



**Χημική και Βιομοριακή ανάλυση**

# **Ανίχνευση μεταλλάξεων στο DNA επαγόμενες από ακτινοβολίες στο περιβάλλον**

**ΛΑΥΚΑ ΔΗΜΗΤΡΑ-ΓΕΩΡΓΙΑ**

**Αριθμός μητρώου: 522436**

**Επιβλέπων Καθηγητής  
Γεωργακίλας Αλέξανδρος**

**Ιούνιος 2024**

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή/της φοιτήτριας Λαύκα Δήμητρας-Γεωργίας που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο/η συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του/της συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του/της συγγραφέα/δημιουργού. Ο/Η συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

## **Επιτροπή Κρίσης**

Αλέξανδρος Γεωργακίλας

Σουλτάνα Μαρκοπούλου

Αργυρώ Σγούρου

Ευχαριστώ για όλα τους γιους μου,  
γιατί χωρίς τη δική τους υπομονή  
τίποτα δεν θα γινόταν.

## Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία ασχολείται με την ανίχνευση και τις επιπτώσεις των μεταλλάξεων που προκαλούνται στο DNA από διάφορες μορφές ακτινοβολίας. Το θέμα εξετάζεται μέσα από την κατηγοριοποίηση των ακτινοβολιών σε ιοντίζουσες και μη ιοντίζουσες και τις επιδράσεις τους στο γενετικό υλικό των οργανισμών. Συγκεκριμένα, η εργασία περιγράφει τους ακόλουθους τομείς: Είδη Μεταλλαξογόνων Παραγόντων: Αναλύονται οι μεταλλαξογόνοι παράγοντες που βρίσκονται στα τρόφιμα, το χλωριωμένο νερό, τις αριλαμίνες, το κάπνισμα και το αλκοόλ, τον αμianto, τα φυτοφάρμακα και το βινυλοχλωρίδιο. Ακτινοβολίες που επηρεάζουν το γενετικό υλικό: Εξετάζεται η έκθεση του ανθρώπινου πληθυσμού σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες (όπως ακτίνες X, γάμμα, βήτα, άλφα και ραδόνιο) και μη ιοντίζουσες ακτινοβολίες (όπως υπεριώδεις ακτίνες και ηλεκτρομαγνητικά πεδία χαμηλών συχνοτήτων). Στη συνέχεια αναλύονται οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA που ενεργοποιούνται κατά την έκθεση σε ακτινοβολίες, όπως ο ρόλος των αντιοξειδωτικών ενζύμων και οι διαδικασίες επιδιόρθωσης μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού και μη ομόλογης τελικής συνάθροισης και περιγράφονται οι τύποι μεταλλάξεων που προκαλούνται από την έκθεση σε ακτινοβολίες και τα μοντέλα και οι τεχνικές μελέτης των μεταλλάξεων, όπως μοντέλα κυτταρικής επιβίωσης και προσομοιώσεις Monte Carlo. Συζητούνται οι επιπτώσεις της αποτυχίας επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA, που μπορεί να οδηγήσουν σε ασθένειες όπως η μελαγχρωματική ξηροδερμία, καρκινογένεση και άλλες μεταλλάξεις. Τέλος περιγράφονται διάφορες τεχνικές ανάλυσης του DNA, όπως η αλληλούχιση κατά Sanger, το Next Generation Sequencing (NGS), η PCR, τα Microarrays και άλλες τεχνικές για την ανίχνευση ανώμαλων προτύπων μεθυλίωσης και χρωμοσωμικών ανωμαλιών καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η κατανόηση και ο εντοπισμός των μεταλλάξεων που προκαλούνται από ακτινοβολίες είναι ζωτικής σημασίας για την πρόληψη και τη θεραπεία των σχετικών ασθενειών και για την προστασία της δημόσιας υγείας.

**Λέξεις κλειδιά:** Ιοντίζουσα ακτινοβολία, Μη ιοντίζουσα ακτινοβολία, Μεταλλάξεις DNA, Τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων, Προσομοιώσεις Monte Carlo, Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί DNA, Καρκινογένεση, Γενετική βλάβη, Περιβαλλοντική ακτινοβολία, Διπλές θραύσεις DNA, Επιπτώσεις ακτινοβολίας, Μοντέλα κυτταρικής επιβίωσης,

# Detection of DNA Mutations Induced by Environmental Radiation

**Lafka Dimitra – Georgia**

## **Abstract**

The present thesis focuses on the detection and effects of mutations caused in DNA by various forms of radiation. The topic is examined through the categorization of radiation into ionizing and non-ionizing types and their effects on the genetic material of organisms. Specifically, the thesis describes the following areas:

**Types of Mutagenic Agents:** Analyzes mutagenic agents found in food, chlorinated water, arylamines, smoking and alcohol, asbestos, pesticides, and vinyl chloride.

**DNA Repair Mechanisms Activated by Radiation Exposure:** Analyzes the mechanisms of DNA repair that are activated upon radiation exposure, such as the role of antioxidant enzymes and repair processes through homologous recombination and non-homologous end joining. The effects of failed DNA repair mechanisms are discussed, which can lead to diseases such as xeroderma pigmentosum, carcinogenesis, and other mutations.

**Radiations Affecting Genetic Material:** Examines human exposure to ionizing radiations (such as X-rays, gamma rays, beta particles, alpha particles, and radon) and non-ionizing radiations (such as ultraviolet rays and low-frequency electromagnetic fields). It then describes the types of mutations caused by radiation exposure and the models and techniques used to study these mutations, such as cell survival models and Monte Carlo simulations.

Finally, various DNA analysis techniques are described, such as Sanger sequencing, Next Generation Sequencing (NGS), PCR, Microarrays, and other methods for detecting abnormal methylation patterns and chromosomal abnormalities. The conclusion emphasizes that understanding and identifying radiation-induced mutations is crucial for the prevention and treatment of related diseases and for the protection of public health.

**Keywords:** Ionizing radiation, Non-ionizing radiation, DNA mutations, Mutation detection techniques, Monte Carlo simulations, DNA repair mechanisms, Carcinogenesis, Genetic damage, Environmental radiation, DNA double-strand breaks, Radiation effects, Cellular survival models

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	4
Εικόνες: .....	8
Πίνακες: .....	9
1. Είδη μεταλλαξογόνων παραγόντων .....	10
1.1. Μεταλλαξογόνοι παράγοντες που βρίσκονται στα τρόφιμα: .....	11
1.1.1. Αρωματικοί κυκλικοί υδρογονάνθρακες .....	11
1.1.2. Πυρόλυση αμινοξέων .....	11
1.1.3. Επιπλέον μεταλλαξογόνα στα τρόφιμα .....	12
1.2. Χλωριωμένο νερό και προϊόντα χλωρίωσης: .....	13
1.3. Αριλαμίνες: .....	13
1.4. Κάπνισμα και αλκοόλ: .....	14
1.4.1 Κάπνισμα .....	14
1.4.2. Αλκοόλ .....	15
1.5. Αμίαντος .....	15
1.7. Βινυλοχλωρίδιο (VCM) .....	16
1.8. Λοιπές χημικές ουσίες με καρκινογόνο δράση .....	17
1.9. Ακτινοβολίες που επηρεάζουν το γενετικό υλικό .....	18
1.9.1. Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες: .....	19
1.9.2. Μη ιοντίζουσα ακτινοβολία: .....	25
2. Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται κατά την έκθεση σε ακτινοβολίες .....	28
2.1. Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών ενζύμων και των αντιοξειδωτικών μεταρρυθμιστών στην αντιμετώπιση της ζημίας που προκαλεί η ιοντίζουσα ακτινοβολία στα κύτταρα .....	28
2.2. Η διαδικασία επιδιόρθωσης βλάβης του DNA που προκαλείται από ακτινοβολίες .....	29
2.2.1. Απελευθέρωση της $\gamma$ H2AX από κύτταρα ακτινοβολημένα με ιοντίζουσα ακτινοβολία (IR) .....	30
2.2.2. Επέκταση θηλιάς ως μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA .....	32
2.2.3. Επισκευή DNA μέσω ομόλογης συνδυαστικής επανασύνδεσης (HR). .....	37
2.2.4. Επισκευή DNA μέσω μη ομόλογης τελικής συνάθροισης (NHEJ). .....	44
3. Μεταλλάξεις του DNA που προκαλούνται από την έκθεση σε ακτινοβολίες .....	50
3.1. Μοντέλα και τεχνικές μελέτης μεταλλάξεων .....	50
3.1.1. Μοντέλα Κυτταρικής Επιβίωσης .....	51
3.1.2. Προσομοιώσεις Monte Carlo (MC) για Βλάβες στο DNA .....	54
3.1.3. Ανίχνευση Πολύπλοκων Βλαβών στο DNA .....	55
3.1.4. Αρχές μέτρησης των συγκεντρωμένων βλαβών στο DNA .....	55

3.1.4. Μικροσκοπία και Ανάλυση Εικόνας .....	56
3.2. Μεταλλάξεις που προκαλούνται από ιοντίζουσα ακτινοβολία .....	58
3.2.1. Επιπτώσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας στο DNA .....	62
3.2.2. Επιπτώσεις της έκθεσης των γονέων σε ιοντίζουσα ακτινοβολία στην επόμενη γενιά ..	64
3.3. Μεταλλάξεις που προκαλούνται από τη μη ιοντίζουσα ακτινοβολία .....	65
3.3.1. Υπεριώδεις ακτίνες (UV) .....	65
3.3.2. Επιπτώσεις Ηλεκτρομαγνητικών πεδίων χαμηλών συχνοτήτων (ELF-EMFs) .....	66
4. Επιπτώσεις από τη μη επιτυχή επιδιόρθωση βλαβών που προκαλούνται στο DNA .....	70
4.1. Μελαγχρωματική ξηροδερμία .....	72
4.2. Μεταλλάξεις γονιδίων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία του οργανισμού .....	73
4.2.1. TP53: .....	73
4.2.2. ATM:.....	73
4.2.3. BRCA1 και BRCA2:.....	73
4.2.4. RAD51: .....	74
4.2.5. MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2: .....	74
4.2.6. NBS1 (Nibrin): .....	75
4.3. Καρκινογένεση .....	76
4.4. Μελέτη περίπτωσης: Ισχυρές επιπτώσεις της ιονίζουσας ακτινοβολίας από το Τσερνομπίλ στα ποσοστά μετάλλαξης.....	77
5. Τεχνικές εντοπισμού μεταλλάξεων .....	80
5.1.1. Αλληλούχιση κατά Sanger .....	80
5.1.2. Next Generation Sequencing, NGS .....	81
5.2. PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	87
5.2.1 Κλασική PCR: .....	88
5.2.2. Real-Time PCR .....	88
5.2.3. Allele-Specific PCR (AS-PCR) .....	90
5.2.4. Multiplex PCR.....	91
5.2.5. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	92
5.2.6. Digital PCR (dPCR) .....	93
5.3. Microarrays (DNA chips).....	95
5.4. Ανίχνευση ανώμαλων προτύπων μεθυλίωσης .....	96
5.5. Καρυότυπος (Karyotype) .....	98
5.6. FISH (Fluorescence In Situ Hybridization).....	99
5.7. CGH (Comparative Genomic Hybridization) .....	101
5.8. SNP array (Single Nucleotide Polymorphism array).....	103
Βιβλιογραφία .....	106

## Εικόνες:

Εικόνα 1.1. Φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. <a href="https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/x-rays">https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/x-rays</a> .....	19
Εικόνα 1.2. Έμμεση και άμεση δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. <a href="http://archive.eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/DIB143/cancer_sim.pdf">http://archive.eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/DIB143/cancer_sim.pdf</a> .....	20
Εικόνα 1.3. Δημιουργία X ακτινοβολίας <a href="https://www.thermofisher.com/blog/materials/edx-analysis-with-sem-how-does-it-work/">https://www.thermofisher.com/blog/materials/edx-analysis-with-sem-how-does-it-work/</a> .....	22
Εικόνα 2. 4. Δραστικές μορφές οξυγόνου. <a href="https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-reactive-oxygen-species-and-their-sources-ROS-reactive-oxygen-species_fig1_370358957">https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-reactive-oxygen-species-and-their-sources-ROS-reactive-oxygen-species_fig1_370358957</a> . 28	
Εικόνα 2. 5. Απελευθέρωση της γH2AX από κύτταρα ακτινοβολημένα με ιονίζουσα ακτινοβολία (IR). a. Επίδραση σχετικά υψηλών δόσεων IR (άνω των 10 mGy) b. Επίδραση χαμηλών δόσεων IR (κάτω των 10 mGy). (44).....	31
Εικόνα 2.6. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης HR. ....	39
Εικόνα 2.7. Τα άκρα του DNA υφίστανται επαναλαμβανόμενη επεξεργασία κατά τη διάρκεια του NHEJ. (98).....	47
Εικόνα 3.8. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπικού και παρασκευασμάτων SARS-CoV-2. Image Credit: NIAID/NIH, a figure created with biorender.com .....	57
Εικόνα 3.9. Γενεαλογικό δέντρο και μεταλλάξεις ποντικών (62).....	65
Εικόνα 3. 10. Επιπτώσεις ELF στον άνθρωπο. <a href="https://www.researchgate.net/figure/Schematic-illustration-of-ELF-EMF-effects-on-human-health-The-excessive-exposure-to_fig2_342012191">https://www.researchgate.net/figure/Schematic-illustration-of-ELF-EMF-effects-on-human-health-The-excessive-exposure-to_fig2_342012191</a> .....	69
Εικόνα 5.11. Αυτοραδιογραφία στο gel ηλεκτροφόρησης στη μέθοδο Sanger. 1977.....	81
Εικόνα 5.12. Ανιχνευτές που έχουν χρησιμοποιηθεί στην real-time PCR. a) χρωστική SYBR green I, b) ανιχνευτές υδρόλυσης, c) ανιχνευτές Taqman, d) μοριακοί φάροι, e) ανιχνευτές sunrise, f) σκορπιοί. (130).....	89
Εικόνα 5.13. Φθορισμός συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων αρχικής ποσότητας DNA (131).....	90
Εικόνα 5.14. Σχηματικό Διάγραμμα της Μεθόδου Fluorescence PCR-RFLP (fPCR-RFLP). (134).....	92
Εικόνα 5.15. Αρχές της digital PCR (137) .....	94

## Πίνακες:

Πίνακας 1.1. Μεταλλαζογόνοι Παράγοντες και η Δράση τους.....	18
Πίνακας 1.2. Ακτινοβολίες και Επίδραση τους στα Κύτταρα.....	27
Πίνακας 2.4. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην απελευθέρωση της $\gamma$ H2AX από κύτταρα ακτινοβολημένα με ιοντίζουσα ακτινοβολία (IR) .....	32
Πίνακας 2.5. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επέκταση θηλιάς ως μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA. ....	37
Πίνακας 2.6. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επισκευή DNA μέσω ομόλογης συνδυαστικής επανασύνδεσης (HR). ....	44
Πίνακας 2.7. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επισκευή DNA μέσω μη ομόλογης τελικής συνάθροισης (NHEJ).....	48
Πίνακας 3.3. Τεχνικές και μοντέλα .....	57
Πίνακας 4.8. Γονίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία του οργανισμού και η δράση τους.....	75
Πίνακας 5.9. Τεχνικές εντοπισμού μεταλλάξεων συγκεντρωτικά .....	104

## 1. Είδη μεταλλαξογόνων παραγόντων

Οι μεταλλαξογόνοι παράγοντες είναι χημικές ενώσεις ή μορφές ακτινοβολίας (όπως το υπεριώδες φως ή οι ακτίνες X) που προκαλούν αμετάκλητες και κληρονομικές αλλαγές (μεταλλάξεις) στο κυτταρικό γενετικό υλικό, το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA). Οι μεταλλάξεις επιμένουν όταν διαφεύγουν την ανίχνευση από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA του κυττάρου, όταν δεν γίνεται σωστά η επιδιόρθωση, ή όταν παρατηρείται βλάβη στους ίδιους τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αυτές οι μεταλλάξεις εδραιώνονται στο γονιδίωμα και κληρονομούνται από όλα τα θυγατρικά κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο, η μεταλλαξογένεση γίνεται μια σωρευτική διαδικασία, εκτεινόμενη σε όλη τη διάρκεια ζωής ενός οργανισμού. (1)

Παρόλο που πολλοί διατροφικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν καταταχθεί ως μεταλλαξογόνοι, τα κύτταρα υπόκεινται διαρκώς σε έναν βομβαρδισμό από αυθόρμητες βλάβες του DNA. Η αυθόρμητη υδρόλυση των βάσεων του DNA από τον σάκχαρο-φωσφορική σταθερό σκελετό, η συνεχής έκθεση του κυτταρικού DNA σε ελεύθερες ρίζες που προέρχονται από το οξυγόνο και οι χαμηλοί ρυθμοί λάθους κατά την αντιγραφή του DNA συμβάλλουν όλα στο φορτίο μεταλλάξεων. Εκτός από αυτές τις πηγές, σημαντική έκθεση σε μεταλλαξογόνες ενώσεις μπορεί να συμβεί μέσω της τροφής και του νερού, καθώς και μέσω περιβαλλοντικών και επαγγελματικών πηγών. Πολλά φυσικά συστατικά των τροφίμων είναι μεταλλαξογόνα και παράγονται από τα φυτά ως αμυντικοί παράγοντες. Ωστόσο, επιπλέον μεταλλαξογόνα μπορεί να παρουσιαστούν ως υπολείμματα ενώσεων που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγή τροφίμων ή που διαρρέουν από υλικά συσκευασίας. Μεταλλαξογόνες ενώσεις μπορούν επίσης να παραχθούν κατά το μαγείρεμα και την προετοιμασία των τροφίμων. Τα τρόφιμα περιέχουν επίσης πολλές ενώσεις που μπορούν να διαμορφώσουν τη δραστηριότητα των μεταλλαξογόνων. Για να ελαχιστοποιηθεί η έκθεση σε μεταλλαξογόνους παράγοντες, η πλειονότητα των αναπτυγμένων χωρών έχει εφαρμόσει πρωτόκολλα που ελέγχουν την εισαγωγή νέων τροφίμων και χημικών ουσιών που σχετίζονται με τρόφιμα ώστε επιτραπεί η κυκλοφορία τους στην αγορά. Με την πρόοδο στην κατανόηση των μεταλλαξογόνων διαδικασιών, υπάρχουν τρόφιμα και είδη επαφής με τρόφιμα που μπορούν επίσης να επανεκτιμηθούν και να γίνουν ή όχι αποδεκτά. (1)

## 1.1. Μεταλλαξογόνοι παράγοντες που βρίσκονται στα τρόφιμα:

### 1.1.1. Αρωματικοί κυκλικοί υδρογονάνθρακες

Περίπου το 1963 έγινε η πρώτη αναφορά στους κυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Συγκεκριμένα αναφέρθηκε ότι το βόειο κρέας που ψήνεται πάνω σε γκριλ αερίου ή κάρβουνου περιείχε μια ποικιλία κυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs). Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι υπήρχε βενζοπυρένιο σε μπιριζόλες που ψήθηκαν σε κάρβουνο σε επίπεδα έως και 8  $\mu\text{g/kg}$ . (2) Η πηγή των PAHs που προκύπτει από το ψήσιμο σε κάρβουνο είναι ο καπνός που παράγεται όταν το πυρολυμένο λίπος του κρέατος στάζει πάνω στα ζεστά κάρβουνα. Έτσι, τα κρέατα με το υψηλότερο περιεχόμενο λίπους αποκτούν τα υψηλότερα επίπεδα αυτών των χημικών. Όταν το κρέας μαγειρεύεται με τρόπο που αποκλείει την έκθεση στον καπνό που παράγεται από το στάζον λίπος, αυτή η πηγή μόλυνσης μειώνεται ή εξαλείφεται. (3)

Οι PAHs έχουν επίσης βρεθεί σε μια ποικιλία καπνισμένων τροφών και σε ψημένο καφέ. Τα λαχανικά μπορούν εύκολα να μολυνθούν από PAHs από τον αέρα, το έδαφος ή το νερό· τα ψάρια και τα οστρακοειδή μπορούν να απορροφήσουν τέτοιες χημικές ουσίες από τα θαλάσσια περιβάλλοντά τους. Ωστόσο, εκτός εάν τα λαχανικά ή τα θαλασσινά προέρχονται από ιδιαίτερα μολυσμένα περιβάλλοντα, η κύρια πηγή των PAH πιθανότατα θα είναι το κάπνισμα ή το μαγείρεμα των τροφίμων. (4)

### 1.1.2. Πυρόλυση αμινοξέων

Κατά τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει σαφές ότι οι PAHs αποτελούν μόνο ένα μικρό μέρος της μεταλλακτικής (και, συνεπώς, πιθανώς καρκινογόνου) δραστηριότητας που συμβαίνει στα τρόφιμα κατά το μαγείρεμα. Σε πειράματα που έγιναν για τη μέτρηση των PAHs, παρατηρήθηκε μεταλλακτική δραστηριότητα πολύ μεγαλύτερη από τις μετρήσεις του βενζοπυρενίου και έγιναν εκτενείς μελέτες στους λόγους που προκάλεσαν την αύξηση αυτή. (5)

