανάστροφης φάσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10° :

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

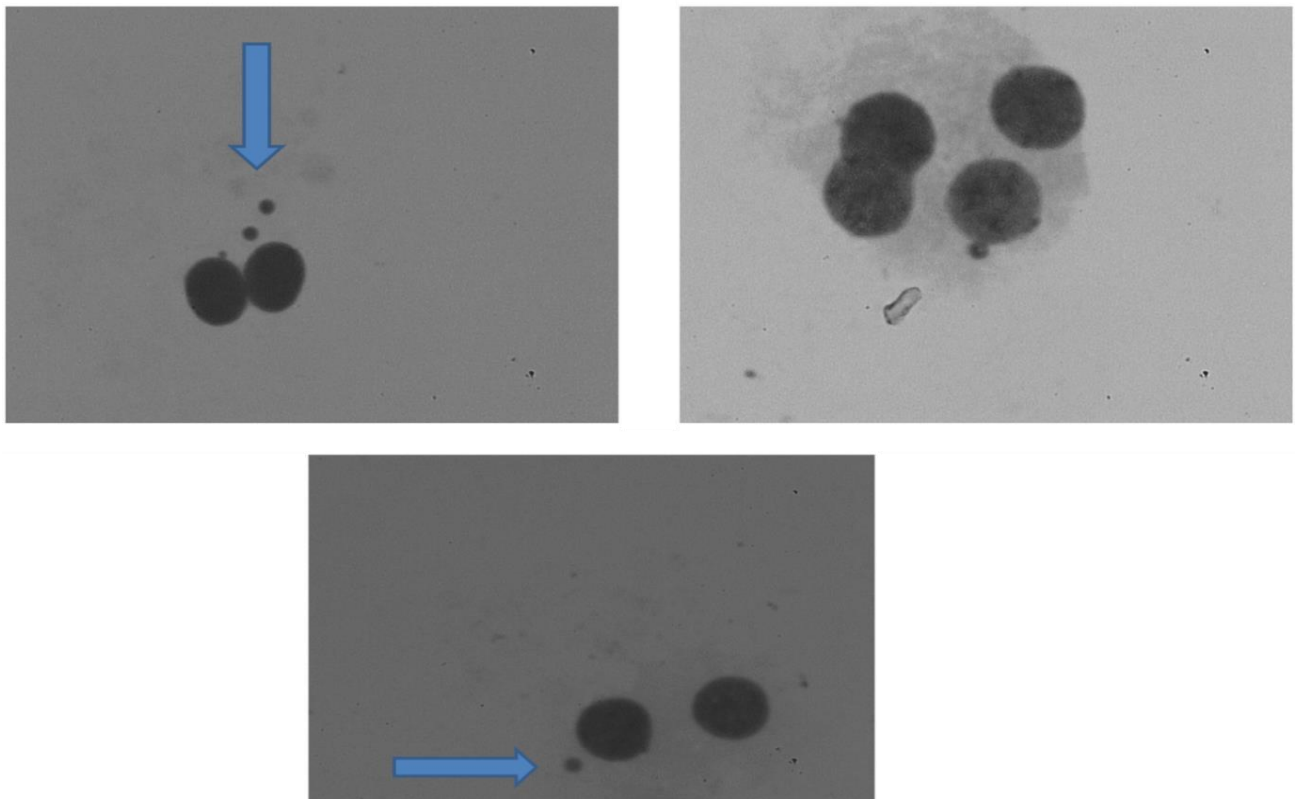
11.1 Μέθοδος Cytokinesis-block Micronucleus (CBMN) Assay

Μετά την αιματοληψία, έγινε κατανομή το περιφερικού αίματος σε 4 σωλήνες και δημιουργήθηκαν οι παρακάτω συνθήκες.



Σχήμα 10.1: Σχηματική αναπαράσταση των συνθηκών που χρησιμοποιήθηκαν

Έπειτα, ακολουθήθηκε η διαδικασία του micronucleus assay, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Παρακάτω παρατήθενται εικόνες, όπως αυτές συλλέχθηκαν στο μικροσκόπιο. Στις εικόνες παρατηρούμε διπήρινα κύτταρα, μέσα στα οποία μπορούν να παρατηρηθούν μικροπυρήνες. Οι μικροπυρήνες αυτοί δείχνουν την ύπαρξη θραύσεων της διπλής έλικας.



Εικόνα 10.2: Εικόνες από το οπτικό μικροσκόπιο. Είναι εμφανής η ύπαρξη μικροπυρήνων σε διπήρινα κύτταρα.

Έπειτα, μετρήθηκαν οι συνολικές πλάκες, σε τούσα διπήρινα κύτταρα. Τα αποτελέσματα παραπονται στον παρακάτω

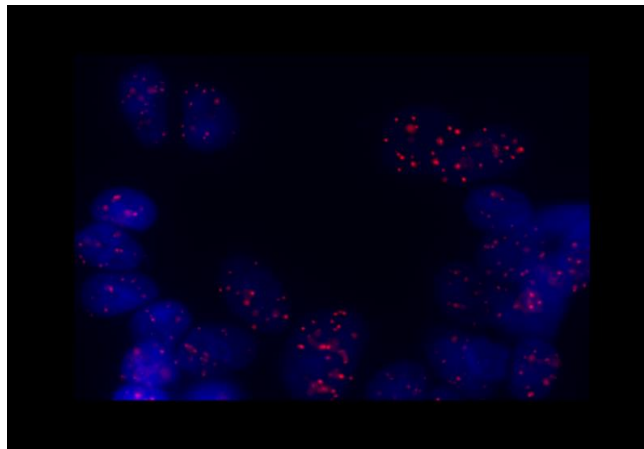
πίνακα.