Για να προσδιοριστεί ποιο ή ποια συστατικά του ψαριού και του κρέατος συμβάλλουν στη μεταλλακτική δραστηριότητα που παράγεται από το μαγείρεμα, έχουν διεξαχθεί μελέτες για την εξέταση της μεταλλακτικότητας των συμπυκνωμάτων καπνού από διάφορες ουσίες. Ο καπνός που λαμβάνεται από πυρολυμένες πρωτεΐνες, όπως η λυσοζύμη και η ιστόνη, βρέθηκε να είναι ιδιαίτερα μεταλλακτικός για το *S. typhimurium*, ενώ τα συμπυκνώματα καπνού από πυρολυμένο DNA, RNA, άμυλο ή φυτικό λάδι ήταν μόνο ελαφρώς μεταλλακτικά. Η πυρόλυση της τρυπτοφάνης προκάλεσε περισσότερη μεταλλακτική δραστηριότητα από ό,τι οποιοδήποτε

άλλο συνηθισμένο αμινοξύ, αλλά σχεδόν όλα τα αμινοξέα που δοκιμάστηκαν παρήγαγαν κάποια μεταλλακτική δραστηριότητα όταν πυρολύθηκαν. (6)

Οι αναλύσεις επιβεβαιώνουν την παρουσία μεταλλαξογόνων προϊόντων πυρόλυσης από αμινοξέα σε μαγειρεμένα τρόφιμα, ιδιαίτερα σε τρόφιμα που έχουν μαγειρευτεί πολύ καλά ή και καεί, υποδηλώνοντας μια πιθανή σχέση μεταξύ μαγειρέματος και καρκινογένεσης. Η μεταλλακτική δραστηριότητα στα βακτήρια υποδεικνύει πιθανή γονιδιοτοξικότητα και καρκινογονικότητα, κάτι που επιβεβαιώνεται από ευρήματα σε ζωικά μοντέλα, όπου συγκεκριμένες μεταλλαξογόνες ενώσεις προκαλούν καρκινικούς όγκους. Παράλληλα, υπάρχει η προειδοποίηση ότι η παρουσία καρκινογόνων χημικών σε πυρολυμένα αμινοξέα δεν σημαίνει απαραίτητα την παρουσία τους σε κανονικά μαγειρεμένα τρόφιμα. Επιπλέον, συζητείται η ιδέα ότι οι μεταλλαξογόνες ενώσεις μπορεί να προκύπτουν από αντιδράσεις μεταξύ σακχάρων και αμινών παρά από απλή πυρόλυση πρωτεϊνών. (7)

### **1.1.3. Επιπλέον μεταλλαξογόνα στα τρόφιμα**

Καρκινογόνες ή μεταλλαξιογόνες ουσίες βρίσκονται συχνότερα σε συντηρητικά και χρωστικές ουσίες παρά στα ίδια τα τρόφιμα. Νιτρώδη και νιτρικά άλατα, τα οποία προστίθενται σε ψάρια, κρέατα και αλλαντικά, μπορούν να μετατραπούν σε καρκινογόνες νιτροζαμίνες, συνδεδεμένες με καρκίνο του ήπατος και του στομάχου. (8) Η υψηλή πρόσληψη αλατιού, ειδικά στην Ιαπωνία όπου η διατροφή είναι πλούσια σε αλάτι, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του στομάχου. (9) Μελέτες έχουν δείξει ότι άτομα με διατροφή πλούσια σε αλάτι έχουν διπλάσιο κίνδυνο για καρκίνο του στομάχου συγκριτικά με εκείνους που καταναλώνουν λιγότερο αλάτι, ενώ η υψηλή κατανάλωση αλατιού είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με λοίμωξη από το βακτήριο *Helicobacter pylori*. (10)

Η κατανάλωση επεξεργασμένων τροφίμων και ζωικών πρωτεϊνών και λιπών συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για διάφορους τύπους καρκίνου, ειδικά του παχέος εντέρου, του μαστού και του προστάτη. Αντίθετα, η κατανάλωση λαχανικών και δημητριακών φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο. Οι δίαιτες πλούσιες σε κόκκινα κρέατα και λιπαρά συνδέονται επίσης με τον καρκίνο του παχέος εντέρου και του ορθοσιγμοειδούς. Παράγοντες όπως η μειωμένη πρόσληψη ασβεστίου, η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ, η έλλειψη φυσικής άσκησης, και η παχυσαρκία ενισχύουν επιπρόσθετα τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου, ιδιαίτερα του ενδομητρίου και του νεφρού. (11)

Τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και β-λιποπρωτεΐνης στο αίμα συνδέονται θετικά με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου και αδενωμάτων. Επιπλέον, η έλλειψη ορισμένων βιταμινών, όπως η βιταμίνη Α για τον καρκίνο του πνεύμονα, η βιταμίνη Β2 και C για τον καρκίνο του οισοφάγου, και η βιταμίνη C για τον καρκίνο του στομάχου, μπορεί να προάγει την ανάπτυξη καρκίνων. Μια διατροφή πλούσια σε φυτικές ίνες, με φρέσκα φρούτα, λαχανικά, ψωμί ολικής άλεσης, και δημητριακά, μαζί με τον περιορισμό κόκκινου κρέατος, ζάχαρης και αλκοόλ, μπορεί να συμβάλλει στη μείωση κατά 35% του κινδύνου για καρκίνο του μαστού και άλλων μορφών καρκίνου. (12)

## 1.2. Χλωριωμένο νερό και προϊόντα χλωρίωσης:

Η χλωρίωση του νερού είναι μια από τις παλαιότερες μεθόδους επεξεργασίας για την καταπολέμηση μικροοργανισμών και βακτηρίων, καθιστώντας το χλώριο σημαντικό για την διασφάλιση της δημόσιας υγείας στην ύδρευση και τις πισίνες. Ωστόσο, η χρήση του πρέπει να γίνεται με προσοχή, καθώς υπερβολικές ποσότητες μπορούν να είναι βλαβερές και να προκαλέσουν διάβρωση στα δίκτυα ύδρευσης ή να επηρεάσουν την γεύση του νερού. Επιπλέον, το χλώριο και τα παράγωγά του, όπως τα τριαλομεθάνια που παράγονται από την αντίδραση του χλωρίου με οργανικές ενώσεις, μπορούν να είναι τοξικά και να αυξήσουν τον κίνδυνο για κάποιους τύπους καρκίνου, όπως του παχέος εντέρου και της ουροδόχου κύστης. Σημαντική είναι η ασφαλής χρήση του χλωρίου με την εφαρμογή κατάλληλων μέτρων προστασίας κατά τη διαχείριση. Μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ μακροχρόνιας έκθεσης σε χλωριωμένο νερό και αύξησης του κινδύνου για καρκίνο, ενώ τα χλωριωμένα νερά μπορούν να είναι ερεθιστικά για το δέρμα και να προκαλέσουν αναπνευστικά προβλήματα. (13)

## 1.3. Αριλαμίνες:

Οι αριλαμίνες, εκτός από τους ατμούς του μαγειρέματος και τα τρόφιμα, χημικά συνθέτονται και περιέχονται σε οξειδωτικά, εποξειδικά πολυμερή, εκρηκτικά, μυκητοκτόνα, χρωστικές, πολυουρεθάνες και χρησιμοποιούνται στην καουτσούκ, φαρμακολογία, καλλυντικά και άλλες χημικές βιομηχανίες. Πολλές αριλαμίνες υπάρχουν παντού στον καπνό του τσιγάρου, στα καυσάτρια των αυτοκινήτων, σε βιομηχανικούς χώρους κ.λπ. Ορισμένες μπορούν να παραχθούν μέσω της αναγωγής από εντερικούς, δερματικούς και περιβαλλοντικούς

μικροοργανισμούς από χρωστικές που χρησιμοποιούνται ευρέως. Οι αρυλαμίνες μπορούν επίσης να παραχθούν με την αναγωγή της ομάδας νιτρο που περιέχουν πολυυδρατικών υδρογονανθράκων συμπεριλαμβανομένων των πυρομαχικών. Ορισμένες αρυλαμίνες απελευθερώνονται καίγοντας νιτρογονούχα οργανικά υλικά σε υψηλές θερμοκρασίες. Ορισμένα φάρμακα είναι επίσης αρυλαμίνες. Επιπλέον, πολλές αρυλαμίνες είναι ουσιώδη συστατικά του φυσιολογικού μεταβολισμού ή αποτέλεσμα ανώμαλου μεταβολισμού ή διατροφικών πηγών. Ορισμένες είναι μεταλλαξογόνες, καρκινογόνες ή αιτία άλλων ειδών παθήσεων. Κάποιες αρυλαμίνες θεωρούνται οι κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες των όγκων της ουροδόχου κύστης σε ανθρώπους και ζώα, αλλά μπορούν επίσης να προκαλέσουν άλλους τύπους καρκίνων σε διάφορα όργανα. Η ειδικότητα οργάνου, ιστού και είδους της καρκινογένεσης μπορεί να καθορίζεται από τη διαθεσιμότητα, την κατανομή και την παρουσία ενζύμων μεταβολικής ενεργοποίησης/αποτοξίνωσης κάθε οργάνου ή ιστού διαφορετικών ειδών. Οι πανταχού παρούσες αρυλαμίνες, συνεπώς, αποτελούν σοβαρούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον. (14)

## 1.4. Κάπνισμα και αλκοόλ:

### 1.4.1 Κάπνισμα

Από το 1990 έως το 2000, καταναλώθηκαν ετησίως περίπου 5.5 τρισεκατομμύρια τσιγάρα, ή περίπου 1.000 τσιγάρα ανά άτομο σε παγκόσμιο επίπεδο. Καθημερινά καπνίζονται περίπου 15 δισεκατομμύρια τσιγάρα. Εκτιμάται ότι το κάπνισμα συνδέεται με περισσότερους από 1 εκατομμύριο θανάτους από καρκίνο ετησίως παγκοσμίως, με τον καρκίνο του πνεύμονα να είναι η πιο συχνή μορφή, με 1.2 εκατομμύρια κρούσματα ετησίως, εκ των οποίων το 90% αφορά καπνιστές. (15)

Το κύριο ρεύμα του καπνού από το τσιγάρο περιέχει περίπου 1010 σωματίδια/mL, (16) με το 95% του καπνού να αποτελείται από αέρια όπως άζωτο, οξυγόνο, και διοξείδιο του άνθρακα. Η σωματιδιακή φάση περιέχει πάνω από 3.500 βιολογικά δραστικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των καρκινογόνων. Στον καπνό εντοπίζονται περίπου 7.000 χημικές ουσίες, με πάνω από 4.000 να είναι τοξικές και πάνω από 43 καρκινογόνες. (17)

Το κάπνισμα έχει σχετιστεί με τον καρκίνο του πνεύμονα από τις δεκαετίες του '50 και του '60, με το 87% των καρκίνων του πνεύμονα να σχετίζονται με το κάπνισμα. Οι καπνιστές έχουν 8

έως 20 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του πνεύμονα σε σύγκριση με τους μη καπνιστές, ενώ οι βαρείς καπνιστές έχουν έως 50 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα. (18)

#### **1.4.2. Αλκοόλ**

Η αιθανόλη ή αλκοόλ, κατατάσσεται ως καρκινογόνος ουσία, με την υπερβολική κατανάλωσή της να συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για πολλά είδη καρκίνου, όπως του μαστού, του ήπατος, του οισοφάγου, του φάρυγγα, της στοματικής κοιλότητας, του λάρυγγα και του εντέρου. Η κοινή κατανάλωση αλκοόλ και το κάπνισμα εντείνουν τον κίνδυνο. Το αλκοόλ ευθύνεται για περίπου 10% των κακοηθειών στους άνδρες και 3% στις γυναίκες, με τα ποσοστά να αυξάνονται σε άτομα που καταναλώνουν περισσότερο από τη συνιστώμενη δόση. Μία μερίδα αλκοολούχου ποτού ορίζεται σε περίπου 12 γραμμάρια αιθανόλης. (19) Η κατανάλωση ακόμα και μικρών ποσοτήτων μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού ενώ το αλκοόλ έχει αναγνωριστεί ως αιτία για καρκίνους του στόματος, του φάρυγγα, του λάρυγγα, του οισοφάγου, , (20) του ορθού και του κόλον. (21)

### **1.5. Αμιάντος**

Η βλαπτική επίδραση του αμιάντου στην υγεία είναι γνωστή από την εποχή της ρωμαϊκής αυτοκρατορίας, με τον Pliny να παρατηρεί τις πρώιμες επιπτώσεις σε σκλάβους που εργάζονταν σε ορυχεία αμιάντου. Από το 1898, επιβεβαιώνεται η συσχέτιση του αμιάντου με πνευμονικές νόσους. Ο αμιάντος, ένα ινώδες, πυριτικό και ανθεκτικό στη θερμότητα υλικό, χρησιμοποιήθηκε ευρέως σε πάνω από 3.000 εφαρμογές λόγω των ιδιοτήτων του. Ωστόσο, οι μικροσκοπικές ίνες του είναι ιδιαίτερα επικίνδυνες όταν εισπνέονται, καθώς δύσκολα απομακρύνονται από τους πνεύμονες και μπορούν να προκαλέσουν διάφορους τύπους καρκίνου, όπως των πνευμόνων, μεσοθηλίωμα, και άλλους. Η έκθεση στον αμιάντο, είτε μέσω αέρα είτε μέσω νερού, συνδέεται με σοβαρές υγειονομικές συνέπειες, μεταξύ των οποίων και η αμιάντωση, η οποία σχεδόν πάντα οδηγεί στον θάνατο. Η χρήση του αμιάντου έχει πλέον περιοριστεί σημαντικά, με τις περισσότερες χώρες να νομοθετούν αυστηρά όρια για την παρουσία των ινών του στο περιβάλλον. (22)

## 1.6. Φυτοφάρμακα – εντομοκτόνα

Στα φυτοφάρμακα, τα εντομοκτόνα, και τα πλαστικά βρίσκουμε ουσίες που ανήκουν στην ομάδα των οργανοχλωριωμένων ενώσεων, οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν αιτία για την εμφάνιση καρκίνου. Αυτές οι ουσίες διακρίνονται για την ανθεκτικότητά τους στο περιβάλλον και είναι γνωστές ως POPs (Persistent Organic Pollutants). Μπορούν να μεταφερθούν μακριά από το σημείο που απελευθερώθηκαν και να συσσωρευτούν στην τροφική αλυσίδα, φτάνοντας έτσι στον άνθρωπο κυρίως μέσω της διατροφής, ιδιαίτερα από κρέας και γάλα. Οι συγκεκριμένες ουσίες, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται σε φυτοφάρμακα και μικροβιοκτόνα, μπορούν να επηρεάσουν το ενδοκρινολογικό σύστημα, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνων που εξαρτώνται από τις ορμόνες, όπως ο καρκίνος του μαστού, του προστάτη, και των όρχεων.

Ένας από τους πιο γνωστούς χλωριωμένους υδρογονάνθρακες που χρησιμοποιήθηκε ευρέως ως εντομοκτόνο είναι το DDT. Αυτό το φυτοφάρμακο χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τα αμερικανικά στρατεύματα κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου για την καταπολέμηση τύφου και ελονοσίας, σώζοντας εκατομμύρια ζωές. Ωστόσο, η εκτεταμένη και αλόγιστη χρήση του DDT στη γεωργία οδήγησε στη συσσώρευση του στο περιβάλλον και τελικά σε αρνητικές επιπτώσεις για την υγεία του ανθρώπου και των ζώων. Η τοξικότητά του και οι επιδράσεις του στη ρύπανση του περιβάλλοντος έγιναν εμφανείς μόνο δεκαετίες αργότερα, οδηγώντας στην απαγόρευση ή περιορισμένη χρήση του σε πολλές χώρες. (23)

## 1.7. Βινυλοχλωρίδιο (VCM)

Το βινυλοχλωρίδιο (VCM), το βασικό συστατικό για την παραγωγή PVC, για πολλά χρόνια δεν θεωρείτο επιβλαβές για τους εργαζόμενους στις σχετικές βιομηχανίες. Ως αέριο, όμως, μπορεί να προκαλέσει αναισθησία και στο παρελθόν είχε ακόμα και δοκιμαστεί ως αναισθητικό, πριν ανακαλυφθεί η καρκινογόνος δράση του. Μια εκτενής έρευνα σε εργαζόμενους της εταιρείας BFGoodrich στο Kentucky αποκάλυψε ότι το VCM προκαλούσε αγγειοσάρκωμα του ήπατος, έναν σπάνιο τύπο καρκίνου, στους εργαζόμενους που είχαν εκτεθεί σε αυτό. Επακόλουθες επιδημιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν τον αυξημένο κίνδυνο καρκίνου από την έκθεση στο VCM, οδηγώντας στην αναγνώρισή του ως καρκινογόνου για τον άνθρωπο από την IARC (Διεθνή Υπηρεσία Έρευνας για τον Καρκίνο). Το VCM είναι ένα

επικίνδυνο τοξικό και εύφλεκτο αέριο, με τα προϊόντα καύσης του να αποτελούν επίσης σημαντικούς τοξικούς κινδύνους. (24)

## 1.8. Λοιπές χημικές ουσίες με καρκινογόνο δράση

Στην πραγματικότητα, υπάρχουν πάνω από 100.000 χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται σε καταναλωτικά προϊόντα και είναι παρούσες στο περιβάλλον μας. Από το 1969, η Διεθνής Υπηρεσία Έρευνας του Καρκίνου (IARC) έχει κατατάξει πολλές από αυτές τις ουσίες ως καρκινογόνες, μεταξύ των οποίων:

- **Ασβέστης:** Η εισπνοή ασβέστη μπορεί να προκαλέσει καρκίνο στον πνεύμονα.
- **Βενζόλιο:** Είναι ένας διαλύτης και πρώτη ύλη για πολλές βιομηχανικές εφαρμογές, με γνωστή καρκινογόνο και μεταλλαξιογόνο δράση. (25)
- **Κάδμιο:** Είναι ένα από τα πιο καρκινογόνα μέταλλα, με δυνατότητα αύξησης του κινδύνου για καρκίνο του προστάτη και άλλους καρκίνους.
- **Φορμαλδεΐδη:** Χρησιμοποιείται σε πολλά συνθετικά υλικά και μπορεί να προκαλέσει ερεθισμούς και αναπνευστικά προβλήματα, ενώ έχει καταταχθεί ως καρκινογόνος.
- **Χρώμιο:** Είναι φυσικό στοιχείο του περιβάλλοντος, χρησιμοποιούμενο σε πολλές βιομηχανικές διαδικασίες, με την έκθεση σε αυτό να αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο.
- **Χλωρο-μεθυλαιθέριο:** Χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία πλαστικών και έχει συνδεθεί με την αύξηση κινδύνου για καρκίνο του δέρματος σε ποντίκια και αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο σε εργαζόμενους.
- **Οργανοχλωριωμένες ενώσεις:** Χρησιμοποιούνται για την παραγωγή χλωριωμένων πλαστικών και φυτοφαρμάκων, ενοχοποιούνται για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού.

Αυτές οι ουσίες είναι μόνο μερικά παραδείγματα των πολλών καρκινογόνων χημικών που μπορεί να συναντήσει κανείς στο περιβάλλον και τα καθημερινά προϊόντα, επισημαίνοντας την ανάγκη για προσεκτική διαχείριση και περιορισμό της έκθεσης σε τέτοιες ουσίες.