	Απουσία Αναστολέα				Παρουσία Αναστολέα			
	0 Gy		1 Gy		0 Gy		1 Gy	
Αριθμός διπύρηνων κυττάρων	1000	sd	1000	sd	1000	sd	1000	sd
Αριθμός μικροπυρήνων ανά 1000 διπύρηνα κύτταρα	12	1,4	140	7,1	26	2,1	242	13,4

Πίνακας 10.3: Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα σε δείγμα 1000 πυρήνων.

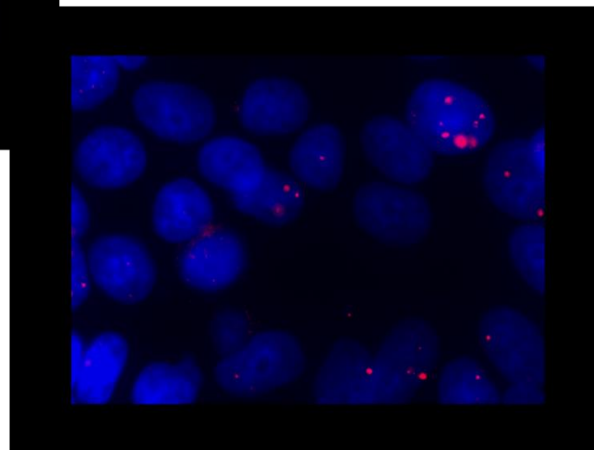
11.2 Μέθοδος ανοσοφθορισμού-foci

Μετά την χρώση των κυττάρων τα αποτελέσματα μετρήθηκαν σε σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε να αποφευχθεί εξασθένηση των φθοριζουσών ουσιών. Τα foci μετρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού για τις 4 συνθήκες και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 10.4.