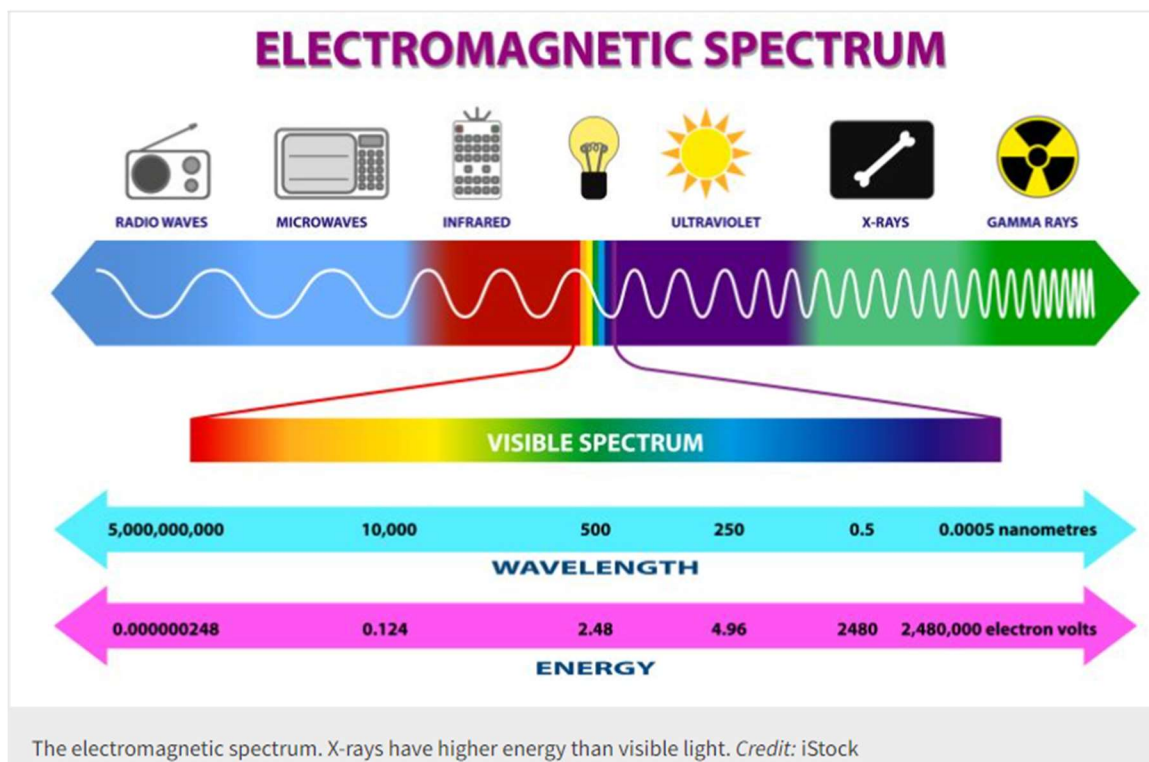
Πίνακας 1.1. Μεταλλαξογόνοι Παράγοντες και η Δράση τους

Μεταλλαξογόνος Παράγοντας	Δράση
Αρωματικοί κυκλικοί υδρογονάνθρακες	Προκαλούν μεταλλάξεις στο DNA κατά το μαγείρεμα, ειδικά σε κρέατα ψημένα σε κάρβουνο
Πυρόλυση αμινοξέων	Παράγουν μεταλλακτική δραστηριότητα κατά το μαγείρεμα, ειδικά σε καλοψημένα ή καμένα τρόφιμα
Νιτρώδη και νιτρικά άλατα	Μετατρέπονται σε καρκινογόνες νιτροζαμίνες
Χλωριωμένο νερό και προϊόντα χλωρίωσης	Παράγουν τοξικά τριαλομεθάνια που αυξάνουν τον κίνδυνο για καρκίνο
Αριλαμίνες	Υπάρχουν σε χημικά προϊόντα και καύσεις, προκαλούν καρκίνο της ουροδόχου κύστης
Κάπνισμα	Περιέχει πολλές καρκινογόνες ουσίες που συνδέονται με καρκίνο του πνεύμονα
Αλκοόλ	Καρκινογόνος ουσία που συνδέεται με πολλούς τύπους καρκίνου
Αμίαντος	Εισπνεόμενες ίνες προκαλούν καρκίνο των πνευμόνων και μεσοθηλίωμα
Φυτοφάρμακα – εντομοκτόνα	Περιέχουν οργανοχλωριωμένες ενώσεις που προκαλούν καρκίνο μέσω της τροφικής αλυσίδας
Βινυλοχλωρίδιο (VCM)	Προκαλεί αγγειοσάρκωμα του ήπατος
Άλλες χημικές ουσίες (Ασβέστης, Βενζόλιο, Κάδμιο, Φορμαλδεΰδη, Χρώμιο, Χλωρο-μεθυλαιθέριο, Οργανοχλωριωμένες ενώσεις)	Διάφορες χημικές ουσίες προκαλούν καρκίνο μέσω εισπνοής, επαφής ή κατανάλωσης

## 1.9. Ακτινοβολίες που επηρεάζουν το γενετικό υλικό

Ο ανθρώπινος πληθυσμός έρχεται σε επαφή με διάφορες μορφές ακτινοβολίας, όπως εκείνη που χρησιμοποιείται για ιατρικούς σκοπούς, όπως οι ακτινοσκοπήσεις και η ακτινοθεραπεία. Επιπλέον, εκτίθεται στην κοσμική ακτινοβολία που φτάνει στη Γη από το διάστημα, καθώς και στην ακτινοβολία που εκπέμπουν τα ραδιενεργά υλικά στη φύση. Κατά περιόδους, οι

άνθρωποι μπορεί να εκτεθούν σε υψηλά επίπεδα ακτινοβολίας κατά τη διάρκεια δοκιμών ατομικών όπλων και σε πυρηνικά ατυχήματα.(εικόνα 1.1) (26)



Εικόνα 1.1. Φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/x-rays>

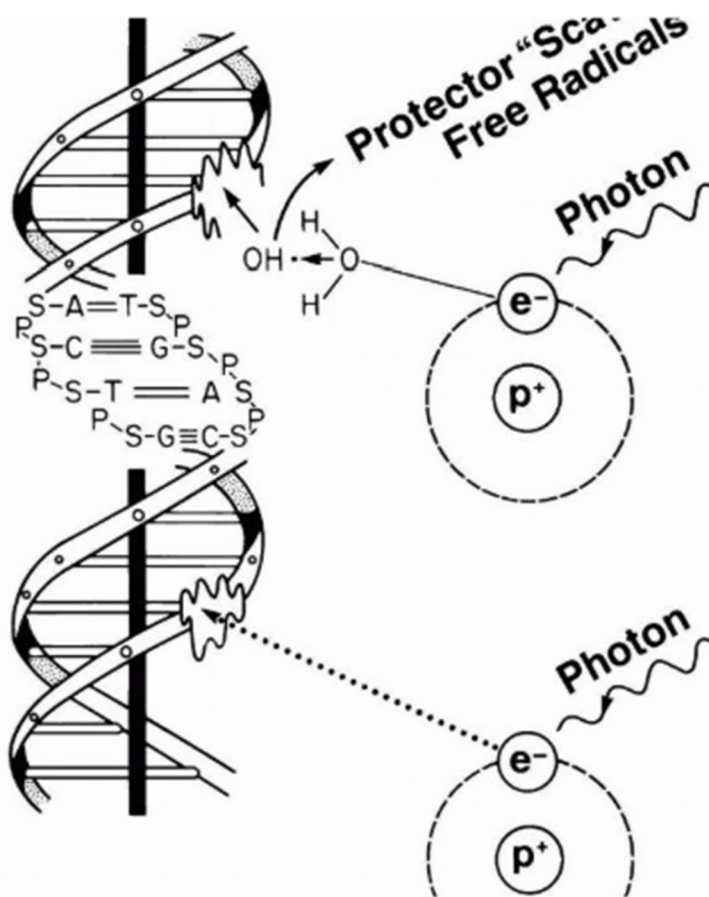
Στην παρούσα διπλωματική θα αναλυθούν οι ακτινοβολίες που υπάρχουν φυσιολογικά στο περιβάλλον και στις οποίες εκτίθενται ο άνθρωπος, καθώς και οι επιπτώσεις στο DNA και οι τρόποι ανίχνευσης αυτών των επιπτώσεων. Αυτές είναι:

### 1.9.1. Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες:

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία, από ορισμό, "ιοντίζει", δηλαδή εκτοπίζει ένα ηλεκτρόνιο από την τροχιά του γύρω από έναν ατομικό πυρήνα, προκαλώντας τον σχηματισμό ηλεκτρικών φορτίων σε άτομα ή μόρια. Αν αυτό το ηλεκτρόνιο προέρχεται από το ίδιο το DNA ή από ένα γειτονικό μόριο και χτυπήσει απευθείας το μόριο του DNA, η επίδραση ονομάζεται άμεση δράση. Αυτός ο αρχικός ιοντισμός λαμβάνει χώρα πολύ γρήγορα, σε περίπου 0.0000000000000001 του δευτερολέπτου. Ωστόσο, σήμερα εκτιμάται ότι περίπου τα δύο τρίτα της ζημιάς που προκαλείται από τις ακτίνες X οφείλεται σε έμμεση δράση. (27)

Αυτό συμβαίνει όταν το ελευθερωμένο ηλεκτρόνιο δεν χτυπά απευθείας το DNA, αλλά αντ' αυτού χτυπά ένα κοινό μόριο νερού. Αυτό ιοντίζει το μόριο του νερού, παράγοντας τελικά αυτό

που είναι γνωστό ως ελεύθερη ρίζα. Μια ελεύθερη ρίζα αντιδρά πολύ έντονα με άλλα μόρια καθώς επιδιώκει να αποκαταστήσει μια σταθερή διαμόρφωση ηλεκτρονίων. Μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να πλανάται γύρω για έως και 10,000,000,000 φορές περισσότερο από τον χρόνο που απαιτείται για την αρχική ιοντισμό (αυτό εξακολουθεί να είναι πολύ σύντομος χρόνος, περίπου 0.00001 του δευτερολέπτου), αυξάνοντας την πιθανότητα να διαταράξει το κρίσιμο μόριο DNA. (εικόνα 1.2) Αυτό αυξάνει επίσης τη δυνατότητα να εισαχθούν άλλες ουσίες που θα μπορούσαν να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες πριν προκαλέσουν ζημιά. (27)



Εικόνα 1.2. Έμμεση και άμεση δράση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

[http://archive.eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/DIB143/cancer\\_sim.pdf](http://archive.eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/DIB143/cancer_sim.pdf)

Οι νετρόνια λειτουργούν αρκετά διαφορετικά. Ένα γρήγορο νετρόνιο θα παρακάμψει τα τροχιακά ηλεκτρόνια και περιστασιακά θα συγκρουστεί απευθείας με έναν ατομικό πυρήνα, αποσπώντας μεγάλα σωματίδια όπως άλφα σωματίδια, πρωτόνια ή μεγαλύτερα κομμάτια του πυρήνα. Οι συχνότερες συγκρούσεις είναι με πυρήνες άνθρακα ή οξυγόνου. Τα σωματίδια που δημιουργούνται θα ξεκινήσουν μετά να ιοντίζουν τα κοντινά ηλεκτρόνια. Ένα αργό νετρόνιο δεν θα έχει την ενέργεια να αποσπάσει μεγάλα σωματίδια όταν χτυπήσει έναν πυρήνα. Αντ' αυτού, το νετρόνιο και ο πυρήνας θα αναπηδήσουν ο ένας από τον άλλο, όπως οι μπάλες του μπιλιάρδου. Κατά τη διαδικασία αυτή, το νετρόνιο θα επιβραδυνθεί, και ο πυρήνας θα

αποκτήσει ταχύτητα. Η συχνότερη σύγκρουση είναι με έναν πυρήνα υδρογόνου, ένα πρωτόνιο που μπορεί να διεγερθεί ή να ιονίσει ηλεκτρόνια σε κοντινά άτομα. (27)

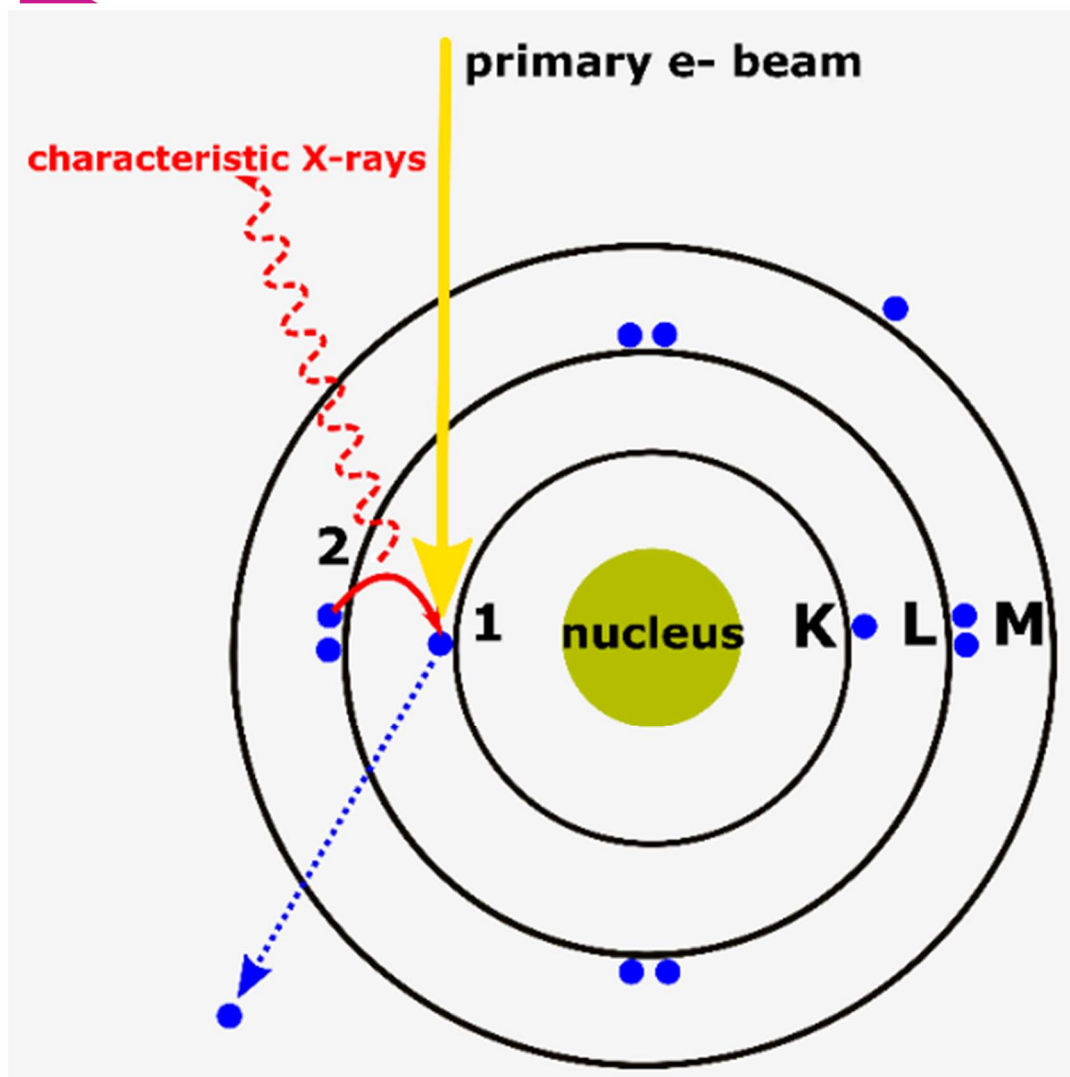
**Ακτινοβολία X:** Χρησιμοποιείται στην ιατρική απεικόνιση και την ακτινοθεραπεία. Οι ακτίνες X είναι μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που συνήθως έχει ενέργειες φωτονίων στο εύρος των 100–100 keV. Για εφαρμογές διάχυσης, χρησιμοποιούνται μόνο ακτίνες X μικρού μήκους κύματος στο εύρος μερικών αγγστρομ έως 0.1 Å, που σημαίνει στο εύρος ενέργειας 1–120 keV. Επειδή το μήκος κύματος των ακτίνων X είναι συγκρίσιμο με το μέγεθος των ατόμων, είναι ιδανικά κατάλληλες για την εξερεύνηση της δομικής διάταξης των ατόμων και των μορίων σε μια ευρεία γκάμα υλικών. Οι ενεργητικές ακτίνες X μπορούν να διεισδύσουν βαθιά στα υλικά και να παρέχουν πληροφορίες για την εσωτερική δομή. (28)

Οι ακτίνες X αλληλεπιδρούν κυρίως με τα ηλεκτρόνια στα άτομα με τα οποία συγκρούονται, και μερικά φωτόνια από την επερχόμενη δέσμη αποκλίνουν από την αρχική. Εάν το μήκος κύματος αυτών των διαχυμένων ακτίνων X δεν αλλάζει, η διαδικασία ονομάζεται ελαστική διάχυση, όπου λαμβάνει χώρα μόνο μεταφορά ορμής. (εικονα 1.3) Αυτές οι διαχυμένες ακτίνες X μετρώνται για να αντληθούν πληροφορίες για το υλικό, καθώς φέρουν πληροφορίες για την κατανομή των ηλεκτρονίων στα υλικά. Διαχυμένα κύματα από διαφορετικά άτομα μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και η αποτελεσματική κατανομή έντασης είναι έντονα διαμορφωμένη από αυτήν την αλληλεπίδραση. Εάν τα άτομα είναι διατεταγμένα περιοδικά όπως στα κρύσταλλα, τα διαχυμένα κύματα θα αποτελούνται από αιχμηρά μέγιστα παρεμβολής με την ίδια συμμετρία όπως στην κατανομή των ατόμων. (28)

Η μέτρηση του προτύπου διάχυσης επιτρέπει επομένως να συμπεράνουμε την κατανομή των ατόμων σε ένα υλικό. Όταν ικανοποιούνται ορισμένες γεωμετρικές απαιτήσεις, οι ακτίνες X που διαχέονται από ένα κρυσταλλικό στερεό μπορούν να ενισχύσουν κατασκευαστικά, παράγοντας μια διαχυμένη δέσμη. Το 1912, ο W.L. Bragg έδωσε τη σχέση, η οποία διευκρινίζει τη συνθήκη για κατασκευαστική παρέμβαση. Η εξίσωση Bragg ορίζεται ως:

$$n\lambda = 2d \sin(\theta)$$

όπου  $n$  υποδηλώνει την τάξη διάχυσης,  $\lambda$  αντιπροσωπεύει το μήκος κύματος,  $d$  είναι η διαπλανητική απόσταση, και  $\theta$  σημαίνει τη γωνία διάχυσης. Η απόσταση μεταξύ παρόμοιων ατομικών επιπέδων σε ένα κρύσταλλο είναι γνωστή ως απόσταση  $d$  και μετριέται σε αγγστρομ. Η γωνία διάχυσης ονομάζεται γωνία  $\theta$  και μετράται σε μοίρες. Για πρακτικούς λόγους, το διφρακτόμετρο μετρά μια γωνία διπλάσια από τη γωνία  $\theta$ . (28)



Εικόνα 1.3. Δημιουργία Χ ακτινοβολίας <https://www.thermofisher.com/blog/materials/edx-analysis-with-sem-how-does-it-work/>

**Γάμμα ακτινοβολία:** Είναι γνωστό εδώ και καιρό ότι ορισμένα από τα ραδιενεργά στοιχεία εκπέμπουν μια διεισδυτική μορφή ακτίνων Χ, γνωστή ως ακτίνες γάμμα. Είναι σαφές ότι αυτές οι ακτινοβολίες, που προέρχονται από τον πυρήνα του ραδιενεργού ατόμου, αντιπροσωπεύουν κατά κάποιο τρόπο μερικούς από τους χαρακτηριστικούς τρόπους δόνησης της πυρηνικής δομής. Το μήκος κύματος και η κβαντική ενέργεια πολλών από τις ισχυρότερες γραμμές στο περίπλοκο φάσμα των ακτίνων γάμμα έχουν προσδιοριστεί με διάφορες μεθόδους, με συμφωνούντα αποτελέσματα. Έχει υπάρξει δυσκολία στον προσδιορισμό με βεβαιότητα της προέλευσης αυτής της ακτινοβολίας. (29)

Η γάμμα ακτινοβολία παράγεται κατά τη διάσπαση των ραδιενεργών ατομικών πυρήνων και κατά την αποσύνθεση ορισμένων υποατομικών σωματιδίων. Οι κοινά αποδεκτοί ορισμοί για τις περιοχές γάμμα ακτινοβολιών και Χ-ακτινοβολιών στο φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής

ακτινοβολίας περιλαμβάνουν κάποια επικάλυψη μήκους κύματος, με τις γάμμα ακτινοβολίες να έχουν μήκη κύματος γενικά μικρότερα από λίγα δέκατα του ανγκστρεμ ( $10^{-10}$  μέτρου) και τα φωτόνια γάμμα ακτινοβολίας να έχουν ενέργειες που υπερβαίνουν τις δεκάδες χιλιάδες ηλεκτρονιοβόλτ (eV). Δεν υπάρχει θεωρητικό ανώτερο όριο για τις ενέργειες των φωτονίων γάμμα ακτινοβολίας και δεν υπάρχει κατώτερο όριο για τα μήκη κύματος τους. Οι παρατηρούμενες ενέργειες εκτείνονται προς τα πάνω μέχρι και μερικά τρισεκατομμύρια ηλεκτρονιοβόλτ. Αυτά τα εξαιρετικά υψηλής ενέργειας φωτόνια παράγονται σε αστρονομικές πηγές μέσω μηχανισμών που δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί. (30)

Όταν ένας ασταθής ατομικός πυρήνας διασπάται σε έναν πιο σταθερό πυρήνα, ο νέος πυρήνας παράγεται μερικές φορές σε μια διεγερμένη κατάσταση. Η επακόλουθη χαλάρωση του θυγατρικού πυρήνα σε μια κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας οδηγεί στην εκπομπή ενός φωτονίου ακτίνας γάμμα. Η φασματοσκοπία ακτινοβολίας γάμμα περιλαμβάνει την ακριβή μέτρηση των ενεργειών των φωτονίων γάμμα που εκπέμπονται από διάφορους πυρήνες και μπορεί να καθορίσει τις δομές των επιπέδων ενέργειας των πυρήνων επιτρέποντας την ταυτοποίηση ιχνών ραδιενεργών στοιχείων μέσω των εκπομπών τους. Οι γάμμα ακτίνες παράγονται επίσης στη σημαντική διαδικασία της αντιύλης ζεύγους, όπου ένα ηλεκτρόνιο και ένα ποζιτρόνιο, εξαφανίζονται και δημιουργούνται δύο φωτόνια. Τα φωτόνια εκπέμπονται σε αντίθετες κατευθύνσεις και πρέπει το καθένα να φέρει 511 keV ενέργειας, την ενέργεια ηρεμίας του ηλεκτρονίου και του ποζιτρονίου. Οι γάμμα ακτίνες μπορούν επίσης να παραχθούν στη διάσπαση ορισμένων ασταθών υποατομικών σωματιδίων. (30)