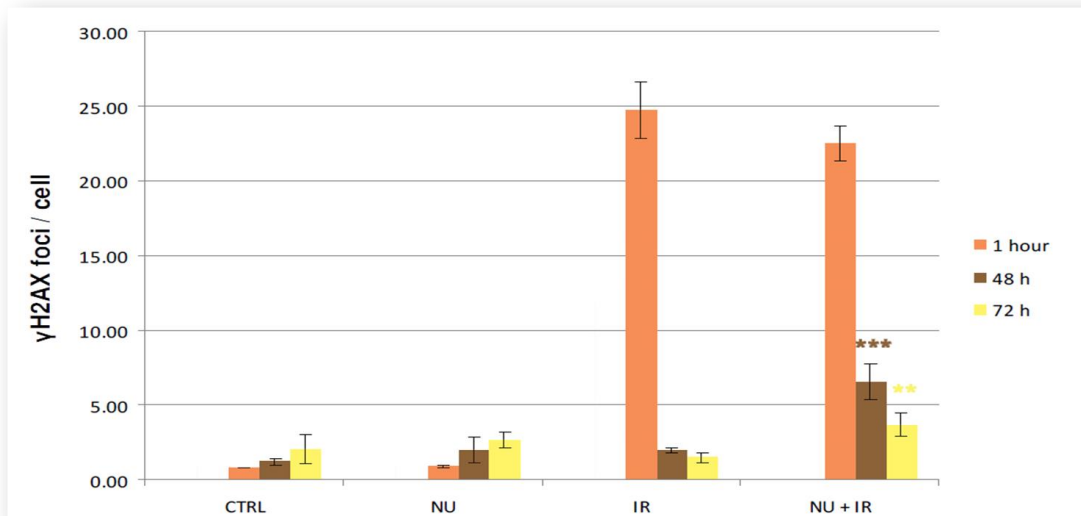


Δείγμα Ακτινοβολίας και αναστολέα στη 1 ώρα

Δείγμα Ακτινοβολίας και αναστολέα στις 72 ώρες



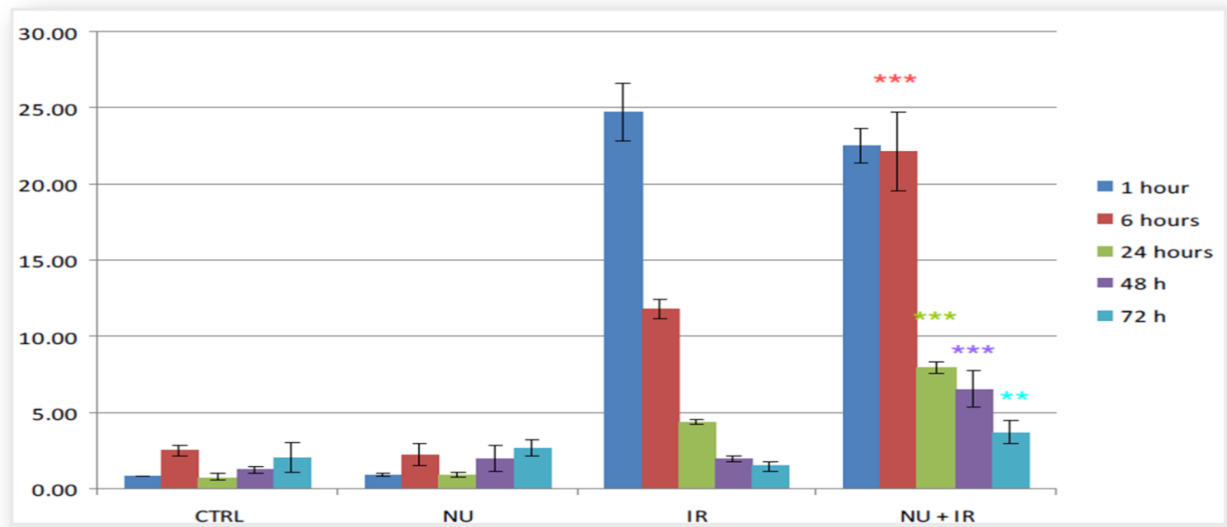
Τα foci μετρήθηκαν χωρίς τη χρήση κάποιου ειδικού λογισμικού, αλλά "με το ματι" και τα αποτελέσματα παρατιθενται παρακατω, στο ραβδογράμμο που ακολουθεί.



**Η διαφορά των δειγμάτων NU/NU+IR και NU+IR/IR δεν είναι στατιστικά σημαντική για τις 72 ώρες
 ***Η διαφορά των δειγμάτων NU/NU+IR και NU+IR/IR είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) για τις 48 ώρες

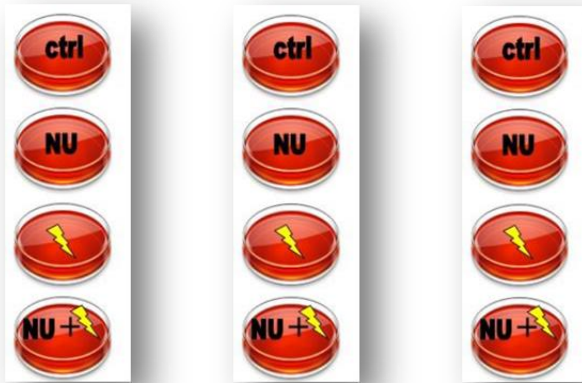
Διάγραμμα 10.4: Αποτελέσματα από τις μετρήσεις των foci στο μικροσκόπιο φθορισμού για τις διάφορες συνθήκες.

Συνοπτικά, παρατίθενται και τα αποτελέσματα για το πείραμα που έγινε από την Δανάη Λασκαράτου, για τις 6 και 24 ώρες από την εισαγωγή του αναστολέα, στο παρακατω ραβδόγραμμα.

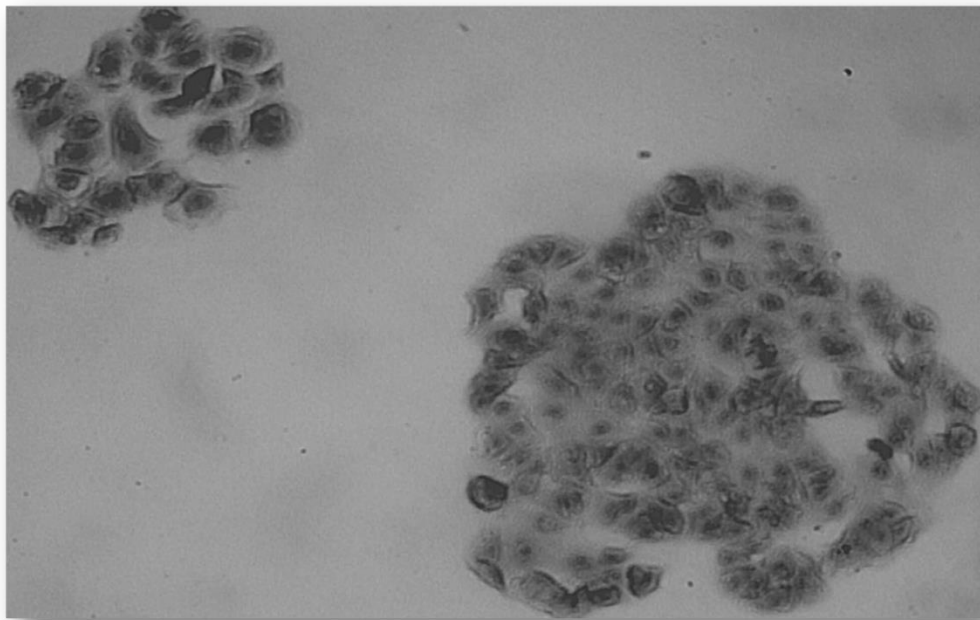


Διάγραμμα 10.5: Συνοπτικά η δράση της ακτινοβολίας σε όλα τα χρονικά σημεία στο πείραμα, από μία έως 72 ώρες.

Όπως και στα προηγούμενα πειράματα, δημιουργήθηκαν οι παρακάτω συνθήκες.