Οι ιατρικές εφαρμογές των γάμμα ακτινοβολιών περιλαμβάνουν την τεχνική απεικόνισης της τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (PET) και τις αποτελεσματικές θεραπείες ακτινοβολίας για τη θεραπεία καρκινικών όγκων. Σε μια σάρωση PET, ένας ραδιοφάρμακο που εκπέμπει ποζιτρόνια με σύντομο χρόνο ζωής, επιλεγμένο λόγω της συμμετοχής του σε συγκεκριμένη φυσιολογική διαδικασία (π.χ. λειτουργία του εγκεφάλου), εγχέεται στο σώμα. Τα εκπεμπόμενα ποζιτρόνια συνδυάζονται γρήγορα με κοντινά ηλεκτρόνια και, μέσω της αντιδράσεως ανάλωσης ζεύγους, παράγουν δύο γάμμα ακτίνες των 511 keV που ταξιδεύουν σε αντίθετες κατευθύνσεις. Μετά την ανίχνευση των γάμμα ακτίνων, η ανασύνθεση των τοποθεσιών των εκπομπών γάμμα ακτίνων από έναν υπολογιστή παράγει μια εικόνα που τονίζει την τοποθεσία της βιολογικής διαδικασίας που εξετάζεται. (30)

**Ακτίνες Βήτα:** Η βήτα ακτινοβολία προέρχεται από τα λεγόμενα σχετικά ελαφριά σωματίδια, δηλαδή ηλεκτρόνια ή ποζιτρόνια, τα οποία είναι μικρότερα και πιο διεισδυτικά από τα άλφα σωματίδια και μπορούν να ταξιδέψουν μερικά μέτρα μέσα στον αέρα. Τυπικοί εκπομπείς βήτα

περιλαμβάνουν το στρόντιο 90, το τεχνητό 99, το καίσιο-137, τον άνθρακα-14, το θείο-35 και το τρίτιο. Η βήτα ακτινοβολία έχει μεγαλύτερη διεισδυτική ικανότητα από την άλφα ακτινοβολία, αλλά δεν μπορεί να διαπεράσει τα ρούχα μας. Ωστόσο, διαθέτει επαρκή ενέργεια για να διεισδύσει στο δέρμα μας, αλλά όχι αρκετή για να το διαπεράσει. Έτσι, σε αντίθεση με τα άλφα, τα βήτα σωματίδια μπορούν να διαπεράσουν ένα φύλλο χαρτιού, αλλά μπορούν εύκολα να σταματήσουν από ένα λεπτό φύλλο περσπεξ ή αλουμινίου. (31)

Ωστόσο, σε περιπτώσεις όπου η βήτα ακτινοβολία δεν συνοδεύεται από γάμμα ακτινοβολία, υλικά όπως ο χάλυβας και ο μόλυβδος δεν είναι κατάλληλα για ασπίδες προστασίας. Τα βήτα σωματίδια που χτυπούν τέτοια αδιάλυτα υλικά σταματούν τόσο απότομα που η ενέργειά τους μετατρέπεται σε γάμμα ακτινοβολία που μπορεί να περάσει απευθείας. Έτσι, αν και μπορεί να φαίνεται αντιφατικό, όταν πρόκειται για την αναχαίτιση της βήτα ακτινοβολίας, ένα λεπτό φύλλο περσπεξ είναι πιο κατάλληλο από αρκετά εκατοστά χάλυβα. (31)

**Ακτίνες Άλφα:** Προέρχονται από σωματίδια που θεωρούνται σχετικά βαριά, ειδικότερα από άτομα ηλίου χωρίς ηλεκτρόνια, τα οποία μπορούν να ταξιδέψουν μόνο μια μικρή απόσταση λίγων εκατοστών μέσα στον αέρα. Τυπικοί εκπομείς άλφα περιλαμβάνουν το ράδιο-226, το ραδόνιο-222, το ουράνιο-238, το πλουτώνιο-236, το θόριο-232 και το πολώνιο-210. Γενικά, η ακτινοβολία έχει την τάση να διαθέτει αρκετή διεισδυτική δύναμη και την ικανότητα να διαπερνά ανεμπόδιστα σχεδόν τα πάντα. Ωστόσο, αυτή η συγκεκριμένη ακτινοβολία μπορεί εύκολα να σταματηθεί από ένα φύλλο χαρτιού και σίγουρα δεν έχει την ενέργεια να διαπεράσει τα ρούχα ή το δέρμα μας. Παρόλα αυτά εξαιρετικά επικίνδυνες αν εισπνευστούν ή καταναλωθούν, καθώς μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή βλάβη στα κύτταρα. (31)

**Ραδόνιο:** Το ραδόνιο (Rn-222), ένα ραδιενεργό αέριο παραγόμενο από την αποδιέγερση του ραδίου-226, προκύπτει από τη φυσική διάσπαση του ουρανίου-238 και μπορεί να μετακινηθεί στον αέρα ή στο νερό. Οι ίνες του ραδονίου και οι ραδιενεργοί πυρήνες που παράγονται κατά την αποδιέγερσή του συμβάλλουν στην έκθεση του πληθυσμού σε ακτινοβολία, αυξάνοντας τον κίνδυνο για καρκίνο του πνεύμονα λόγω της εισπνοής των θυγατρικών προϊόντων. Εκτεταμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η επαγγελματική έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις ραδονίου αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο του πνεύμονα, ενώ και η έκθεση σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στον οικιακό χώρο μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο καρκινογένεσης. Οι συνέπειες αυτές ενισχύονται από την έλλειψη επαρκούς εξαερισμού στον χώρο διαμονής και την παρουσία ραδιενεργού υπεδάφους, υπογραμμίζοντας την ανάγκη για προσοχή στην έκθεση σε ραδόνιο. (32)

Στις τεχνητές πηγές ακτινοβολίας που επηρεάζουν τον άνθρωπο προστίθεται και η ραδιολογική μόλυνση από παλαιότερες πυρηνικές δοκιμές και ατυχήματα, όπως το Τσερνόμπιλ το 1986. Η έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να οδηγήσει σε άμεση ή μακροπρόθεσμη βλάβη στην υγεία. Ενώ οι υψηλότερες δόσεις μπορούν να προκαλέσουν άμεση βλάβη σε κύτταρα, όργανα και συστήματα, μπορεί ακόμη και να οδηγήσουν στο θάνατο, οι χαμηλότερες δόσεις έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου στο μέλλον. (33)

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία προκαλεί ιοντισμό, αφαιρώντας ηλεκτρόνια από τα άτομα και δημιουργώντας θετικά ή αρνητικά φορτισμένα ιόντα. Αυτή η διαδικασία καθιστά την ακτινοβολία καρκινογόνο, καθώς διασπά τους δεσμούς του DNA και προκαλεί γενετικές βλάβες. Η έρευνα σε ανθρώπινους πληθυσμούς έχει δείξει ότι η έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για λευχαιμία, καρκίνο του δέρματος και συμπαγείς όγκους σε ραδιολόγους και άλλους επαγγελματίες υγείας. Αν και τα προληπτικά μέτρα έχουν ενισχυθεί, εξακολουθεί να είναι ασαφές αν υπάρχει υπολειμματικός κίνδυνος για την εμφάνιση καρκίνου. (34)

### **1.9.2. Μη ιοντίζουσα ακτινοβολία:**

**Υπεριώδεις ακτίνες (UV):** Η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, ειδικά στα υπεριώδη φάσματα της (UVA: 320-400nm και UVB: 280-320nm), αποτελεί την κύρια και επιστημονικά τεκμηριωμένη αιτία για την εμφάνιση καρκίνου του δέρματος. Στις λευκές φυλές, οι κάτοικοι των περιοχών με υψηλό γεωγραφικό πλάτος που έχουν λιγότερες ώρες ηλιοφάνειας φαίνεται να προστατεύονται από τον καρκίνο του δέρματος. Ωστόσο, όσοι μετακομίζουν σε νεαρή ηλικία από περιοχές υψηλού πλάτους σε χαμηλότερα γεωγραφικά πλάτη, αυξάνοντας έτσι την έκθεσή τους στον ήλιο, διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του δέρματος. (35)

Σύμφωνα με περιγραφικές επιδημιολογικές μελέτες, η περιοχή της κεφαλής είναι πιο ευάλωτη στο δερματικό καρκίνο σε σύγκριση με άλλα μέρη του σώματος. Ειδικότερα, το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα είναι πιο συχνό στο πρόσωπο κατά 120-130 φορές, το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα κατά 40-50 φορές και το μελάνωμα μόνο κατά 3-6 φορές περισσότερο, σε σχέση με τους αντίστοιχους δείκτες επίπτωσης ανά μονάδα επιφανείας σώματος των μη εκτεθειμένων σε ηλιακή ακτινοβολία περιοχών του σώματος, σε άνδρες και γυναίκες. (36)

Η ακριβής μέτρηση της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία πριν από την εμφάνιση καρκίνου του δέρματος μέσω αναλυτικών επιδημιολογικών μεθόδων είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Ωστόσο, φαίνεται ότι ο κίνδυνος για ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα αυξάνεται όσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία. (37)

Η θεωρία της διαλείπουσας έκθεσης στην υπεριώδη ακτινοβολία υποστηρίζει ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης βασικοκυτταρικού καρκινώματος επηρεάζεται περισσότερο από το μοτίβο έκθεσης παρά από τη συνολική ποσότητα της ακτινοβολίας. Η σχέση μεταξύ της ηλιακής έκθεσης και του μελανώματος βασίζεται στο γεγονός ότι η νόσος εμφανίζεται συχνότερα σε περιοχές του σώματος που εκτίθενται περισσότερο στον ήλιο. (38)

**Ηλεκτρομαγνητικά πεδία χαμηλών συχνοτήτων (ELF-EMFs):** Γενικά, η περιοχή των εξαιρετικά χαμηλών συχνοτήτων (ELF) του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος ορίζεται από συχνότητες από 3 έως 3000 Hz. (39) Αυτά τα πεδία παράγονται από ηλεκτρικές συσκευές, υψηλής τάσης δικτύων ηλεκτρικής διανομής, από οικιακές και επαγγελματικές πηγές και από γραμμές ισχύος. Τα πεδία 60 Hz (στις ΗΠΑ) και 50 Hz (εναλλασσόμενο ρεύμα στην Ευρώπη και σε μεγάλο μέρος του κόσμου) επηρεάζουν όλα τα συστήματα που χαρακτηρίζονται από φορτισμένα σωματίδια, όπως το ανθρώπινο σώμα. Μικρά ηλεκτρικά ρεύματα υπάρχουν στο ανθρώπινο σώμα λόγω των χημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν ως μέρος των κανονικών λειτουργιών του σώματος, ακόμη και στην απουσία εξωτερικών ηλεκτρικών πεδίων.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν οδηγήσει σε αντιφατικά αποτελέσματα όσον αφορά την πιθανή σύνδεση μεταξύ της έκθεσης σε EMF και την αυξημένη εμφάνιση παιδικής λευχαιμίας, εγκεφαλικών όγκων ή νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. (40) Οι βλαβερές επιδράσεις της έκθεσης στα EMF στους ιστούς ζωντανών οργανισμών εξαρτώνται κυρίως από τη συχνότητα, την πυκνότητα του πεδίου και τον χρόνο έκθεσης. (41) Σημαντικοί παράγοντες κινδύνου είναι επίσης η λειτουργική κατάσταση και η ευαισθησία του εκτεθειμένου οργανισμού, η αγγείωση των ακτινοβολημένων μερών και η απόσταση από την πηγή ακτινοβολίας.

Διάφοροι τύποι μαγνητικών και ηλεκτρομαγνητικών πεδίων χρησιμοποιούνται τώρα αποτελεσματικά στην ιατρική, όπως στη διαγνωστική (π.χ. απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού-MRI, σάρωση και απεικόνιση με μικροκύματα) ή τη θεραπεία (π.χ. ηλεκτρομαγνητική θεραπεία). Η ηλεκτρομαγνητική θεραπεία έχει την υπόσχεση να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες παθήσεις, καθώς η μαγνητοθεραπεία παρέχει έναν εύκολο και μη επεμβατικό τρόπο για να αντιμετωπίσει το σημείο του τραυματισμού. (42)

Πίνακας 1.2. Ακτινοβολίες και Επίδραση τους στα Κύτταρα

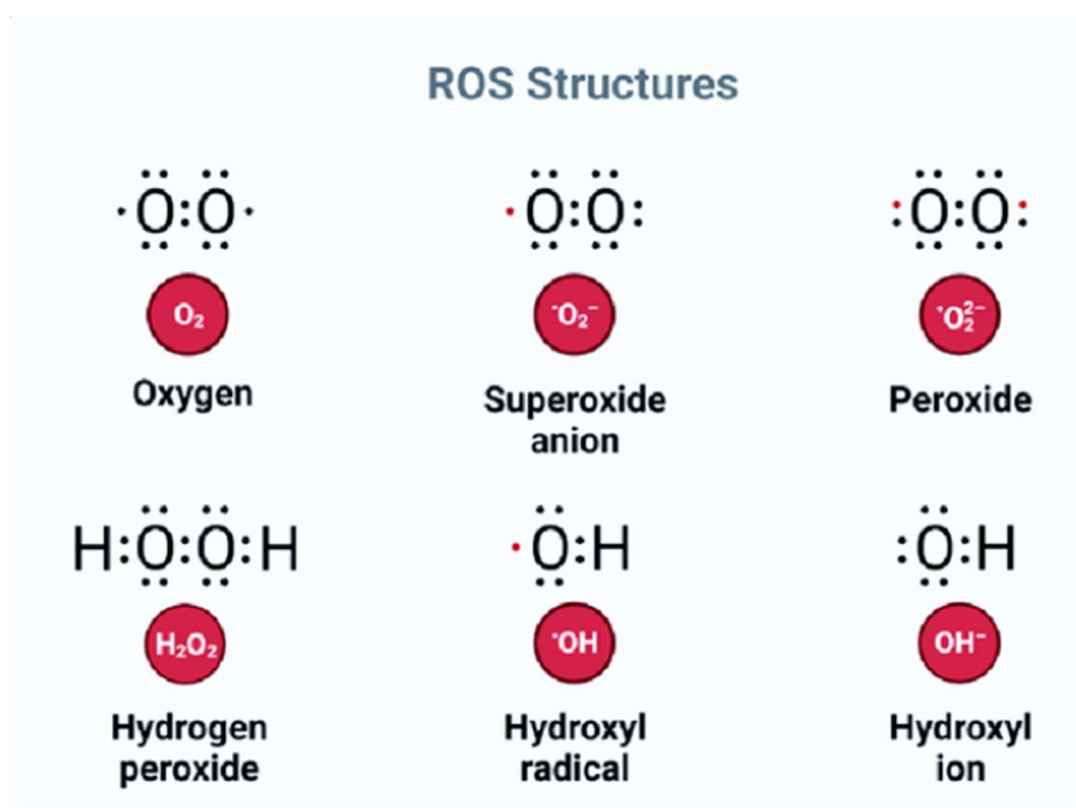
Ακτινοβολία	Πώς επηρεάζει τα κύτταρα
Ιοντίζουσες Ακτινοβολίες	Προκαλούν ιοντισμό, διασπώντας τους δεσμούς του DNA και προκαλώντας γενετικές βλάβες.
Ακτινοβολία Χ	Διεισδύουν βαθιά στα υλικά και αλληλεπιδρούν κυρίως με τα ηλεκτρόνια στα άτομα, προκαλώντας άμεση ή έμμεση δράση στο DNA μέσω της δημιουργίας ελεύθερων ριζών.
Γάμμα ακτινοβολία	Παράγονται από τη διάσπαση των ραδιενεργών ατομικών πυρήνων και μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες στο DNA και τους ιστούς.
Ακτίνες Βήτα	Είναι μικρότερα και πιο διεισδυτικά από τα άλφα σωματίδια, προκαλούν ζημιές στο DNA και μπορούν να διεισδύσουν στο δέρμα, αλλά όχι πέρα από αυτό.
Ακτίνες Άλφα	Ταξιδεύουν μόνο λίγα εκατοστά στον αέρα, είναι επικίνδυνες αν εισπνευστούν ή καταναλωθούν.
Ραδόνιο	Αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο του πνεύμονα λόγω της εισπνοής των θυγατρικών προϊόντων του.
Υπεριώδεις ακτίνες (UV)	Η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία UVA και UVB είναι η κύρια αιτία καρκίνου του δέρματος.
Ηλεκτρομαγνητικά πεδία χαμηλών συχνοτήτων (ELF-EMFs)	Παράγουν ηλεκτρικά ρεύματα στο ανθρώπινο σώμα που μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένο κίνδυνο παιδικής λευχαιμίας και άλλων ασθενειών.

## 2. Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται κατά την έκθεση σε ακτινοβολίες

Κατά την έκθεση του οργανισμού σε ακτινοβολίες ενεργοποιούνται διάφοροι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί που έχουν ως σκοπό την επιδιόρθωση βλαβών που προκαλούνται από αυτές. Κάποιοι από τους επιδιορθωτικούς αυτούς μηχανισμούς αναλύονται παρακάτω:

### 2.1. Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών ενζύμων και των αντιοξειδωτικών μεταρρυθμιστών στην αντιμετώπιση της ζημίας που προκαλεί η ιοντίζουσα ακτινοβολία στα κύτταρα.

*Παραγωγή ROS από την ιοντίζουσα ακτινοβολία:* Η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), όπως το μονήρες οξυγόνο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και τη ρίζα υδροξυλίου, (εικόνα 3.7) τα οποία μπορούν να προκαλέσουν ζημία στα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μεμβρανών και των οργανιδίων, καθώς και στις πρωτεΐνες, τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης και τα νουκλεϊκά οξέα, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο ή την απόπτωση. (43)



Εικόνα 2. 4. Δραστικές μορφές οξυγόνου. [https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-reactive-oxygen-species-and-their-sources-ROS-reactive-oxygen-species\\_fig1\\_370358957](https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-reactive-oxygen-species-and-their-sources-ROS-reactive-oxygen-species_fig1_370358957)

*Συστήματα αντιοξειδωτικών ενζύμων:* Τα κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα που παρουσιάζονται στα κύτταρα περιλαμβάνουν την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), την καταλάση (CAT), την ασκορβική περοξειδάση (APX) και τη γλουταθειοονική περοξειδάση (GPX). Αυτά τα ένζυμα έχουν τη δυνατότητα να αντιμετωπίσουν τα ROS και να προστατεύσουν τα κύτταρα από τη ζημία που προκαλεί η ιονίζουσα ακτινοβολία. Η εκθεση στη LDIR μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στις δραστηριότητες αυτών των ενζύμων, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κυττάρων και την αποτελεσματικότητα της αντιμετώπισης των ROS. (43)

Συνολικά, η ανάπτυξη ενός εκτεταμένου συστήματος αντιοξειδωτικών ενζύμων από τα κύτταρα αποτελεί μια σημαντική στρατηγική για την αντιμετώπιση της ζημίας που προκαλεί η ιονίζουσα ακτινοβολία.