Έπειτα, ακολουθήθηκε η διαδικασία κλωνογενετικής επιβίωσης, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η μέτρηση έγινε με οπτικό μικροσκόπιο. Στην φωτογραφία, φαίνεται ένα σύνολο κυττάρων, αριστερά, το οποίο δεν μπορεί να χαρακτηριστεί αποικία, ενώ δεξιά, φαίνεται ένα σύνολο κυττάρων που μπορεί να χαρακτηριστεί ως αποικία.



Εικόνα 10.6 : Εικόνα αποικίας από το μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.

Στην διαδικασία αυτή, μετρώνται δυο μεγέθη, τα οποία δείχνουν το πόσο ικανά είναι τα κύτταρα να δημιουργούν αποικίες, το μέγεθος ικανότητα κάλυψης (Plating efficiency) και το κλάσμα επιβίωσης (Surviving fraction). Το πρώτο μέγεθος παρουσιάζει το ποσοστό της επιφάνειας που μπορεί να καλύψει με αποικίες ένας πλυθισμός μιας ορισμένης συνθήκης(όπως για παράδειγμα μια ακτινοβόληση) σε σχέση με την αντίστοιχη κάλυψη που έχουν τα κύτταρα τα οποία δεν έχουν υποστεί την δοκιμασία (control). Το δεύτερο είναι ένας δείκτης που αφορά στον αριθμό των αποικιών που μπορεί να δημιουργήσει ένας κυτταρικός πληθυσμός. Τα μεγέθη αυτά περιγράφονται παρακάτω:

1) Ικανότητα κάλυψης (Plating efficiency):

$$PE = \frac{\text{Αριθμός αποικιών}}{\text{Αρχικός αριθμός κυττάρων}} \times 100$$

2) Κλάσμα Επιβίωσης (Surviving fraction):

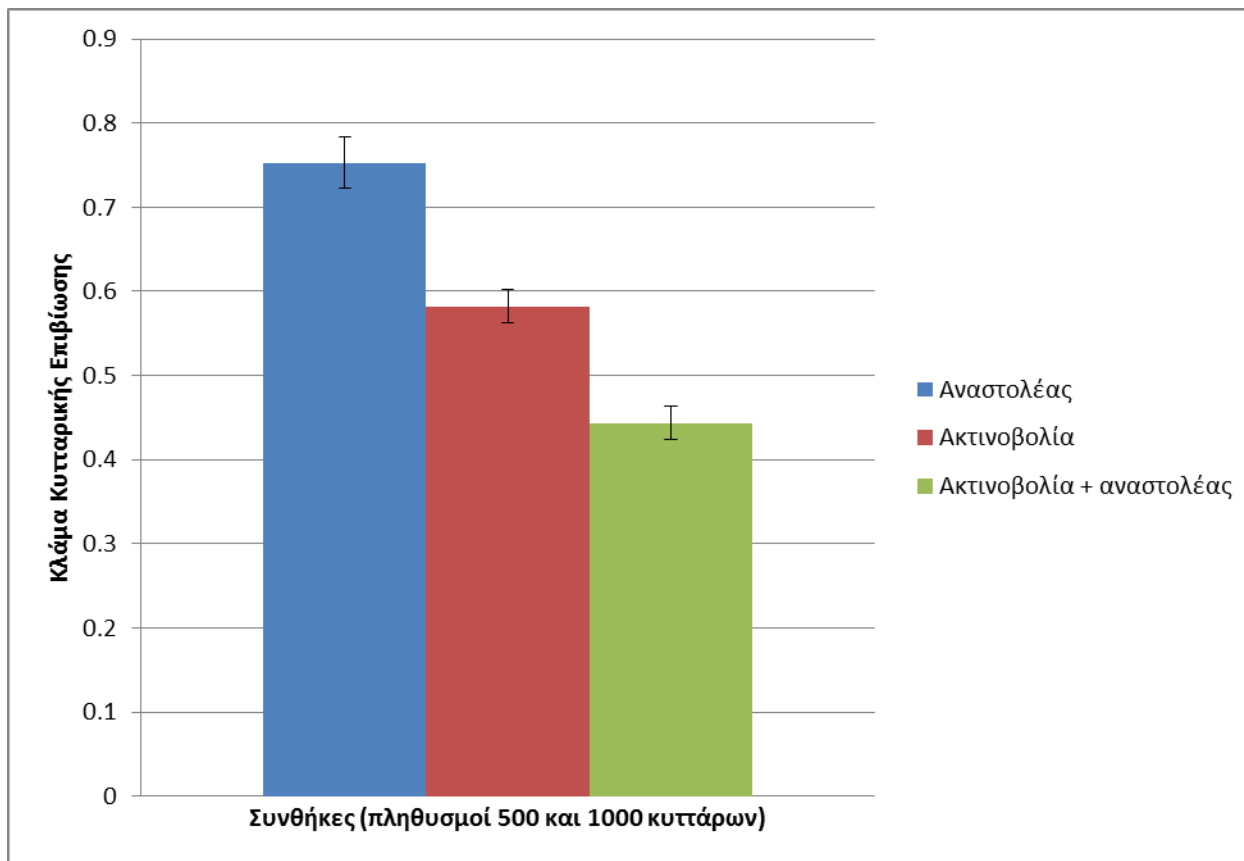
$$Sf = \frac{\text{Αριθμός αποικιών}}{\text{Αρχικός αριθμός κυττάρων} \times (PE/100)}$$

Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Αριθμός Κυττάρων	500			1000			2000		
	Αποικίες	Ικανότητα κάλυψης	Κλάσμα επιβίωσης	Αποικίες	Ικανότητα κάλυψης	Κλάσμα επιβίωσης	Αποικίες	Ικανότητα κάλυψης	Κλάσμα επιβίωσης
Συνθήκη ελέγχου	40	8	1	78	7,8	1	119	5,95	1
Με αναστολέα	31		0,775	57		0,731	99		0,832
Ακτινοβολία	24		0,6	44		0,564	88		0,739
Αναστολέα + Ακτινοβολία	17		0,425	36		0,462	83		0,697

Σχήμα 10.6: Πίνακας με τον αριθμό των αποικιών στους τρεις διαφορετικούς αρχικούς πληθυσμούς των 500, 1000, 2000 κυττάρων ανά συνθήκη

Στο παρακάτω ραβδόγραμμα παρουσιάζεται το κλάσμα κυτταρικής επιβίωσης για τις διάφορες συνθήκες για τους πλυθησμούς των 500 και 1000 κυττάρων. Ο πλυθησμός των 2000 κυττάρων δεν κρίθηκε κατάλληλος για να συμπεριληφθεί στις μετρήσεις, καθώς λόγω του μεγάλου αριθμού κυττάρων οι αποικίες ήταν δύσκολο να μετρηθούν. Στο παρακάτω ραβδόγραμμα παρουσιάζεται ο μέσος όρος των κλασμάτων επιβίωσης για τους πλυθησμούς των 500 και 1000 κυττάρων.



Σχήμα 10.7: Ραβδόγραμμα με τις μέσες τιμές της κλωνογενετικής επιβίωσης για τις διάφορες συνθήκες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11ο :
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

11.1 Clonogenic Survival Assay- Δοκιμασία κλωνογενετικής επιβίωσης

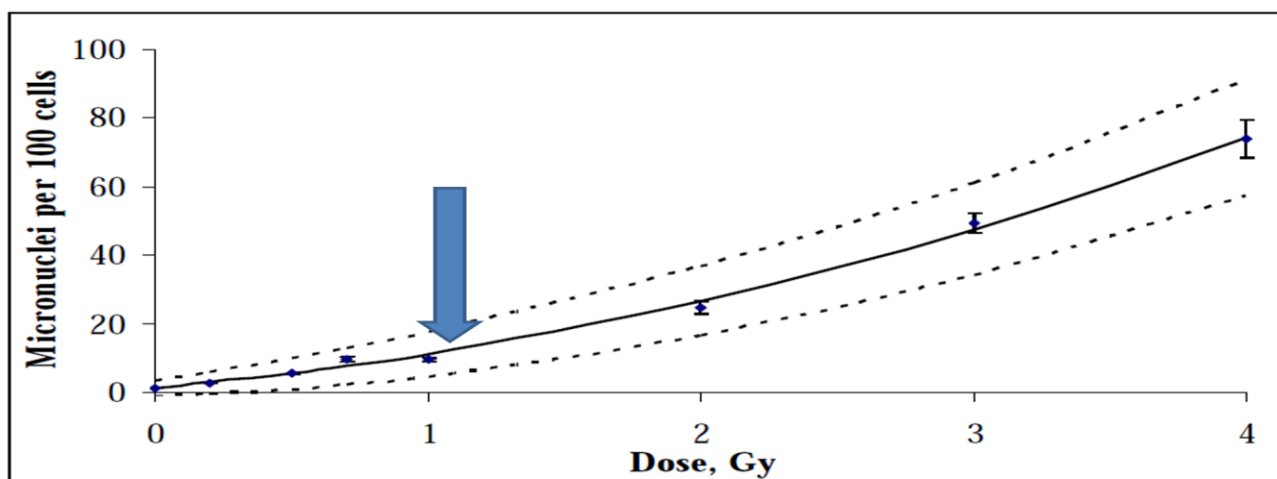
Παρατηρήσεις:

Παρουσία ακτινοβολίας ο αριθμός των αποικιών μειώνεται σημαντικά, έως και 45%, όπως προβλέπεται και από τη βιβλιογραφία, άρα μπορούμε να θεωρήσουμε τη μέτρησή μας αξιόπιστη. Παρουσία ακτινοβολίας σε συνδυασμό με τον αναστολέα, ο αριθμός των αποικιών μειώνεται δραστικά ακόμα και σε σχέση με το ακτινοβολημένο (IR), επιβεβαιώνοντας την δράση του αναστολέα και στηρίζοντας την υπόθεσή μας - ότι δηλαδή η συνδυασμένη δράση του αναστολέα με την ακτινοβολία αναστέλλει την λειτουργία των επιδιορθωτικών μηχανισμών αυξάνοντας την πιθανότητα του κυτταρικού θανάτου. Επίσης παρατηρούμε ότι παρουσία του αναστολέα υπάρχουν σαφώς λιγότερες αποικίες, γεγονός που μάλλον σχετίζεται με την ελαττωματική επιδιόρθωση ενδογενών βλαβών DNA με τη χρήση του αναστολέα αλλά και με κάποια σχετική «τοξικότητα» ή και με την ίδια την πειραματική διαδικασία λόγω μεγάλης παρόδου του χρόνου.