## **2.2. Η διαδικασία επιδιόρθωσης βλάβης του DNA που προκαλείται από ακτινοβολίες**

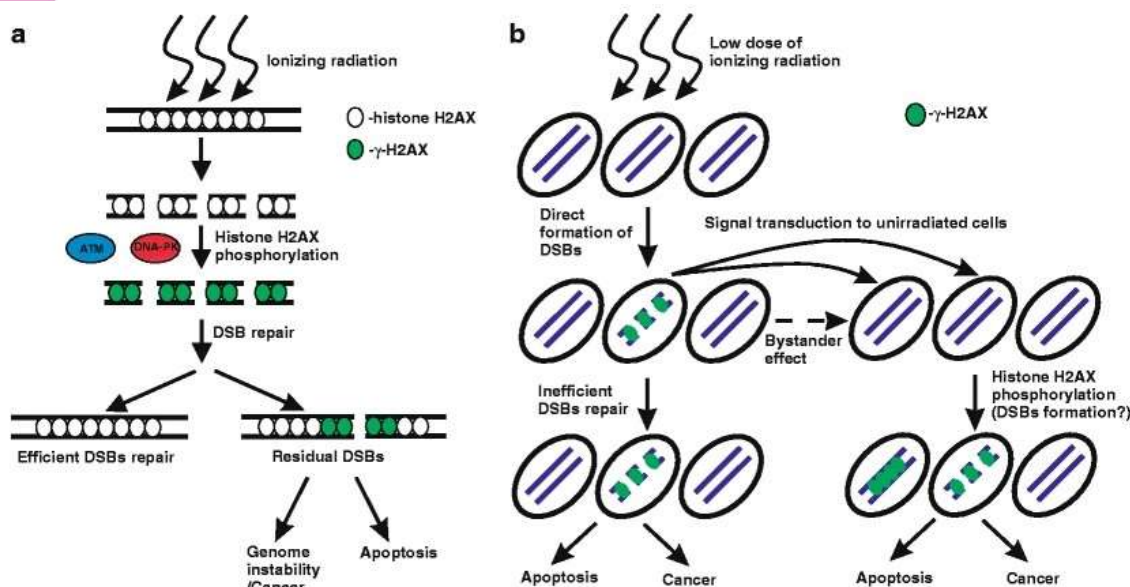
Όταν το DNA υποστεί βλάβη λόγω ιοντίζουσας ακτινοβολίας, οι κύτταρα ενεργοποιούν διάφορες διαδικασίες επιδιόρθωσης για να αναπληρώσουν τη ζημία και να διατηρήσουν την ακεραιότητα του γενετικού υλικού τους. Αυτές οι διαδικασίες περιλαμβάνουν την επισκευή εγκάρσιων δίκλωνων (DSBs), την επιδιόρθωση με ενδογενείς μονόκλωνους (SSBs) και τις αντιδράσεις SOS. (43)

Η επιδιόρθωση των βλαβών του DNA περιλαμβάνει διάφορες διαδικασίες, όπως η επιδιόρθωση με βάση την αφαίρεση (BER), η επιδιόρθωση με επανασύνδεση (recombinant repair) και οι αντιδράσεις SOS. Κάθε διαδικασία επιδιόρθωσης εστιάζει σε διαφορετικούς τύπους βλαβών και χρησιμοποιεί διαφορετικούς μηχανισμούς για να αντιμετωπίσει τα προβλήματα. Η σοβαρή βλάβη του DNA μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο μέσω της διαδικασίας της απόπτωσης (apoptosis). Ωστόσο, αν η βλάβη είναι επιτυχώς επιδιορθωμένη, τα κύτταρα μπορούν να επιβιώσουν και να συνεχίσουν τη φυσιολογική τους λειτουργία. Αντίθετα, η σοβαρή βλάβη που δεν επιδιορθώνεται μπορεί να οδηγήσει στην καρκινογένεση, καθώς οι ακατάλληλες επιδιορθωμένες μεταλλάξεις μπορούν να επιτρέψουν την ανάπτυξη ανωμαλιών στο γενετικό υλικό. (43)

### **2.2.1. Απελευθέρωση της γH2AX από κύτταρα ακτινοβολημένα με ιονίζουσα ακτινοβολία (IR).**

Η H2AX είναι μια παραλλαγή της ιστόνης H2A στα θηλαστικά κύτταρα. Η εμφάνιση της φωσφορυλιωμένης μορφής αυτής της ιστόνης, που ονομάζεται γH2AX, είναι ένα από τα πρώτα γεγονότα που εμπλέκονται στην αντίδραση στη βλάβη του DNA (DDR) σε διάφορες γονοτοξικές καταπονήσεις που προκαλούν διπλές θραύσεις του DNA (DSBs). (εικόνα 3.8) Τα μέλη της οικογένειας φωσφοτιδυλοϊνοσιτόλης 3-κινάσης (PI3), ATM και DNA-PK, ενεργοποιούνται ως απάντηση στην επαγωγή DSBs από ιονίζουσα ακτινοβολία (IR) και φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου και στην επιδιόρθωση του DNA. Η H2AX φωσφορυλιώνεται από αυτές τις κινάσες στη σερίνη 139 μέσα σε λίγα λεπτά μετά την IR. Η φωσφορυλιωμένη μορφή αυτής της ιστόνης εξαπλώνεται και προς τις δύο κατευθύνσεις από τη θέση της DSB και καταλαμβάνει περιοχές χρωματίνης με μέγεθος μεγαβάσης. (44)

Οι DSBs που προκαλούνται κατά τη διάρκεια της φάσης S μετά τη δράση παραγόντων που αναστέλλουν την αντιγραφή, όπως η UV ακτινοβολία, η υδροξυουρία ή τα δηλητήρια τοποϊσομεράσης, απαιτούν την ενεργοποίηση της κινάσης ATR για τη φωσφορυλίωση της H2AX στις θέσεις των σταματημένων πιρούνων αντιγραφής. Χημικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που δεν προκαλούν DSBs μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε φωσφορυλίωση της H2AX. Για παράδειγμα, η θεραπεία των κυττάρων με τον ισχυρό χημικό καρκινογόνο παράγοντα βενζο[α]πυρένιο οδηγεί στο σχηματισμό ομοιοπολικών προσθηκών DNA που προκαλούν φωσφορυλίωση της H2AX με εξάρτηση από τις ATM, ATR και DNA-PK. Η φωσφορυλίωση της H2AX μπορεί να προκληθεί στο DNA απουσία DSBs με υπερθερμία. Οι εστίες γH2AX που προκαλούνται από θερμότητα εξαρτώνται από τις ATM ή DNA-PK και παρατηρούνται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, αλλά οι ακριβείς μηχανισμοί που εμπλέκονται στον σχηματισμό των εστιών είναι άγνωστοι. (44)



Εικόνα2. 5. Απελευθέρωση της γH2AX από κύτταρα ακτινοβολημένα με ιονίζουσα ακτινοβολία (IR). *a.* Επίδραση σχετικά υψηλών δόσεων IR (άνω των 10 mGy) *b.* Επίδραση χαμηλών δόσεων IR (κάτω των 10 mGy). (44)

Βάσει της εικόνας: *a.* Επίδραση σχετικά υψηλών δόσεων IR (άνω των 10 mGy):

Μετά τη δράση της IR, η ιστόνη H2AX φωσφορυλιώνεται γρήγορα από την κινάση ATM ή, απουσία της ATM, από την DNA-PK στα σημεία των διπλών θραύσεων του DNA (DSBs). Η γH2AX λειτουργεί ως σημείο προσκόλλησης για την πρόσληψη ενζύμων επιδιόρθωσης του DNA. Το επίπεδο της γH2AX φτάνει το μέγιστο σε 30–60 λεπτά μετά την IR και στη συνέχεια η γH2AX μειώνεται σταδιακά από τη χρωματίνη. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την IR, μπορεί ακόμα να παρατηρηθεί ένας μικρός πληθυσμός κυττάρων που περιέχουν εστίες γH2AX. Αυτές οι εστίες πιθανώς αντιπροσωπεύουν μη επιδιορθώσιμες DSBs "σύνθετης δομής". Οι επίμονες DSBs οδηγούν σε απόπτωση ή αυξάνουν τον κίνδυνο καρκίνου στους ακτινοβολημένους ιστούς. (44)

*b.* Επίδραση χαμηλών δόσεων IR (κάτω των 10 mGy):

Η απόκριση στη βλάβη του DNA (DDR) δεν ενεργοποιείται πλήρως μετά από χαμηλή δόση IR και η επιδιόρθωση των DSBs είναι ανεπαρκής. Η γH2AX επάγεται σε μη ακτινοβολημένα γειτονικά κύτταρα λόγω της μεταβίβασης σήματος από τα άμεσα ακτινοβολημένα κύτταρα (φαινόμενο bystander). Η φύση της σηματοδότησης δεν είναι κατανοητή και δεν έχει αποδειχθεί ακόμα αν οι εστίες γH2AX στα κύτταρα bystander αντιπροσωπεύουν φυσικές DSBs. (44)

Πίνακας 2.3. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην απελευθέρωση της γH2AX από κύτταρα ακτινοβολημένα με ιοντίζουσα ακτινοβολία (IR)

Πρωτεΐνη/Γονίδιο	Δράση
γH2AX	Επισημαίνει περιοχές του DNA που έχουν υποστεί διπλές θραύσεις.
ATM	Ανιχνεύει διπλές θραύσεις στο DNA και ξεκινά την απόκριση επιδιόρθωσης.
MDC1	Διαμεσολαβεί στη συσσώρευση άλλων πρωτεϊνών επιδιόρθωσης στο σημείο της βλάβης.
53BP1	Συμμετέχει στη διπλή θραύση του DNA και στην απόκριση επιδιόρθωσης.
BRCA1	Ρυθμίζει τον ομόλογο ανασυνδυασμό και την επιδιόρθωση των διπλών θραύσεων.
Rad50/ NBS1/ MRE11	Μέλος του συμπλέγματος MRN που ανιχνεύει και επεξεργάζεται διπλές θραύσεις.
RNF8	Συμβάλλει στην επισημοποίηση του σημείου της βλάβης και την προσέλκυση επιδιορθωτικών πρωτεϊνών.
RNF168	Συνεργάζεται με το RNF8.

### 2.2.2. Επέκταση θηλιάς ως μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA

Τα διπλά σπασίματα του DNA (DSBs) προκαλούν τη δημιουργία κέντρων αποκατάστασης του DNA (DDR), τα οποία είναι ορατά με το μικροσκόπιο και χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες τροποποιήσεις της χρωματίνης, όπως η παρουσία της γH2AX, η συσσώρευση ουβικουϊνών και η συγκέντρωση ιστονών H1. Επιπλέον, παράγονται συγκεκριμένοι παράγοντες DDR, όπως οι 53BP1 και MDC1. Προηγούμενα στοιχεία δείχνουν ότι η αρχιτεκτονική των χρωμοσωμάτων μπορεί να ελέγχει τη διάδοση της γH2AX. Συγκεκριμένα, οι περιοχές όπου σταματά η γH2AX έχουν παρατηρηθεί σε ορισμένες περιπτώσεις να συμπίπτουν με τα όρια των Topologically Associating Domains (TADs), δηλαδή τοπικών δομών αναστολής. Επιπλέον, η ανάλυση μικροσκοπίας φωτός έδειξε ότι η πρωτεΐνη CTCF, η οποία δεσμεύεται στα όρια των TADs και περιορίζει τη δραστηριότητα εξαγωγής βρόχων του συμπλέγματος κοεΐνης (cohesin) που διαμορφώνει αυτές τις δομές σε μη-κατεστραμμένα κύτταρα, βρίσκεται δίπλα σε κέντρα γH2AX και η 53BP1 μπορεί να δημιουργήσει νανοδομές που συχνά επικαλύπτονται με ένα TAD, όπως φαίνεται από την τεχνική DNA-FISH. Η χαρτογράφηση υψηλής ανάλυσης ChIP-seq που πραγματοποιήθηκε μετά την πρόκληση πολλαπλών DSBs σε συγκεκριμένες θέσεις

(χρησιμοποιώντας ανθρώπινα κύτταρα D1vA) (45) αποκάλυψε ότι η διάδοση αυτών των συστατικών DDR στη χρωματίνη κοντά στη θραύση ακολουθεί ένα συγκεκριμένο μοτίβο. Υποθετικά, αυτά τα μοτίβα μπορούν να ελέγχονται από την προϋπάρχουσα δομή της χρωματίνης που υπήρχε πριν από την ενεργοποίηση των DSBs. Με απλά λόγια, τα δεδομένα δείχνουν ότι η διάδοση της γH2AX και άλλων συστατικών της DDR μπορεί να επηρεάζεται από τη δομή της χρωματίνης που υπάρχει πριν από τη βλάβη, και οι περιοχές που αναστέλλουν τη διάδοση της γH2AX συχνά συμπίπτουν με τα TADs. (46)

Για να κατανοηθεί η σχέση μεταξύ της διάδοσης των συστατικών των κέντρων αποκατάστασης διπλής αλυσίδας (DDR) και της χρωματικής διάταξης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα υψηλής ανάλυσης 4C-seq σε μη κατεστραμμένα ανθρώπινα κύτταρα D1vA. Σε αυτά τα πειράματα εξετάστηκαν τρεις γονιδιωματικές περιοχές που καταστρέφονται στα κύτταρα D1vA μετά την ενεργοποίηση του ενζύμου περιορισμού AsiSI, καθώς και μια αντίστοιχη μη κατεστραμμένη περιοχή ελέγχου. Η χρωματική διάταξη γύρω από τις τρεις περιοχές σε μη κατεστραμμένη κατάσταση ήταν εξαιρετικά παρόμοια με την κατανομή της γH2AX που παρατηρήθηκε μετά την πρόκληση των διπλών σπασμάτων του DNA (DSBs). Αυτό δείχνει ότι η αρχική αρχιτεκτονική της χρωματίνης πριν από τη βλάβη καθορίζει τη διάδοση της γH2AX και τη σύνδεση των παραγόντων MDC1, ουβικουίνης και 53BP1 μετά την εμφάνιση των DSBs. Για να αποδειχθεί ότι οι περιοχές DDR δεν εξαπλώνονται σε γειτονικά πεδία, μελετήθηκε ένα DSB στο χρωμόσωμα 1, όπου η διάδοση των συστατικών των κέντρων DDR ήταν βαθιά ασύμμετρη. Πειράματα 4C-seq πραγματοποιήθηκαν σε δύο απόψεις που χωρίζονται κατά 470 kb και απέδειξαν την ύπαρξη δύο διπλανών αυτο-αλληλεπιδρώντων περιοχών με ένα όριο που αντιστοιχεί στην ξαφνική μείωση της γH2AX. Οι προϋπάρχουσες χρωματικές περιοχές, οι οποίες είχαν δημιουργηθεί πριν από οποιαδήποτε βλάβη, περιορίζουν τη διάδοση των κέντρων DDR. Αυτό σημαίνει ότι η αρχιτεκτονική της χρωματίνης παίζει σημαντικό ρόλο στον περιορισμό και τη διάδοση των σημάτων αποκατάστασης του DNA μετά από βλάβες. Η μελέτη υποδεικνύει ότι η δομή της χρωματίνης και τα τοπολογικά σχετιζόμενα πεδία (TADs) που υπήρχαν πριν από την πρόκληση των DSBs μπορούν να επηρεάσουν τη διάδοση των σημάτων αποκατάστασης όπως η γH2AX και οι παράγοντες MDC1, ουβικουίνης και 53BP1. Η αρχική αρχιτεκτονική της χρωματίνης φαίνεται να καθορίζει τον τρόπο με τον οποίο τα κέντρα αποκατάστασης του DNA σχηματίζονται και περιορίζονται στις περιοχές βλάβης. (47)

Για να κατανοηθεί αν τα Topologically Associating Domains (TADs) καθορίζουν τη διάδοση του γH2AX, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα CRISPR/Cas9 για να δημιουργηθεί ένα μόνο διπλό σπάσιμο του DNA (DSB) σε συγκεκριμένες θέσεις εντός του ίδιου TAD. Στη συνέχεια,

ερευνήθηκε τόσο η χρωματική διάταξη όσο και η κατανομή του γH2AX. Η ενεργοποίηση του Cas9 για τη δημιουργία DSB αναπαρήγαγε τη διάδοση του γH2AX που παρατηρήθηκε όταν το DSB προκλήθηκε στην ίδια γενομική θέση με τη χρήση του AsiSI. Αυτό επιβεβαιώνει ότι η διάδοση του γH2AX είναι ανεξάρτητη από τη μέθοδο με την οποία δημιουργήθηκε το DSB. Όταν το DSB μετακινήθηκε σε διαφορετική θέση εντός του ίδιου TAD, προκάλεσε μια αλλαγή στο προφίλ του γH2AX που ήταν εμφανώς παρόμοιο με το πρότυπο 3D αλληλεπίδρασης αυτής της γενομικής περιοχής. Ωστόσο, η διάδοση του γH2AX παρέμεινε περιορισμένη μέσα στο ίδιο TAD. (45)

Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι μηχανισμοί που ελέγχουν τη χωρική οργάνωση των χρωμοσωμάτων σε αυτο-αλληλεπιδρώντα πεδία (TADs) διευκολύνουν και διαχωρίζουν τη δημιουργία των περιοχών γH2AX. Αυτό σημαίνει ότι η διάδοση του γH2AX και η δημιουργία κέντρων αποκατάστασης του DNA (DDR) επηρεάζονται από την προϋπάρχουσα χωρική οργάνωση της χρωματίνης. Δεδομένου ότι το γH2AX είναι το αρχικό σημείο εκκίνησης για περαιτέρω σήματα που οδηγούν στη σταθερή συγκέντρωση των κέντρων DDR, η οργάνωση του γονιδιώματος μέσα στα TAD είναι κρίσιμη για την αντίδραση στη βλάβη του DNA. Η διασφάλιση ότι το γH2AX παραμένει εντός των ορίων των TADs υποδηλώνει ότι τα TADs λειτουργούν ως δομικά και λειτουργικά όρια για την αντίδραση στη βλάβη του DNA. Φαίνεται ότι τα TADs είναι σημαντικά στη ρύθμιση της διάδοσης του γH2AX και των σημάτων αποκατάστασης του DNA μετά από DSBs. Οι TADs φαίνεται να παρέχουν ένα οργανωτικό πλαίσιο που περιορίζει και κατευθύνει τη δημιουργία των κέντρων DDR, καθιστώντας την οργάνωση της χρωματίνης έναν κρίσιμο παράγοντα για την αποκατάσταση του DNA. (46)

Η οργάνωση του γονιδιώματος σε τοπολογικά σχετιζόμενους τομείς (TADs) καθοδηγείται από τη δραστηριότητα του συμπλόκου cohesin, ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου με μορφή δακτυλίου. Το σύμπλοκο cohesin αρχικά αναγνωρίστηκε για τον σημαντικό του ρόλο στη σύζευξη των αδελφών χρωματιδίων κατά την κυτταρική διαίρεση. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι το cohesin παίζει επίσης ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος, καθώς συσσωρεύεται στις περιοχές που υπάρχει βλάβη στο DNA (DSBs). Η συσσώρευση αυτή μπορεί να είναι συμβατή με τη σύζευξη των αδελφών χρωματιδίων κατά τη διάρκεια του Ομόλογου Ανασυνδυασμού (HR) στη φάση S/G2 του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, η αυξημένη παρουσία του cohesin σε DSBs έχει παρατηρηθεί καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, κάτι που δείχνει ότι ο ρόλος του cohesin δεν περιορίζεται μόνο στον HR. (48)

Με δημιουργία προφίλ χαρτογράφησης ChIP-seq για την υπομονάδα SCC1 του cohesin τόσο σε μη κατεστραμμένες όσο και σε κατεστραμμένες συνθήκες, παρατηρήθηκε έντονη παρουσία του cohesin στα σημεία βλάβης που εκτείνονται σε 2-5kb γύρω από το DSB, δημιουργώντας κορυφές στα σημεία αυτά σχεδόν τόσο υψηλές όσο οι προϋπάρχουσες κορυφές cohesin στα σημεία δεσμεύσεως του CTCF. Η δημιουργία και η διατήρηση των TADs από το cohesin γίνεται με χρήση ενέργειας από ATP, το οποίο χρησιμοποιείται για την εκχύλιση και διεύρυνση των βρόγχων του DNA. Οι βρόγχοι τελικά σταματούν στα στοιχεία συνόρων, μεγάλο ποσοστό των οποίων είναι δεμένα από το CTCF. Η αυξημένη παρουσία του cohesin γύρω από τα DSBs υποδηλώνει ότι μπορεί να υπάρχει τοπικά αυξημένη εκχύλιση βρόγχων στον τόπο της βλάβης. Το σύμπλοκο cohesin διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της δομής και της ακεραιότητας του γονιδιώματος. Συσσωρεύεται στις τοποθεσίες βλάβης του DNA και μπορεί να συμβάλλει στη δημιουργία και διατήρηση των TADs μέσω της εκχύλισης και διεύρυνσης των βρόγχων του DNA. Η παρουσία του cohesin στα σημεία αυτά υποδηλώνει ότι οι βλάβες του DNA μπορεί να προκαλούν τοπική αύξηση της δραστηριότητας εκχύλισης βρόγχων, συμβάλλοντας έτσι στην απομόνωση και την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA εντός των TADs. (49)

Με την ανάλυση της τρισδιάστατης οργάνωσης του γονιδιώματος μέσω της τεχνικής Hi-C, πριν και μετά την πρόκληση διπλών σπασιμάτων του DNA (DSBs) στα κύτταρα D1A, οι ερευνητές εστίασαν στις συχνότητες αλληλεπίδρασης cis γύρω από τα DSBs. Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε ένα μοναδικό πρότυπο με "ρίγες" που εμφανίζονται στις δύο πλευρές των DSBs μετά την πρόκλησή τους. Αυτές οι "ρίγες" ή "γραμμές" προέκυψαν από την εκχύλιση βρόγχων που αναστέλλεται στις τοποθεσίες που δεσμεύονται από το CTCF. Οι μέσες τιμές επαφών Hi-C γύρω από τα σύνορα των TADs αποκάλυψαν παρόμοιες "ρίγες", όπως αναμενόταν, αλλά αυτές ήταν ανεξάρτητες της πρόκλησης των DSBs. Εκτελέστηκε ανάλυση οργανωμένου ολοκληρωμένου γραφήματος (APA) για να αξιολογηθεί η εναλλαγή μεταξύ των DSBs και των γειτονικών συνδέσεων. Η παρουσία των "ριγών" γύρω από τα DSBs υποδηλώνει ότι τα DSBs μπορούν να αναστείλουν την εκχύλιση των βρόγχων. Αυτή η αναστολή είναι λιγότερο έντονη σε σχέση με τις κλασικές συνδέσεις βρόγχων που δεσμεύονται από το CTCF. Αυτό δείχνει ότι τα DSBs μπορούν να επηρεάσουν την τρισδιάστατη οργάνωση του γονιδιώματος, ειδικά γύρω από τις περιοχές βλάβης. Η παρουσία "ριγών" υποδηλώνει ότι η εκχύλιση βρόγχων αναστέλλεται στα σημεία αυτά, επιτρέποντας την τοπική συγκέντρωση των παραγόντων επιδιόρθωσης του DNA. Αυτές οι αλλαγές στην οργάνωση του γονιδιώματος μπορεί να είναι κρίσιμες για την αποτελεσματική αποκατάσταση των βλαβών του DNA. (49)