Οι μεγάλες αποκλίσεις οφείλονται στο τελευταίο δείγμα των 2000 κυττάρων, το οποίο απέχει και από τις αναμενόμενες ανά συνθήκη τιμές. Η εκτίμηση μας είναι ότι η απόκλιση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι, σπέρνοντας μεγάλο αριθμό κυττάρων, δημιουργούνται αποικίες σε πολύ κοντινές αποστάσεις με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ως μια αποικία, ενώ στην πραγματικότητα είναι διπλές ή και τριπλές. Κάτι τέτοιο προφανώς διαφοροποιεί τον αριθμό των αποικιών που μετράμε, αφού η καταμέτρηση μιας αποικίας δεν περιλαμβάνει άνω φράγμα ως προς τον αριθμό των κυττάρων. Ο παραπάνω ισχυρισμός μπορεί να τεκμηριωθεί και από την plate efficiency, της οποίας η τιμή θα έπρεπε να είναι μεγαλύτερη από τις άλλες δύο συνθήκες.

1.9 Μέθοδος Cytokinesis-block Micronucleus (CBMN) Assay

Παρατηρούμε ότι αριθμός μικροπυρήνων στη συνθήκη ελέγχου μας, είναι προβλεπόμενος σύμφωνα με την βιβλιογραφία, δηλαδή 0-30 μικροπυρήνες. Ο αριθμός εξαρτάται από το φύλο, την ηλικία, καθώς και από τις συνήθειες του δότη (όπως το κάπνισμα). Στην παρακάτω καμπύλη από τον ΔΟΕ(Διεθνής Οργανισμός Ενέργειας), φαίνεται η καμπύλη απόκρισης δόσης, σύμφωνα με την οποία θα πρέπει σε μια δόση 1Gy να έχουμε παρουσία 10 περίπου μικροπυρήνων σε 100 διπύρηνα κύτταρα.



Τυπική καμπύλη απόκρισης δόσης για ακτινοβολία γ , σύμφωνα με τον Διεθνή οργανισμό Ενέργειας (IAEA, Cytogenetic Dosimetry, 2011). Τα δεδομένα πάρθηκαν από 47 δότες.

Ο αριθμός των μικροπυρήνων στο δείγμα του 1 Gy, διαφέρει πολύ λίγο από την προβλεπόμενη τιμή του ΔΟΕ. Τα αποτελέσματα αυτά θα αναμενόταν για δόση περίπου 1,25 Gy. Παρόλα αυτά βρίσκονται μέσα στο αναμενόμενο εύρος τιμών.

Παρατηρούμε ελάχιστη αύξηση του αριθμού των μικροπυρήνων παρουσία μόνο του αναστολέα, σε σχέση με το Control μας, πράγμα αναμενόμενο αφού ο αναστολέας δρα κυρίως στο μονοπάτι της μη-ομόλογης σύνδεσης άκρων NHEJ και της επιδιόρθωσης των δίκλωνων θραύσεων, δηλ. των κύριων βλαβών που επάγονται από την ιονίζουσα ακτινοβολία. Επίσης έχουμε σημαντική αύξηση των μικροπυρήνων στον συνδυασμό ακτινοβολίας με αναστολέα και επιβεβαιώνουμε έτσι την υπόθεση μας, ότι δηλαδή ο αναστολέας έχει δράσει και έχει προκαλέσει αναστολή της επιδιόρθωσης στις προκληθείσες από την ακτινοβολία βλάβες.

1.10 Μέθοδος ανοσοφθορισμού-foci

Παρατηρήσεις:

Στις 48 ώρες, στα ακτινοβολημένα κύτταρα, παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός foci/cell παρουσία του αναστολέα, σε σχέση με τα δείγματα χωρίς αναστολέα, δείχνοντας έτσι μικρή δράση του αναστολέα στο χρόνο αυτό. Στις 72 ώρες, στα ακτινοβολημένα κύτταρα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό foci/cell παρουσία και απουσία του αναστολέα.

Αυτό δείχνει την πτώση της δράσης του αναστολέα από τις 6 ώρες και μετά, ενώ στις 72 ώρες από την επώαση, η δράση του φαίνεται να έχει εξασθενήσει εντελώς. Παράλληλα, στα μη ακτινοβολημένα κύτταρα η παρουσία του αναστολέα δεν επηρεάζει τον αριθμό foci/cell.

Έτσι επιβεβαιώνουμε ακόμα ότι η δράση του αναστολέα συμβαίνει μέσω της αναστολής του επιδιορθωτικού μηχανισμού NHEJ, δηλαδή ότι η δράση του αναστολέα είναι συνδυαστική και μόνο παρουσία ακτινοβολίας.

Συμπεράσματα

Οι μέθοδοι του ανοσοφθορισμού και της κλωνογενετικής επιβίωσης επιβεβαίωσαν την δράση του αναστολέα στα καρκινικά κύτταρα MCF-7, μέσω της αναστολής της δράσης της DNA-PK και την απενεργοποίηση του μη ομόλογου ανασχηματισμού τελικής σύνδεσης NHEJ. Και οι τρεις μέθοδοι επιβεβαίωσαν ότι η δράση του αναστολέα σε συνδυασμό με την ακτινοβολία γ, αυξάνει σημαντικά τον αριθμό των επαγόμενων βλαβών. Η δράση του αναστολέα είναι χρονοεξαρτώμενη και φθίνει μετά τις 6 ώρες από την ακτινοβολήση, ενώ σε 72 ώρες μετά την ακτινοβολήση φαίνεται να τείνει να μηδενιστεί.