Οι SMC1 και SMC3 υπομονάδες του cohesin έχει αναφερθεί ότι φωσφορυλώνονται από το ATM μετά από την παραγωγή των DSB και αυτές οι τροποποιήσεις είναι απαραίτητες για την ενίσχυση του cohesin στο γονιδίωμα μετά την ακτινοβολία. (78) Αναλύσεις ChIP-chip έδειξαν ότι το φωσφορυλωμένο SMC1 (pSMC1 S966) και SMC3 (pSMC3 S1083) συσσωρεύονται σε ολόκληρα τα TAD γύρω από τα DSBs. Η ChIP-seq εναντίον του pSMC3 S1083 επιβεβαίωσε επιπλέον ότι το φωσφορυλωμένο SMC3 αυξήθηκε σε σημεία σύνδεσης του cohesin και στους βρόγχους εντός των κατεστραμμένων TADs. Αυτές οι DSB-ενδεικνυόμενες, ATM-μεσολαβούμενες τροποποιήσεις του cohesin που συσσωρεύονται γύρω από τα DSBs μπορεί να ρυθμίζουν τις ιδιότητες του cohesin, όπως η ταχύτητα εκχύλισης βρόγχων ή η εκφόρτωση του χρωματίνης, η οποία θα μπορούσε να μεταφραστεί σε αυξημένο χρόνο παραμονής του cohesin στα στοιχεία συνόρων και να συμβάλει περαιτέρω στην απομόνωση των πεδίων DDR από τη γειτονική χρωματίνη. (49)

Συνοψίζοντας, υπάρχουν δεδομένα ότι τα TADs είναι το πρότυπο για τη διάδοση πολλών σημάτων επισκευής DSB όπως η φωσφορυλίωση του H2AX, η εκδίωξη της ιστόνης H1 και η συσσώρευση του 53BP1, του MDC1 και της ουβικιτίνης, επιτρέποντας μια σήμανση DSB σε κλίμακα μεγαβάσεων. Τα δεδομένα υποδηλώνουν ένα μοντέλο έγχυσης βρόγχων μεσολαβούμενη από cohesin που εστιάζεται στο DSB και θα μπορούσε να μεσολαβήσει τη φωσφορυλίωση H2AX. Σε αυτό το μοντέλο, το cohesin συσσωρεύεται γρήγορα και στις δύο πλευρές ενός DSB με έναν τρόπο που ενισχύεται από το ATM, το NIPBL και το σύμπλοκο MRN. Στο DSB πραγματοποιείται απομάκρυνση ενός πλευρικού ενιαίου έκχυσης, το οποίο από τη σειρά του επιτρέπει στον τοπικά προσληφθέντα ATM να φωσφορυλίώσει τα νουκλεοσώματα που περιέχουν H2AX καθώς η χρωματίνη τραβιέται από το δαχτυλίδι του cohesin. Δεδομένου ότι οι τρέχουσες εκτιμήσεις της εκχύσης βρόγχων μεσολαβούμενης από το cohesin υποδηλώνουν ένα ρυθμό από 0,5 έως 2 kb ανά δευτερόλεπτο *in vitro*, ένας τέτοιος μηχανισμός θα επέτρεπε τη συναρμολόγηση των DDR foci με πολύ γρήγορο τρόπο, με ολόκληρο το μεγαβασικό μέγεθος του χρωματικού πεδίου που τροποποιείται σε περίπου 10-30 λεπτά, η οποία ταιριάζει με τον παρατηρούμενο ρυθμό συναρμολόγησης των γ-H2AX foci. (50) Αυτό το μοντέλο θα συμφωνούσε με:

i) το εύρημα ότι στη μαγιά, το ορθόλογο Tel1 του ATM μεσολαβεί στη φωσφορυλίωση του H2A σε έναν τρόπο που συμφωνεί με ένα μοντέλο ολίσθησης 1D παρά με ένα μοντέλο διάχυσης 3D. (51)

ii) την πρόσφατη παρατήρηση, χρησιμοποιώντας τη φωτεινή ενεργοποίηση του Cas9, ότι η γ-H2AX εγκαθίσταται με ταχύτητα  $\sim 150\text{kb/min}$  και σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να φτάσει μέχρι και 30Mb. (52)

Επιπλέον, τα δεδομένα μας δείχνουν επίσης ότι κατά την παραγωγή DSB, η δύναμη του βρόγχου ενισχύεται, το cohesin συσσωρεύεται στις άκρες των βρόγχων και το ίδιο το σύμπλοκο cohesin τροποποιείται από το ATM μέσα σε κατεστραμμένα TADs. (49)

Πίνακας 2.4. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επέκταση θηλιάς ως μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA.

Πρωτεΐνη/Γονίδιο	Δράση
γH2AX	Επισημαίνει περιοχές του DNA που έχουν υποστεί διπλές θραύσεις.
CTCF	Δεσμεύεται στα όρια των TADs και περιορίζει τη δραστηριότητα εξαγωγής βρόχων του συμπλέγματος κοΐνης.
Cohesin	Μεσολαβεί στη διάδοση της γH2AX μέσω της εκχύλισης βρόχων και προάγει τη συναρμολόγηση των DDR foci.
ATM	Ενισχύει τη συσσώρευση του cohesin στις άκρες των βρόχων και τροποποιεί το σύμπλεγμα cohesin μέσα σε κατεστραμμένα TADs.
53BP1	Συμμετέχει στη διπλή θραύση του DNA και στην απόκριση επιδιόρθωσης.
MDC1	Διαμεσολαβεί στη συσσώρευση άλλων πρωτεϊνών επιδιόρθωσης στο σημείο της βλάβης.
NIPBL	Ενισχύει τη συσσώρευση του cohesin στις άκρες των βρόχων και προάγει τη συναρμολόγηση των DDR foci.
MRN	Ανιχνεύει και επεξεργάζεται διπλές θραύσεις, συνεργαζόμενο με το σύμπλεγμα cohesin.

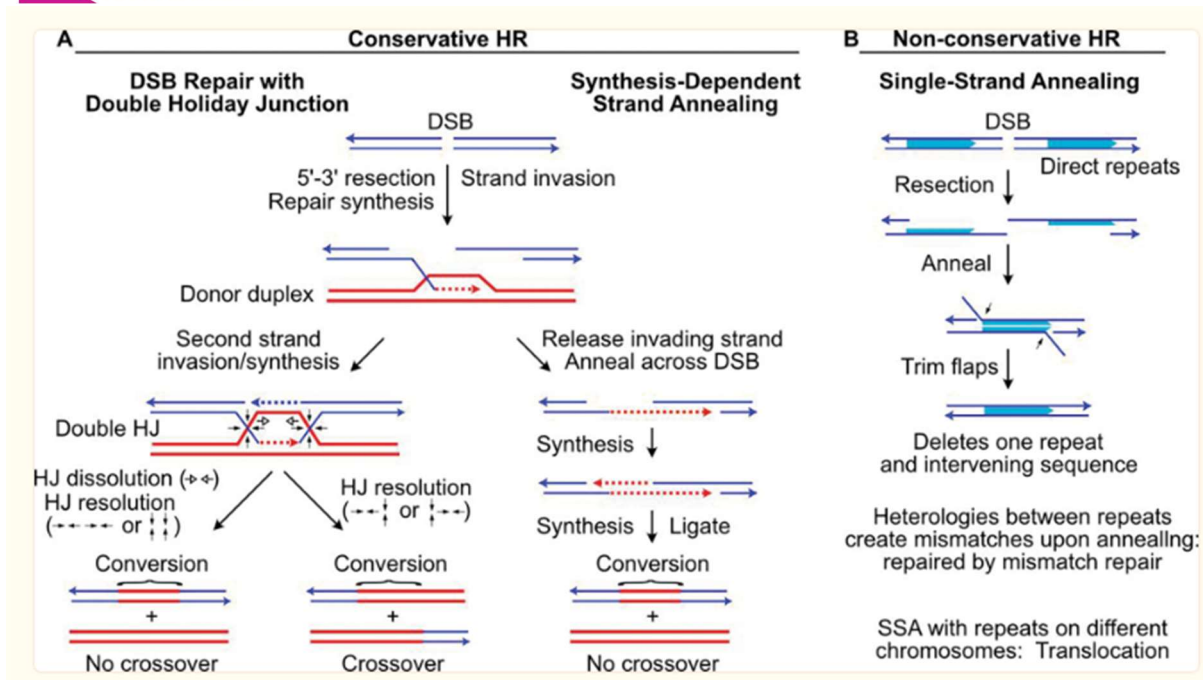
### 2.2.3.Επισκευή DNA μέσω ομόλογης συνδυαστικής επανασύνδεσης (HR).

Οι DSBs επισκευάζονται από τη μη-ομόλογη τελική συνάθροιση (NHEJ) και την ομόλογη συνδυαστική επανασύνδεση (HR). (53) Η NHEJ επανασυνδέει τα άκρα χωρίς να απαιτεί ένα πρότυπο επισκευής, επομένως είναι επιρρεπή σε λάθη και συνήθως παράγει μικρές διαγραφές ή εισαγωγές στις συνδέσεις επισκευής. Η NHEJ λειτουργεί καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής του κυττάρου και είναι το κυρίαρχο μονοπάτι επισκευής DSB στα θηλαστικά κύτταρα. Η HR απαιτεί ένα ομόλογο πρότυπο επισκευής και επομένως συνήθως δεν παρουσιάζει λάθη, αν και σπάνιες μεταλλάξεις προκύπτουν κατά τη διάρκεια της επανασύνθεσης της επισκευής και οι ανταλλαγές μπορεί να οδηγήσουν σε μεγάλης κλίμακας αναδιατάξεις

συμπεριλαμβανομένων διαγραφών, αναστροφών, διπλασιασμών και (σπάνια) μεταθέσεων. (54) Η HR περιορίζεται κυρίως στις φάσεις S/G2 του κύκλου ζωής του κυττάρου, αντανakλώντας αρκετά επίπεδα ρύθμισης, όπως η έκφραση βασικών πρωτεϊνών HR και παράγοντες που ρυθμίζουν την επανέκταση των άκρων 5'-3' όπως η CtIP, η BRCA1, η 53BP1 και η RIF1. (55)

Κατά την HR, τα σπασμένα άκρα μπορούν να εισβάλουν σε οποιαδήποτε ομόλογη ακολουθία στο γονίδιο (ομόλογα χρωμοσώματα, επαναλαμβανόμενες ακολουθίες κλπ.), αλλά η γενικά περιορισμένη διαθεσιμότητα της HR στις φάσεις S/G2 σημαίνει ότι η πλειονότητα της HR πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας κοντινά πρότυπα επισκευής αδελφής χρωματίδας, το οποίο αυξάνει την ακρίβεια της επισκευής. Επιπλέον, παράγοντες που βοηθούν τις ανταλλαγές (π.χ., Sgs1 στο μύκητα, BLM στα θηλαστικά κύτταρα) και ο βαθμός προς την κατεύθυνση της σύνθεσης εξαρτάται από τη σύνθεση στην απαλλαγή του DNA. (56)

Η HR περιλαμβάνει συντηρητικούς, εξαρτώμενους από RAD51, και μη συντηρητικούς, ανεξάρτητους από RAD51, μηχανισμούς επισκευής. (εικόνα 3.9) Η HR που εξαρτάται από το RAD51 συνήθως οδηγεί σε ακριβή επισκευή και σε γονική μετατροπή. Έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί επισκευής DSB που εξαρτώνται από το RAD51, ένας που περιλαμβάνει μια προσβολή ενός κλώνου σε ένα ομόλογο δίκλωνο δότη, που ονομάζεται εξαρτημένη σύνθεση στην προσβολή του κλώνου (SDSA), και ένα δεύτερο στο οποίο και οι δύο άκρες εισβάλλουν, παράγοντας διπλές δομές HJ, συχνά συμβολιζόμενες από το γενικό όρο "DSB επισκευή" (Εικόνα 3.9). Η μη συντηρητική HR, η οποία ονομάζεται σύνθεση μονόκλωνου (SSA), είναι ανεξάρτητη από το RAD51, αλλά απαιτεί την λειτουργία συνάθροισης του μονόκλωνου DNA του RAD52. (57) Η SSA μπορεί να λειτουργήσει όταν αλληλεπιδρούν ομόλογες ακολουθίες που συνδέονται σε άμεση οριοθέτηση, τις λεγόμενες "άμεσες επαναλήψεις" (Εικόνα 3.9). Μπορεί επίσης να διευκολύνει μετατοπίσεις εάν οι αλληλεπιδρούσες επαναλήψεις βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, όπως φαίνεται με DSB που προκαλούνται από νουκλεάσες σε θηλαστικά κύτταρα (58) και από ιοντίζουσα ακτινοβολία στη μαγιά. (59) Η SSA είναι μη συντηρητική επειδή διαγράφει μία από τις επαναλήψεις, καθώς και τις μεσοδιαδοχικές ακολουθίες μεταξύ συνδεδεμένων επαναλήψεων, ή προκαλεί μετατοπίσεις με μη συνδεδεμένες επαναλήψεις. Οι ελαττώσεις στην HR που εξαρτώνται από το RAD51 επιτρέπουν να γίνει η επισκευή από τους μηχανισμούς NHEJ και SSA, οι οποίοι όμως είναι επιρρεπείς σε λάθη. (60)



Εικόνα 2.6. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης HR.

Στα κύτταρα θηλαστικών, η HR και η NHEJ συνεισφέρουν και οι δύο στην επισκευή των DSB που προκαλούνται από ιοντίζουσα ακτινοβολία. Ως εκ τούτου, η HR και η NHEJ αποτελούν ανταγωνιστικούς μηχανισμούς επισκευής DSB. Στα κύτταρα θηλαστικών, η NHEJ είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός που επισκευάζει τα DSB που προκαλούνται από ιοντίζουσα ακτινοβολία, αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι η HR έχει αυξημένη σημασία στην επισκευή συγκεντρωμένων DSB που προκαλούνται από υψηλή ενέργεια γραμμικής μεταφοράς (LET) άνθρακα και άλλα βαριά ιόντα, αν και παρά τη μετατόπιση αυτή, η NHEJ μπορεί ακόμα να είναι κυρίαρχη. (60)

Η πρωτεΐνη BRCA1 έχει καίριο ρόλο στο συντονισμό της επιλογής μεταξύ της NHEJ και της HR. Η HR απαιτεί πολλές πρωτεΐνες που λειτουργούν σε διακριτά βήματα. Ξεκινά με εκτεταμένη επικάλυψη των 5' άκρων με κατεύθυνση προς τα 3', που δημιουργεί μακριές ουρές 3' μονόκλωνου DNA (ssDNA). Η BRCA1 προωθεί την επικάλυψη των ακρών από τον αναστολέα των πρωτεϊνών επισκευής των DSB, δηλαδή των 53BP1 και RIF1 που έχουν σαν ρόλο την καταστολή της επικάλυψης αυτής, και προωθεί τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών επισκευής επικάλυψης / συν-παραγόντων MRE11 / RAD50 / NBS1 (MRN), CtIP, EXO1 και DNA2 / BLM. (61) (62) Οι MRN και CtIP συνεργάζονται για να αποκαλύψουν ουρές ssDNA έως περίπου ~100 νουκλεοτιδίων, ενώ η πιο εκτεταμένη επικάλυψη προκαλείται από το EXO1 και από το DNA2 με τους συν-παραγόντες BLM ή WRN. (62) Η υπερβολική επικάλυψη

καταστέλλεται από το HELB και από τη φωσφορυλίωση των μοτίβων SQ του EXO1 από την κινάση ATR. Το ssDNA που αποκαλύπτεται από την επικάλυψη, καλύπτεται γρήγορα από την πρωτεΐνη συγκράτησης μιας αλυσίδας RPA, η οποία αντικαθίσταται στη συνέχεια με το RAD51 σε μια αντίδραση που διευκολύνεται από τους RAD51 παραλόγους (XRCC2, XRCC3, RAD51B, RAD51C, RAD51D), RAD52, RAD54, BRCA2 και MSH3. (61) Σε ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα, η αποτυχία του RAD51 είναι καίριας σημασίας για το κύτταρο, αλλά οι ελλείψεις στις πρωτεΐνες επιδιώρθωσης μειώνουν γενικά την HR κατά ~50% και αυξάνουν την αστάθεια του γονιδιώματος, αντικατοπτριζόμενη σε μετατοπίσεις προς SSA (63) και τροποποιημένες δομές διαδοχικών γονιδίων. (64) Η RAD51 αποχωρίζεται από το ssDNA για να επιτρέψει τη σύνθεση επισκευής από την πολυμεράση του DNA δέλτα και / ή τις πολυμεράσες ήτα, έτα και καπά για να επεκτείνουν το 3' άκρο. Αυτή η απαίτηση για αποχώριση του RAD51 πριν από τη σύνθεση επισκευής σημαίνει ότι η ανίχνευση των πυρηνοπρωτεΐνων RAD51 είναι ενδεικτική των λειτουργικών, αρχικών βημάτων της HR, αλλά όχι απαραίτητη για την ολοκλήρωσή της. Έτσι, οι επίμονες πυρηνοπρωτεΐνες RAD51 μπορεί να αντικατοπτρίζουν αποτυχημένα, αργά βήματα της HR. (65)

Μόλις η σύνθεση επισκευής επεκταθεί πέρα από τη θέση του αρχικού DSB, οι είσοδος πρωτεϊνών επιδιώρθωσης διαχωρίζονται από τη διπλή έλικα και επανασυνδέονται με το ssDNA πιο μακριά από την αρχική θέση DSB. Η επισκευή ολοκληρώνεται στη συνέχεια με περαιτέρω σύνθεση και συντήρηση των νουκλεοτιδίων για να γεμίσουν τυχόν υπολειπόμενα κενά και να επαναφέρουν το συνεχές δίκλωνο DNA. Εάν προκύψουν διπλασιασμοί διπλής έλικας κατά τη διάρκεια της HR, μπορούν να διαλυθούν μέσω συγκλίνουσας μετακίνησης κλάδων διπλής έλικας από το σύμπλεγμα πρωτεϊνών που διαδραματίζει αυτό το ρόλο και που αποτελείται από τις πρωτεΐνες BLM, TopoIIIα και RMI1, ή να επιλυθούν μέσω κλάσης / επανασύνδεσης που ξεκινούν από το MUS81 / EME1, ή από την πρωτεΐνη προσδέσεως SLX4 και τον εξιδρωτικό τύπο GEN1. (66)

Η HR παίζει επίσης κρίσιμο ρόλο στην αντίδραση σε αναπαραγωγικό άγχος που προκαλείται από θραύσεις μιας αλυσίδας DNA ενδογενώς λόγω ROS εξαιτίας χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και ιοντικής ακτινοβολίας. Για κάθε DSB που προκαλείται από ιοντίζουσα ακτινοβολία, προκαλούνται περίπου 100 φορές περισσότερα SSBs και άλλα μονόκλωνα μιας αλυσίδας. (67) Ενώ οι περισσότερες μονόκλωνες θραύσεις επισκευάζονται αποτελεσματικά, ακόμη και μέτριες δόσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας (1 έως μερικά Gy) προκαλούν χιλιάδες τέτοιες θραύσεις. Η DDR περιλαμβάνει ελέγχους ζημιών στο DNA που προκαλούν αναστολή του κυτταρικού κύκλου και προώθηση επισκευών του DNA. Ο έλεγχος G1 / S αποτρέπει τα

κύτταρα G1 από την είσοδο στη φάση S, και ο ενδο-S έλεγχος σταματά την τρέχουσα αναπαραγωγή και αποτρέπει τη μεταφορά βλαβών στα νέα κύτταρα. Ωστόσο, οι έλεγχοι του κυτταρικού κύκλου έχουν περιορισμούς. Για παράδειγμα, οι μύκητες εμφανίζουν "προσαρμογή του ελέγχου" στην οποία τα κύτταρα επανεισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο παρά την ύπαρξη διαρκών DSBs, μια απάντηση που ρυθμίζεται από το Ku, το Mre11 και το RPA. Παρόλο που η προσαρμογή επιτρέπει στα κύτταρα να επανεξετάσουν τον κύκλο, αυτό έχει τελικά θανατηφόρες συνέπειες. (68)

Στα θηλαστικά κύτταρα, ο έλεγχος G1 / S ενεργοποιείται αργά μετά από την ιοντική ακτινοβολία, και μερικά κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G1 με ζημιά εισέρχονται στη φάση S για αρκετές ώρες μετά από ακτινοβολία. Ο ενδο-S έλεγχος πραγματοποιείται από το ATR, αλλά η ενεργοποίηση του ATR είναι αργή επειδή απαιτείται επεξεργασία DSB για να παράγει RPA-δεμένο ssDNA, και η υπερφωσφορυλίωση της υπομονάδας RPA32 στο RPA-δεμένο ssDNA, σημασμένη με φωσφορυλιωμένο RPA32 Ser4 / Ser8, είναι κρίσιμη για την ενεργοποίηση του Chk. (60) Έτσι, παρά τους ασφαλιστικούς μηχανισμούς της DDR, οι ζημιές στο DNA που προκαλούνται από ιοντίζουσα ακτινοβολία συναντώνται από τις αναπαραγωγικές διακλαδώσεις, προκαλώντας αναπαραγωγικό άγχος που αντικατοπτρίζει την αναστολή των αναπαραγωγικών διακλαδώσεων και / ή την κατάρρευση τους σε DSBs. Είναι καλά αντιληπτό ότι οι εξαρτημένες από την αναπαραγωγή DSBs επισκευάζονται με HR. (60) Παρόλο που η επισκευή και η επανεκκίνηση της αναπαραγωγής με HR θέτει κινδύνους που σχετίζονται με την παραγωγή τοξικών ενδιάμεσων της HR, (69) είναι ακόμη πιο επικίνδυνο για τα μονομερή DSBs να επισκευαστούν με NHEJ καθώς αυτό εγγυάται την πρόκληση χρωμοσωμικών αναδιατάξεων επειδή μια τέτοια επισκευή προϋποθέτει την ένωση των DSBs που προκύπτουν σε απόσταση, προκαλώντας κατάρρευση αναπαραγωγικών διακλαδώσεων. (60)

Οι εξαρτημένες από αναπαραγωγή DSBs εμφανίζονται μερικές ώρες μετά την ακτινοβολία, όταν οι αναπαραγωγικές διαδικασίες συναντούν ζημιές και καταρρέουν σε μονομερείς DSBs. Τα πρώτα στοιχεία για αυτά τα αργά προκύπτοντα DSBs αποκτήθηκαν μέσω κινητικής ανάλυσης σημείων επισκευής από RAD51, BCCIP (πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το BRCA2 και το CDKN1A), RAD52 και γH2AX. Στα θηλαστικά κύτταρα, η BRCA2 διαμεσολαβεί το φορτίο του RAD51 στη μονόκλωνη αλυσίδα μέσω εννέα περιοχών που αλληλεπιδρούν με το RAD51, συμπεριλαμβανομένων 8 επαναλήψεων BRC και μιας περιοχής εξόνης 27. (69)

Κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγής του DNA, οι αναπαραγωγικές θηλιές που αναπτύσσονται για να αντιγράψουν το DNA μπορούν να συναντήσουν τις μονές θραύσης και να παράγουν

διπλές θραύσεις (DSBs). Οι περιοχές αυτές του DNA που υφίστανται μεταλλάξεις μπορεί να εμποδίζουν την κανονική λειτουργία των αναπαραγωγικών DNA πολυμεράσεων, των ενζύμων που ευθύνονται για την αντιγραφή του DNA. Ωστόσο, ορισμένες ειδικές πολυμεράσεις, όπως οι η, ι και κ, REV1 και REV3, μπορούν να παρακάμψουν αυτά τα εμπόδια. Οι DSBs μπορούν επίσης να συμβούν όταν υπάρχουν εμπόδια στις αναπαραγωγικές διακλαδώσεις, όπως όταν εμφανίζεται έλλειψη νουκλεοτιδίων λόγω της δράσης φαρμάκων όπως η υδροξυουρία, ή όταν γίνεται καθαρισμός από ειδικές νουκλεάσες που κόβουν το DNA σε συγκεκριμένα σημεία. Η επιδιόρθωση των διακλαδώσεων και η επανεκκίνηση τους μετά τον καθαρισμό μπορεί να προσφέρει ένα υπόστρωμα για ακριβή επισκευή, αποφεύγοντας τις μεταλλάξεις και τις δομικές παραμορφώσεις που μπορεί να προκληθούν από τη διακλάδωση. (70)

Υπάρχουν τρεις κύριες νουκλεάσες που εμπλέκονται στην επεξεργασία των εμποδισμένων ή ακινητοποιημένων διακλαδώσεων αναπαραγωγής, και πώς αυτές συμβάλλουν στην παραγωγή και επεξεργασία των διπλών αλυσίδων κοπών (DSBs) που εξαρτώνται από την αναπαραγωγή. Αυτές είναι:

1. *MUS81/EME Complex*: Το MUS81 είναι μία 3' ενδονουκλεάση που βοηθάται από τους συν-παράγοντες EME1 ή EME2. Αυτός ο σύμπλεγμα λειτουργεί κόβοντας τις εμποδισμένες ή ακινητοποιημένες διακλαδώσεις αναπαραγωγής, βοηθώντας έτσι στην ακριβή επανεκκίνηση της διακλάδωσης. Ελλείψεις στο MUS81 ή τον EME2 μπορεί να αναστείλουν την επανεκκίνηση των διακλαδώσεων και να αυξήσουν την αστάθεια του γονιδιώματος. (71)
2. *SLX4/GEN1*: Το SLX4 είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που βοηθά το MUS81 στο κόψιμο των διακλαδώσεων που έχουν υποστεί στρες. Το GEN1 είναι άλλη μια νουκλεάση που συνεργάζεται με το SLX4 για την επεξεργασία της διακλάδωσης, διαχειρίζοντας τις διακλαδώσεις που έχουν ανασταλεί. (72)
3. *EEPD1 και Metnase*: Το EEPD1 είναι μια 5' ενδονουκλεάση που προήλθε από τους χορδωτούς και συμμετέχει στο κόψιμο των ακινητοποιημένων διακλαδώσεων, προωθώντας τη σταθερή HR-μεσολαβημένη επισκευή και επανεκκίνηση της διακλάδωσης. Το Metnase, μια σχετικά νεότερη 5' ενδονουκλεάση, διαθέτει πρωτεϊνικές μεθυλοτροπίες και νουκλεασικές δραστηριότητες, οι οποίες βοηθούν στην HR-μεσολαβούμενη επεξεργασία και επανεκκίνηση των διακλαδώσεων που έχουν υποστεί στρες. (60)

Αυτές οι νουκλεάσεις διαδραματίζουν κρίσιμους ρόλους στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος μέσω της επεξεργασίας και επιδιόρθωσης των διακλαδώσεων αναπαραγωγής. Με κυρίαρχο το ρόλο της EEPD1 στη μονομερή επισκευή βάσης (BER). Το EEPD1 έχει την ικανότητα να δένεται και να κόβει το DNA όπου υπάρχει απουσία βάσης, μια λειτουργία που παραδοσιακά συνδέεται με το ένζυμο APEX1. Αυτός ο νέος ρόλος του EEPD1 στην αντικατάσταση του APEX1 στον κύκλο της BER είναι σημαντικός καθώς δείχνει ότι υπάρχουν εναλλακτικές διαδρομές για την επισκευή του DNA που μπορεί να ενεργοποιηθούν υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Επίσης, το EEPD1 δεν επιδιορθώνει μόνο απουσία βάσης στα ανασυντιθέμενα συστήματα, αλλά επεξεργάζεται επίσης βλάβες όπως το 8-oxo-dG στο γονιδιωματικό DNA in vivo. Αυτό υποδηλώνει ότι το EEPD1 έχει ευρύτερο ρόλο στην αντιμετώπιση οξειδωτικών βλαβών, με σημαντικές επιπτώσεις για την κυτταρική αντοχή σε οξειδωτικό και αλκαλικό στρες. Τέλος προσελκύει το EXO1 για να ξεκινήσει την επεξεργασία των αποτελεσμάτων των μονομερών DSBs, προάγοντας την HR-μεσολαβούμενη επισκευή. Αυτό δείχνει ότι το EEPD1 λειτουργεί ως κρίσιμος παράγοντας στην επισκευή των βλαβών που ενδέχεται να προκύψουν κατά τη διαδικασία αναπαραγωγής και σε οξειδωτικές συνθήκες. (60)

Ο ρόλος του EEPD1 στην επανεκκίνηση των διαδικασιών αναπαραγωγής και η συμβολή του στη σταθερότητα του γονιδιώματος είναι θέματα κρίσιμης σημασίας στη βιολογία των κυττάρων. Το EEPD1 είναι μια σχετικά πρόσφατη προσθήκη στους μηχανισμούς της επισκευής DNA, που εξελίχθηκε αργότερα από το MUS81. Η εμφάνισή του συμπίπτει με επεκτάσεις στο μέγεθος και στην πολυπλοκότητα του γονιδιώματος. Αυτό υποδεικνύει ότι το EEPD1 μπορεί να είναι μια προσαρμογή στις αυξημένες απαιτήσεις για ακριβή και αποτελεσματική επισκευή DNA σε μεγαλύτερα και πιο πολύπλοκα γονιδιώματα. Το EEPD1 λειτουργεί ως 5' νουκλεάση, κόβοντας τις ακινητοποιημένες διακλαδώσεις. Αυτό αντιδιαστέλλεται με την MUS81, η οποία είναι 3' νουκλεάση. Η διαφορετική κατεύθυνση της κοπής από το EEPD1 μπορεί να προωθεί μια πιο αποτελεσματική και λιγότερο επιβαρυντική επανεκκίνηση της διαδικασίας αναπαραγωγής του DNA, μειώνοντας τις πιθανότητες για τη δημιουργία τοξικών δομών. Η ελλείψη του EEPD1 συνδέεται με αυξημένη γονιδιωματική αστάθεια, τόσο σε κυτταρικό όσο και σε επίπεδο οργανισμού. Αυτό υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη δεν είναι απλώς μια προσθήκη στην επισκευή του DNA, αλλά έχει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της ολοκληρότητας του γονιδιώματος, ειδικά κατά τις φάσεις αναπαραγωγής και σε συνθήκες στρες. (60)

Πίνακας 2.5. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επισκευή DNA μέσω ομόλογης συνδυαστικής επανασύνδεσης (HR).

Πρωτεΐνη/Γονίδιο	Δράση
Rad51	Προάγει τον ομόλογο ανασυνδυασμό, προσκολλώντας τα μονόκλωνα DNA στις περιοχές που έχουν σπάσει.
BRCA1	Συμμετέχει στη ρύθμιση της επιδιόρθωσης μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού.
BRCA2	Ενισχύει τη σταθερότητα και τη λειτουργία της Rad51 στη διαδικασία του ομόλογου ανασυνδυασμού.
RPA	Δεσμεύεται στο μονονηματικό DNA και προστατεύει τα μονονηματικά τμήματα από τη διάσπαση.
Rad52	Διευκολύνει την αναζήτηση ομόλογων αλληλουχιών και την πρόσδεση τους στο μονονηματικό DNA.
Rad54	Προάγει την κίνηση και την επανασύνδεση των ομόλογων αλληλουχιών DNA.
DSS1	Συνεργάζεται με τη BRCA2 στην επανασύνδεση του DNA και τη σταθεροποίηση του μονονηματικού DNA.
PALB2	Συνδέει τη BRCA1 και τη BRCA2, βοηθώντας στη διαδικασία του ομόλογου ανασυνδυασμού.
Rad50/ MRE11/ NBS1	Μέλος του συμπλέγματος MRN που ανιχνεύει και επεξεργάζεται διπλές θραύσεις.

#### 2.2.4. Επισκευή DNA μέσω μη ομόλογης τελικής συνάθροισης (NHEJ).

Η μη ομόλογη συνένωση άκρων DNA (NHEJ) ήταν αρχικά μια φράση που χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει έναν τύπο παράνομης επιδιόρθωσης που χρησιμοποιεί ελάχιστη έως καθόλου μακρά ομολογία (θεωρούμε ότι δεν είναι απαραίτητο να περιλαμβάνεται η λέξη "κανονικό" ή να χρησιμοποιηθεί ο όρος "c-NHEJ" καθώς θεωρούμε το NHEJ ως ένα αυτόνομο μονοπάτι που δεν χρειάζεται να περιγράφεται αναφορικά με ξεχωριστές εναλλακτικές διαδρομές συνένωσης άκρων που έχουν τα δικά τους διακριτά συστατικά). Το "μη ομόλογο" μπορεί να ερμηνευθεί λανθασμένα ως εντελώς ανεξάρτητο από την ομολογία από έναν νέο στον τομέα, αλλά συνήθως παρατηρείται μέχρι 4 ζεύγη βάσεων μικροομολογία κατά την επιδιόρθωση, και ο όρος απλώς προορίζεται να αντιπαραβάλλεται με την "ομόλογη" αναδιπλοποίηση (HR), η οποία μπορεί να χρησιμοποιήσει πολλές εκατοντάδες βάσεις ομολογίας ως πρότυπο για επιδιόρθωση υψηλής ακρίβειας. (73)

Το μη ομόλογο κλείσιμο των άκρων του DNA (NHEJ) είναι μια κρίσιμη και πολυδύναμη διαδικασία στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του κυτταρικού DNA, ιδιαίτερα στην αντιμετώπιση διπλών διασπάσεων των αλυσίδων DNA (DSBs), που αποτελούν μία από τις πιο σοβαρές μορφές βλάβης. Η επιδιόρθωση DNA μέσω της διαδρομής NHEJ είναι μια απότομη και έκτακτη διαδικασία που επανασυνδέει τα δύο άκρα ενός DSB χωρίς την απαίτηση ομολογίας αλληλουχίας μεταξύ τους. (73)

Το αρχικό βήμα είναι η δέσμευση ενός ετεροδιμερούς συμπλέγματος από τις πρωτεΐνες Ku70 και Ku80, που προστατεύει το DNA από την εξονουκλεολυτική πέψη. Αυτή η δράση είναι κρίσιμη καθώς προστατεύει τα άκρα του DNA από περαιτέρω εξασθένηση και προσελκύει επιπλέον πρωτεΐνες επιδιόρθωσης. (73) Το ετεροδιμερές Ku συνδυάζεται με την καταλυτική υπομονάδα του DNA-PK για να δημιουργήσει το ενεργό ολοένζυμο DNA-PK. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει την αυτοφωσφορυλίωση του DNA-PKcs και τη φωσφορυλίωση των βοηθητικών παραγόντων, η οποία είναι σημαντική για την απελευθέρωση του DNA-PKcs και του Ku από το DSB πριν από την ένωση των άκρων. (74)

Το ένζυμο Artemis, σε σύμπλεγμα με την καταλυτική υπομονάδα της DNA-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (DNA-PKcs), λειτουργεί κυρίως ως νουκλεάση. Κόβει τα άκρα του DNA, κάνοντάς τα πιο κατάλληλα για σύνδεση, ιδιαίτερα όταν τα άκρα είναι βλαβερά ή έχουν ασυμβίβαστες διαμορφώσεις. Αυτό συχνά περιλαμβάνει τη χρήση μικροομοιότητας έως 4 βάσεων για να σταθεροποιηθεί η ένωση. Οι πολυμεράσες  $\mu$  (Pol  $\mu$ ) και  $\lambda$  (Pol  $\lambda$ ) έχουν ρόλο στην προσθήκη νουκλεοτιδίων στα άκρα του DNA για να γεμίσουν τα κενά που μπορεί να προκύψουν κατά την επιδιόρθωση. Η δράση τους επιτρέπει κάποια ευελιξία στην αντιμετώπιση αταίριαστων άκρων DNA, παρέχοντας ένα πρότυπο βασικής αντιστοίχισης όπου αυτό δεν υπάρχει. Η XRCC4 σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλεγμα με την DNA λιγάση IV, και αυτό το σύμπλεγμα δεσμεύεται στα άκρα των μορίων DNA, ενώνοντας τα δίπλα DNA με αλληλουχίες που είναι συμπληρωματικές αλλά όχι συνδετικές. Μετά τη λιγάση, οι παράγοντες σχετικοί με το NHEJ πρέπει να αφαιρεθούν από το DNA πριν από την επανασύνδεση των DSB. (74)

Η ευελιξία και η ποικιλομορφία στην επεξεργασία των άκρων DNA μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στην αρχική αλληλουχία DNA στο σημείο της διάσπασης. Ως εκ τούτου, ενώ το NHEJ είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό στην εξασφάλιση της επιβίωσης των κυττάρων με την επιδιόρθωση των DSBs, μπορεί επίσης να εισάγει μεταλλάξεις, οι οποίες θα μπορούσαν να έχουν συνέπειες ανάλογα με το γονιδιωματικό πλαίσιο. (73)

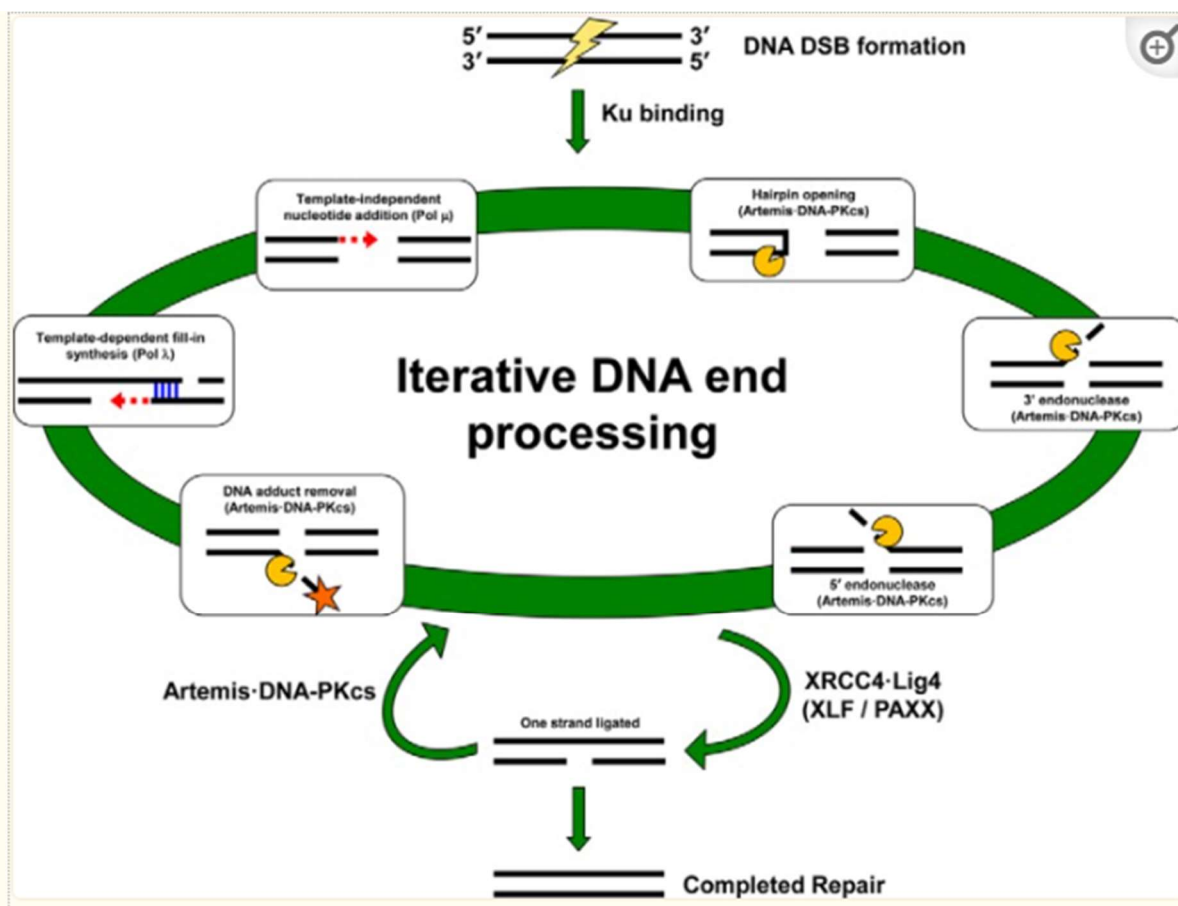
Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το NHEJ είναι μια επαναλαμβανόμενη διαδικασία, όπου κάθε ένα από τα άκρα του DNA που εμπλέκονται στη διάσπαση μπορεί να επεξεργαστεί πολλαπλές φορές και σε διαφορετική σειρά από αυτά τα συστατικά. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν την επιδιόρθωση είναι οι διαφορετικές απαιτήσεις για τις διάφορες πρωτεΐνες NHEJ ανάλογα με τη διαμόρφωση των άκρων του DNA, που μπορεί να περιλαμβάνει άκρα χωρίς εξογκώματα, με εξογκώματα 5' ή 3', ή άκρα που περιέχουν προσθήκες ανθεκτικές στην επεξεργασία ή τη σύνδεση. (73)

Στα ανθρώπινα κύτταρα, το NHEJ φαίνεται να επιδιορθώνει σχεδόν όλες τις διπλές διασπάσεις DNA (DSBs) εκτός από τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου S και G2 και ακόμα και περίπου το 80% των DSBs μέσα στις φάσεις S και G2 που δεν είναι κοντά σε μια θηλιά αντιγραφής. (75) Όταν το NHEJ δεν λειτουργεί σωστά λόγω της απουσίας ενός ή περισσότερων κύριων πρωτεϊνικών συστατικών, γίνονται εμφανείς οι δραστηριότητες άλλων δρόμων ενώσεων DNA που συνήθως περιλαμβάνουν πιο εκτεταμένη αναδίπλωση των άκρων. Υψηλότερα επίπεδα αναδίπλωσης του 5' άκρου αποκαλύπτουν ομόλογες ακολουθίες ενσωματωμένες σε κάθε πλευρά ενός DSB, επιτρέποντας τη σταθερή συγχώνευση του 3' μονόκλωνου DNA (ssDNA) που προωθεί πιο αποδοτική ένωση και σύνδεση. (76)

Παρόλο που το NHEJ συνήθως απαιτεί  $\leq 4$  bp μικροομολογίας, ο εναλλακτικός δρόμος της ένωσης (a-EJ) (επίσης γνωστός ως ένωση μεσολαβούμενη από το Pol θ ή ένωση με μικροομολογία), ο οποίος χρησιμοποιεί επιπλέον παράγοντες της πολυ(ADP-ριβόζης) πολυμεράσης και της DNA Pol θ, απαιτεί μικροομολογία που κυμαίνεται από 2 έως 20 bp. Παρόλο που το NHEJ κυριαρχεί στην επιδιόρθωση DSB στα περισσότερα θηλαστικά σωματικά κύτταρα, τα γεγονότα που μεσολαβούνται από το Pol θ εμφανίζονται με παρατηρήσιμη συχνότητα σε ορισμένους τύπους κυττάρων, για ορισμένα γεγονότα επιδιόρθωσης, και σε ορισμένους οργανισμούς. Μεγαλύτερα επίπεδα αναδίπλωσης μπορούν να προωθήσουν περαιτέρω την μη συντηρητική οδό επιδιόρθωσης με καθοδηγούμενη από ομολογία ενιαία σύνδεση (SSA), η οποία απαιτεί  $>25$  bp ομολογίας. Ως εκ τούτου, οι μηχανισμοί του NHEJ και του HR βρίσκονται σε αντίθετα άκρα του φάσματος ως προς τη χρήση ομολογίας με το a-EJ και το SSA να βρίσκονται ανάμεσά τους σε μια κλίμακα αυξανόμενων επιπέδων αναδίπλωσης των άκρων του DNA και χρήσης ομολογίας. (73)