Η μέθοδος της κλωνογενετικής επιβίωσης έδειξε ότι ο αναστολέας μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο μέσω της αναστολής της δράσης της DNA-PK. Η χρήση του αναστολέα έδειξε αύξηση των βλαβών και σε μοριακό επίπεδο(foci), αλλά και σε χρωμοσωματικό (micronuclei), υποδεικνύοντας έτσι μια συσχέτιση των συγκεντρωμένων αλλοιώσεων (clustered damage) με χρωμοσωματικές βλάβες. Η συσχέτιση αυτή θα πρέπει να αποτελέσει αντικείμενο περαιτέρω μελέτης, καθώς και η δράση του αναστολέα θα πρέπει περαιτέρω να δοκιμαστεί και in vivo.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ τον υπεύθυνο καθηγητή Δρ. Αλέξανδρο Γεωργακιλα, για την ουσιαστική και πολύτιμη συμβολή του, τις πολύτιμες συμβουλές του, την υπομονη του και την συμπαρασταση στην εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Ευχαριστώ τον Διευθυντή του Ινστιτούτου Ραδιοϊσοτόπων – Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» Δρ. Γ. Παντελιά που με προθυμία μου έδωσε την δυνατότητα να εκπονήσω τη μεταπτυχιακή μου εργασία στα πλαίσια του Ινστιτούτου.

Ευχαριστώ την ερευνήτρια, Δρ. Μ. Παραβατού για την καθοδήγηση, την ουσιαστική συμβολή της καθώς και την υπομονή που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής εργασίας. Για άλλη μια φορά απέδειξε οτι εκτός απο εξαιρετική επιστήμων, είναι και σπανιος ανθρωπος.

Ευχαριστώ την Δρ. Γ. Τερζούδη και τη Δρ. Β. Χατζή για την επικοδομητική κριτική και τις χρήσιμες υποδείξεις τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη της ομάδας, Νικητάκη Ζαχαρένια, Μαυραγάνη Ιφιγένεια και Λασκαράτου Δανάη για την στήριξη τους, το εξαιρετικό πνεύμα συνεργασίας, την αμέριστη βοήθεια και για το ότι συνέβαλαν να γίνει η εκπόνηση της εργασίας αυτής όσο το δυνατόν πιο ευχάριστη.

Ευχαριστώ τους φίλους μου, Ιωάννα Παπαζάνη, το Μιχάλη Κατσιλιέρη, τη Σίσσυ και Μαρία Μανουσάκη για τη φιλία τους, την υπομονή τους και τη συμπαράσταση που μου έδειξαν σε όλο το διάστημα της εκπόνησης της εργασίας αυτής και που μου εδειξαν τι σημαίνει συντροφικότητα με τον πιο εμπραχτο τροπο.

Ευχαριστώ την Μαρία Σούλη, το Γιαννη Μαδέση και τον Κώστα Ντρέκη για την φιλία τους, την υπομονή τους και για το ότι έκαναν τις ώρες εκπόνησης και μελέτης αυτής της διπλωματικής κάτι παραπάνω από ευχάριστες. Ευχαριστώ τη Μαρία Καστριώτου και το Λευτέρη Σκορδή που μου μαζι μαθαμε πως με ενα φακελακι τσαι μπορούν να χτιστουν οι πιο δυνατες φιλιες.

Ευχαριστώ πάνω απ' όλους τους γονείς μου, την αδερφή μου και την γιαγιά μου, για την πολύτιμη αγάπη τους και την συμπαράστασή τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gazis, E., *Ionizing Radiation, Applications on Biology and Medicine*. 2002.
2. Προυκάκης, Χ., *Ιατρική ακτινοφυσική*. Εκδόσεις Παρισιάνου, 2004.
3. ALBERTS B., B.D., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., and W. P., *Βασικές αρχές κυτταρικής Βιολογίας- Εισαγωγή στην μοριακή βιολογία του κυττάρου*. Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2000.
4. Γεωργίου, Ε., *Ιατρική φυσική*. Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2008.
5. Ward, J.F., *Biochemistry of DNA lesions*. Radiat. Res, 1981(86): p. 185-195.
6. Ward, J.F., *The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences*. Int. J. Radia. Biol., 1985(66): p. 427-432.
7. Wallace, S.S., *Enzymatic processing of radiation induced free radical damage in DNA*. Radiat. Res, 1998(150): p. 60-79.
8. Hada, M., Georgakilas A., *Formation of clustered DNA Damage after High-LET Irradiation: A review*. J. Radiat. Res., 2008(49): p. 203-210.
9. Goodhead, D.T., Thacker, J., Cox, R., *Effects of radiations of different qualities on cells: Molecular mechanism of damage and repair*. Int. J. Radia. Biol., 1993(63): p. 543-556.
10. Sutherland, B.M., Bennett, P. V., Sidorkina, O., Laval, J., *Clustered Damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: Oxidized bases and strand breaks*. Biochemistry, 2000. **2000**(39): p. 8026-8031.
11. Gollapalle, E., Wong, R., Adetolu, R., Tsao, D., Francisco, D. Sigounas, G., Georgakilas, A. G., *Detections of oxidative clustered DNA lesions in X - irradiated mouse skin tissues and human MCF-77 breast cancer cells*. Radiat. Res, 2007(167): p. 207-216.
12. Elena M. Filippova, D.C.M., John G. Trunk, Betsy M. Sutherland, Stephen R. Quake, John C. Sutherland, *Quantifying Double-Strand Breaks and Clustered Damages in DNA by Single-Molecule Laser Fluorescence Sizing*. Biophysical journal, 2003. **84**: p. 1281-1290.
13. Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A. G., *Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis*. Cancer Letters, 2008(266): p. 6-12.
14. Holt M., S.J.-L., Panayiotidis Mihalīs I. , Georgakilas Alexandros G., *Compromised repair of clustered DNA damage in the human acute lymphoblastic leukemia MSH2-deficient NALM-6 cells*. Mutation Research, 2009. **674**: p. 123-130.
15. B. Sutherland, P.V.B., O. Sidorkina, J. Laval, *DNA damage clusters induced by ionizing radiation in isolated DNA and in human cells*,. Proc. Natl. Academy of Science USA, 2000. **97**: p. 103-108.
16. A.G. Georgakilas, P.V.B., D.M. Wilson III, B.M. Sutherland, *Processing of bistranded abasic DNA clusters in gamma-irradiated human hematopoietic cells*. Nucleic Acids, 2004. **Res. 32** p. 5609–5620.
17. Friedberg, E.C., G. C. Walker, and W. Siede, *DNA Repair and Mutagenesis*. American Society for Microbiology, Washington, DC

1995. **698**.

18. von Sonntag, C., *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor and Francis, London, UK, 1987.
19. Greulich, O., *Photon bring light to DNA repair: The comet assay and laser microbeams for studying photogenotoxicity of drugs and ageing*. Biophotonics, 11/2010. **1-7 2010**.
20. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J. Biol. Chem., 1998. **273**: p. 5858-5868.
21. Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. and Bonner, W.M., *Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo*. J. Cell Biol., 1999. **146** p. 905–916.
22. Ismail, I.H.a.H., M.J., *The gamma-H2A.X: is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more?* Environ. Mol. Mutagen., 2008. **49**: p. 73–82.
23. Sedelnikova, O.A., Rogakou, E.P., Panyutin, I.G. and Bonner, W.M., *Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody*. Radiat. Res., 2008. **158**: p. 486–492.
24. Chen, A.A.a.D.J., *Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose c-irradiation*. Nucleic Acids Research, 2009. **37**(12).
25. Burma, S., et al., *ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks*. J. Biol. Chem., 2001. **276**(42462-42467).
26. Georgakilas, A.G., *Processing of DNA damage clusters in human cells: current status of knowledge*. Mol. Biosyst., 2008. **4**: p. 30-35.
27. C. Allen, J.H., J.A. Nickoloff, *Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining*. Mol. Cancer 2003. **Res. 1**: p. 913–920.
28. Y.-W. Lin, M.K., S. Koishi, M. Sawada, I. Usami, K.-I. Watanabe, Y. Akiyama, *Analysis of mutations at the DNA repair genes in acute childhood leukaemia*. Br. J. Haematol., 1998. **103** p. 462–466.
29. Peltomaki, P., *Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer* Hum. Mol. Genet., 2001. **10**: p. 735–740.
30. Anderson, C.W.a.T.H.C., *The DNA-activated protein kinase -- DNA-PK*. Current Topics in Microbiology & Immunology, 1996. **217**: p. 91-111.
31. M. Takata, M.S.S., E. Sonoda et al., *Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells*. EMBO Journal, 1998. **vol. 17**(no. 18): p. 5497–5508.
32. Sh. Sharma, S.R., *Nonhomologous DNA End Joining in Cell-Free Extracts*. nucleic Acids J., 2010. **2010**.
33. Dvir A, S.L., Calore BL, Dynan WS, *Purification and characterization of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II*. J Biol Chem, 1998. **268**: p. 10440-10447.
34. Smith GCM, J.S., *The DNA-dependent protein kinase*. Genes Dev 1999. **13**: p. 916-934.
35. Smith, G.C., and Jackson, S. P., *The DNA-dependent protein kinase*. Genes Dev., 13, 1999: p. 916–934.
36. Caldecott, J., and Jeggo, P., *Cross sensitivity of gamma ray-sensitive hamster mutants to cross-linking agents*. Mutat. Res., 255: 111–121, 1991.
37. Tanaka, T., Yamagami, T., Oka, Y., Nomura, T., and Sugiyama, H., *The scid mutation in mice causes defects in the repair system for both double-strand DNA breaks and DNA cross-links*. Mutat. Res., 288: 277-280, 1993.
38. Stephany J. Veuger, N.J.C., Caroline J. Richardson, et al., *Radiosensitization and DNA Repair Inhibition by the Combined Use of Novel Inhibitors of DNA-dependent Protein Kinase and Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1*. Cancer Res 2003;63:6008-6015, 2003.