Ένας βασικός λόγος για την κυριαρχία του NHEJ είναι ότι η εκτεταμένη αναδίπλωση των άκρων του DNA προλαμβάνεται από τη δέσμευση του Ku (εικόνα 3.10) και η σφικτή συγγένεια και η υψηλή αφθονία του Ku στα κύτταρα αυξάνουν την πιθανότητα ότι το Ku θα είναι η πρώτη πρωτεΐνη που θα δεσμευτεί σε ένα σπασμένο άκρο DNA. (77) Ένα μικρό

πρωτεϊνικό συστατικό που ονομάζεται CYREN (κυτταρικός ρυθμιστής του NHEJ) επίσης γνωστό ως MRI-2, ένα υποπεπτίδιο του C7orf49 έχει προταθεί ότι επηρεάζει τη δέσμευση του DNA από το Ku και έτσι προτιμάται η επιλογή του δρόμου HR στις φάσεις S/G2. (78) Οι παράγοντες σήματος φαίνεται ότι είναι σημαντικοί στον έλεγχο της αναδίπλωσης, καθώς υπάρχουν στοιχεία ότι η πρωτεΐνη αντίδρασης στη ζημιά του DNA, η p53 (53BP1), είναι ανταγωνιστική προς την αναδίπλωση, δρώντας μέσω πολλών πρωτεϊνικών αποτελεσμάτων. Οι 53BP1 και ο διαμεσολαβητής της πρωτεΐνης ελέγχου ζημιάς του DNA 1 (MDC1) προσλαμβάνονται σε DSBs μέσω πολλών τροποποιημένων ιστονικών υπολειμμάτων και φαίνεται να έχουν διακριτούς ρόλους στην επιδιόρθωση DSB. (73)



Εικόνα 2.7. Τα άκρα του DNA υφίστανται επαναλαμβανόμενη επεξεργασία κατά τη διάρκεια του NHEJ. (69)

Μετά την δέσμευση στο NHEJ, η νουκλεάση, η πολυμεράση και η λιγάση δρουν στα άκρα του DNA μέχρι η επιδιόρθωση να ολοκληρωθεί. Η δέσμευση στον δρόμο πιθανότατα δεν είναι τελική μέχρι τα νήματα του σημείου διάσπασης να συνδεθούν, και αν το DSB παραμένει ανεπιδιόρθωτο, η επανεπεξεργασία των άκρων μπορεί να τροποποιήσει την επιδιόρθωση ακολουθώντας άλλο δρόμο. (73)

Πίνακας 2.6. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επισκευή DNA μέσω μη ομόλογης τελικής συνάθροισης (NHEJ)

Πρωτεΐνη/Γονίδιο	Δράση
Ku70	Συνδέεται στα άκρα του DNA που έχουν σπάσει και προάγει τη σύνδεσή τους.
Ku80	Σχηματίζει σύμπλεγμα με την Ku70 και βοηθά στην αναγνώριση και σύνδεση των θραυσμάτων του DNA.
DNA-PKcs	Ενεργοποιείται από το σύμπλεγμα Ku και συμμετέχει στη ρύθμιση της μη ομόλογης τελικής συνάθροισης.
XRCC4	Συνεργάζεται με την DNA Ligase IV για να ολοκληρώσει την επιδιόρθωση του DNA.
Ligase IV	Συνεργάζεται με την XRCC4 για την ένωση των σπασμένων άκρων του DNA.
Artemis	Επεξεργάζεται τα άκρα του DNA για να τα προετοιμάσει για σύνδεση.
DNA Ligase III	Επιδιορθώνει τα μονά νήματα θραύσης του DNA και συνεργάζεται με την XRCC1.
Pol μ	Ενσωματώνει νουκλεοτίδια στα άκρα του DNA που έχουν σπάσει.
Pol λ	Συμμετέχει στη διαδικασία της NHEJ εισάγοντας νουκλεοτίδια στα σπασμένα άκρα του DNA.

### 2.3. Η ιονίζουσα ακτινοβολία επηρεάζει τα micro RNAs

Τα εκατοντάδες microRNAs είναι υψηλά συντηρημένα μη κωδικοποιημένα RNA, τα οποία μπορούν να αλλάξουν την έκφραση των πρωτεϊνών και να ρυθμίσουν μια ποικιλία κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου του χρόνου ανάπτυξης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της αντίδρασης των όγκων και των κυττάρων στο άγχος. Στην περίπτωση τραυματισμού του DNA, τα miRNAs μπορούν να ενεργοποιήσουν την απόπτωση και να αποκλείσουν τον κυτταρικό κύκλο. Έτσι, αυτή η διαδικασία μπορεί να ενεργοποιήσει απευθείας και έμμεσα το γονίδιο στόχο καταστολής όγκων p53. Με τη βαθύτερη γνώση της έρευνας στη ραδιολογία και την ώριμη τεχνολογία προηγμένης ακτινοθεραπείας, έχει διαπιστωθεί ότι η δόση ακτινοβολίας επηρεάζει επίσης το RNA. Στην καθημερινή ζωή, η έκφραση των miRNA μπορεί να αγνοηθεί κάτω από LDIR επειδή γενικά δεν έχει ακόμα χρόνιες παρενέργειες. Ωστόσο, η σημαντική αλλαγή επιπέδου έκφρασης των

miRNA κάτω από HDIR πρέπει να τονιστεί. Μια μελέτη έδειξε ότι η ακτινοβολία με ακτίνες X δόσης 1.25 Gy στη ραδιοθεραπεία αυξάνει σημαντικά την έκφραση των miRNA. (43)

### 3. Μεταλλάξεις του DNA που προκαλούνται από την έκθεση σε ακτινοβολίες

Η έκθεση σε ακτινοβολίες μπορεί να προκαλέσει διάφορους τύπους γενετικών μεταλλάξεων στα κύτταρα. Αυτές οι μεταλλάξεις περιλαμβάνουν:

1. **Απλές αντικαταστάσεις Βάσης:** Αλλαγές σε μεμονωμένα νουκλεοτίδια του DNA, που μπορεί να περιλαμβάνουν την αντικατάσταση μιας βάσης με μια άλλη (σημείο μετάλλαξης).
2. **Έλλειψη ή προσθήκη βάσεων:** Η απώλεια ή προσθήκη μικρού αριθμού βάσεων του DNA μπορεί να συμβεί, διαταράσσοντας τη γενετική πληροφορία.
3. **Χρωμοσωμικές Αναδιατάξεις:** Περιλαμβάνονται μεγαλύτερες διαταραχές όπως η αναδιάταξη τμημάτων των χρωμοσωμάτων, όπως αναστροφή ή ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ χρωμοσωμάτων (μετατοπίσεις, αμοιβαίες μετατοπίσεις).
4. **Διπλοτυπίες:** Επαναλήψεις τμημάτων DNA που μπορεί να αυξήσουν το αντίγραφο κάποιων γονιδίων.
5. **Σπάσιμο-σύζευξη (Breakage-Fusion-Bridge Cycle):** Ένα σπάσιμο στο DNA δεν επιδιορθώνεται σωστά και οδηγεί σε περαιτέρω γενετικές ανωμαλίες καθώς το κύτταρο διαιρείται.

Οι μεταλλάξεις αυτού του είδους μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές της λειτουργίας ή της έκφρασης των γονιδίων, και σε περιπτώσεις όπως τα καρκινικά κύτταρα, μπορεί να συμβάλουν στην ανάπτυξη και πρόοδο της νόσου.

#### 3.1. Μοντέλα και τεχνικές μελέτης μεταλλάξεων

Για τον προσδιορισμό και την κατανόηση των βιολογικών επιπτώσεων της ακτινοβολίας, με έμφαση στις βλάβες στο DNA και τις επιπτώσεις τους στους οργανισμούς, έχουν αναπτυχθεί κάποια μοντέλα και τεχνικές μελέτης. Κάποια από αυτά είναι:

### 3.1.1. Μοντέλα Κυτταρικής Επιβίωσης

**Γραμμικό Τετραγωνικό Μοντέλο (LQ):** Χρησιμοποιείται ευρέως για την ερμηνεία της επιβίωσης των κυττάρων μετά από ακτινοβολία. Οι βασικές αρχές του LQ Μοντέλου αφορούν την περιγραφή της επιβίωσης των κυττάρων μετά από ακτινοβολία με βάση την εξίσωση  $S=e^{-(\alpha D+\beta D^2)}$ , όπου  $S$  είναι η κλασματική επιβίωση των κυττάρων,  $D$  είναι η δόση της ακτινοβολίας, και  $\alpha$  και  $\beta$  είναι παράμετροι που χαρακτηρίζουν την κυτταρική ευαισθησία στην ακτινοβολία. Η παράμετρος  $\alpha$  αντιπροσωπεύει τις άμεσες θανατηφόρες βλάβες που προκαλούνται από την ακτινοβολία, ενώ η  $\beta$  σχετίζεται με τις βλάβες που προκαλούνται από την αλληλεπίδραση δύο βλαβερών συμβάντων. Το LQ μοντέλο χρησιμοποιείται για να βοηθήσει στην σχεδίαση των πρωτοκόλλων ακτινοθεραπείας. Μέσω αυτού, μπορούν να προβλεφθούν οι επιδράσεις της συνολικής δόσης και της κατανομής της σε πολλαπλά κλάσματα, κάτι που είναι κρίσιμο για την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της θεραπείας. Αν και το LQ μοντέλο είναι πολύ χρήσιμο, έχει και περιορισμούς, ειδικά σε πολύ υψηλές δόσεις ακτινοβολίας όπου η γραμμική προσέγγιση μπορεί να μην είναι ακριβής. Επίσης, μπορεί να μην λαμβάνει πλήρως υπόψη όλες τις βιολογικές επιπλοκές που μπορεί να προκύψουν από την ακτινοβολία. (46)

Η καμπύλη επιβίωσης των κυττάρων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως ο ρυθμός δόσης, η τιμή της LET (γραμμική ενέργεια μεταφοράς), η κλασματοποίηση της δόσης και η ποσότητα οξυγόνου. Όταν αυξάνεται ο ρυθμός δόσης, καταστρέφονται περισσότερα κύτταρα και η κλίση της καμπύλης επιβίωσης αυξάνεται. Οι υψηλότερες τιμές LET οδηγούν σε μεγαλύτερη καταστροφή κυττάρων και αυξάνουν την κλίση της καμπύλης. Η παρουσία οξυγόνου ενισχύει την καταστροφή των κυττάρων και κάνει την καμπύλη επιβίωσης πιο απότομη. Όταν η συνολική δόση κατανέμεται σε μικρότερες δόσεις (κλάσματα) που δίνονται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (συνήθως καθημερινά), δημιουργείται ένας "ώμος" στην καμπύλη επιβίωσης κάθε φορά που εφαρμόζεται ένα κλάσμα. Αυτό συμβαίνει γιατί τα κύτταρα έχουν χρόνο να επιδιορθώσουν τις μη θανατηφόρες βλάβες μεταξύ των δόσεων. Ως αποτέλεσμα, η συνολική ή "ισοδύναμη" καμπύλη κυτταρικής επιβίωσης γίνεται λιγότερο απότομη, δηλαδή με μικρότερη κλίση. (79)

**Τοπικό Μοντέλο Επιδράσεων (LEM):** Το μοντέλο τοπικής επίδρασης (LEM) υπολογίζει τη σχετική βιολογική αποτελεσματικότητα (RBE) της ακτινοβολίας, υποθέτοντας ότι η βιολογική επίδραση εξαρτάται από τη χωρική κατανομή της δόσης μέσα στον κυτταρικό πυρήνα. Βασίζεται στην έννοια της "τοπικής δόσης," δηλαδή της αναμενόμενης ενέργειας που εναποτίθεται σε οποιοδήποτε σημείο μέσα στον πυρήνα για ένα δεδομένο μοτίβο τροχιών

σωματιδίων, ως συνάρτηση της απόστασης από την τροχιά τους. Η βασική υπόθεση του LEM είναι ότι ίσες τοπικές δόσεις έχουν ίσες τοπικές βιολογικές επιδράσεις, ανεξάρτητα από την ποιότητα της ακτινοβολίας. Έτσι, η αποτελεσματικότητα των σωματιδίων υπολογίζεται με βάση τη μικροσκοπική κατανομή της τοπικής δόσης των ιόντων που διαδίδονται μέσα στον κυτταρικό πυρήνα, θεωρώντας ότι ο πυρήνας είναι ο ευαίσθητος στόχος για τις επιδράσεις της ακτινοβολίας. (80)

Το LEM συνδέει τις βιολογικές επιπτώσεις της ακτινοβολίας ιόντων με την απόκριση των κυττάρων στην ακτινοβολία φωτονίων, αξιοποιώντας τη μεγάλη βάση δεδομένων για τη συμβατική ακτινοβολία. Η βασική ιδέα είναι ότι η κατανομή της τοπικής δόσης από ιόντα είναι πολύ ανώμαλη με υψηλές αιχμές κοντά στις τροχιές τους, ενώ η κατανομή της δόσης από φωτόνια είναι πιο ομοιογενής. Για την ακτινοβολία φωτονίων, ο μέσος αριθμός θανατηφόρων βλαβών ακολουθεί την κατανομή Poisson και η πιθανότητα επιβίωσης των κυττάρων μπορεί να υπολογιστεί με έναν συγκεκριμένο τύπο. Για την ακτινοβολία ιόντων, η κατανομή των θανατηφόρων βλαβών είναι πολύ πιο ετερογενής λόγω της κατανομής της τοπικής δόσης γύρω από τις τροχιές των σωματιδίων. (80)

Το LEM εκτιμά το βιολογικό αποτέλεσμα της ακτινοβολίας βαρέων ιόντων με την ολοκλήρωση της τοπικής πυκνότητας βλαβών εντός του κυτταρικού πυρήνα. Η κύρια υπόθεση είναι ότι η τοπική βιολογική επίδραση καθορίζεται από την τοπική δόση και είναι ανεξάρτητη από το είδος της ακτινοβολίας. Χρησιμοποιεί τις αποκρίσεις στην ακτινοβολία φωτονίων για να προβλέψει τις βιολογικές επιδράσεις της ακτινοβολίας ιόντων. Αυτό επιτρέπει την ακριβή πρόβλεψη της αντίδρασης των βιολογικών συστημάτων στην ακτινοβολία υψηλού LET, χωρίς να χρειάζεται να προσδιοριστεί η ακριβής μοριακή φύση των θανατηφόρων γεγονότων. (81)

Με απλά λόγια, το LEM αξιοποιεί την κατανομή της τοπικής δόσης για να υπολογίσει τη βιολογική αποτελεσματικότητα της ακτινοβολίας, συνδέοντας τα δεδομένα από την ακτινοβολία φωτονίων με την ακτινοβολία ιόντων, προκειμένου να προβλέψει με ακρίβεια την επίδραση της ακτινοβολίας σε κυτταρικό επίπεδο.

**Μικροδοσιμετρικό Κινητικό Μοντέλο (MKM):** Στο Μοντέλο Τομέων και Κινητικής (MKM), ο κυτταρικός πυρήνας που εκτίθεται σε ιοντίζουσα ακτινοβολία χωρίζεται σε πολλούς μικρούς τομείς. Κάθε τομέας συμπεριφέρεται σαν να ήταν ένα ομοιογενές μικροσκοπικό δοχείο, όπου δημιουργούνται πρωταρχικές βλάβες στο DNA ανάλογα με τη δόση που απορροφά ο κάθε τομέας. Οι πρωταρχικές βλάβες διασπείρονται τυχαία μέσα στον τομέα,

χωρίς να αλληλεπιδρούν με βλάβες σε άλλους τομείς λόγω της "ημιδιαπερατής μεμβράνης" που θεωρείται ότι διαχωρίζει τους τομείς.

Στο MKM, υπάρχουν δύο τύποι πρωταρχικών βλαβών DNA:

Τύπος I: Αυτές οι βλάβες είναι πάντα θανατηφόρες και δεν μπορούν να επισκευαστούν.

Τύπος II: Αυτές οι βλάβες, πιθανόν διπλά θραύσματα της αλυσίδας του DNA (DSB), μπορεί να είναι δυνητικά θανατηφόρες αλλά μπορούν επίσης να επιδιορθωθούν. (82)

Η πιθανότητα σχηματισμού θανάσιμης βλάβης εξαρτάται από τη διάμετρο των τομέων. Μικρότερες διαμέτροι σημαίνουν ότι οι βλάβες τύπου II έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να σχηματίσουν ζεύγη που είναι θανατηφόρα, ενώ μεγαλύτερες διαμέτροι μειώνουν αυτή την πιθανότητα. Η ακτινοβολία δημιουργεί βλάβες ανάλογα με τη μικροσκοπική δόση που απορροφά κάθε τομέας. Βλάβες τύπου II μπορούν να γίνουν θανατηφόρες μέσω διαφόρων διαδικασιών, όπως συνδυασμός με άλλη βλάβη τύπου II, επιδιόρθωση ή παραμονή ως μη θανατηφόρες για κάποιο χρονικό διάστημα πριν γίνουν θανατηφόρες. Η πιο σημαντική βλάβη θεωρείται η διπλή θραύση του DNA (DSB), με πειραματικά δεδομένα που δείχνουν διαφορές ανάλογα με την ποιότητα της ακτινοβολίας. Η σταθερή παραγωγή βλαβών θεωρείται δεδομένη, αλλά η σχέση μεταξύ της ποιότητας της ακτινοβολίας και της παραγωγής βλαβών πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στο MKM. (82)

Οι κινητικές εξισώσεις που περιγράφουν αυτές τις διαδικασίες καταλήγουν σε μια σχέση όπου ο αριθμός των θανατηφόρων βλαβών σε έναν τομέα αυξάνεται γραμμικά και τετραγωνικά με τη δόση. Από αυτή τη σχέση, το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων μπορεί να υπολογιστεί με βάση τη μέση δόση σε κάθε τομέα, χρησιμοποιώντας στατιστικές αρχές.

Τα μοντέλα MKM και LEM είναι πιο λεπτομερή από το μοντέλο LQ και λαμβάνουν υπόψη τις ιδιότητες των σωματιδίων και την ποιότητα της ακτινοβολίας (LET). Υποθέτουν ότι η απόκριση κάθε μικροσκοπικού όγκου του πυρήνα είναι ανεξάρτητη από το είδος και το LET του ιόντος, και αποδίδουν τις διαφορές στη σχετική βιολογική αποτελεσματικότητα (RBE) στις διαφορετικές κατανομές εναπόθεσης ενέργειας στους τομείς. (83)

**BIANCA:** Το μοντέλο αυτό είναι σχεδιασμένο για να προβλέπει τόσο την επιβίωση των κυττάρων όσο και τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες μετά από ακτινοβολία. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες θεωρούνται ισχυρός δείκτης βλάβης στους φυσιολογικούς ιστούς. Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της βιολογικής απόκρισης σε ακτινοβολία, λαμβάνοντας υπόψη τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες που μπορούν να προκύψουν ως αποτέλεσμα της ακτινοβολίας. (84)

### 3.1.2. Προσομοιώσεις Monte Carlo (MC) για Βλάβες στο DNA

**MC Μέθοδοι:** Χρησιμοποιούν στατιστική επανεκτίμηση για την επίλυση πολύπλοκων συστημάτων με τυχαία γεγονότα. Οι προσομοιώσεις MC χρησιμοποιούνται για την κατανόηση της φυσικής κατανομής της ενέργειας που προκαλείται από την ακτινοβολία και την επίδρασή της στο βιολογικό ιστό. Η χρήση των προσομοιώσεων MC γίνεται για να καταγραφεί η επίδραση της ακτινοβολίας σε βιολογικά συστήματα, όπως το DNA, παρέχοντας στοιχεία για τις βιολογικές βλάβες και τις διαδικασίες αποκατάστασης. Η τεχνικές MC έχουν μεγάλη ακρίβεια, η οποία επιτρέπει την κατανόηση της κατανομής της ακτινοβολίας και των συνεπαγόμενων βλαβών σε μικροσκοπικό επίπεδο. (84)

Οι τεχνικές Monte Carlo εκμεταλλεύονται ομάδες τυχαίων αριθμών και τους υπολογιστές για να προσομοιώσουν σύνθετα συστήματα που δεν είναι εύκολο να προσεγγιστούν με αναλυτικό τρόπο. Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται σε επιτραπέζια παιχνίδια, πρόγνωση καιρού, ηλεκτρολογική και τηλεπικοινωνιακή μηχανική, κβαντική φυσική και υπολογιστική βιολογία. (85) Στη ιατρική φυσική, χρησιμοποιούνται για να προσομοιώσουν ένα εύρος ιατρικών εφαρμογών που εκμεταλλεύονται την ιοντίζουσα ακτινοβολία (IR), για σκοπούς απεικόνισης ή για εφαρμογές δοσιμετρίας σε μακρο- και νανοκλίμακα. (86)

**Προσομοιώσεις Μοντέλου Δομής Τροχιάς (MCTS):** Οι MCTS χρησιμοποιούν υπολογιστικούς κώδικες για να προσομοιώσουν την επαγωγή βλαβών στο DNA σε νανομετρική κλίμακα. Οι προσομοιώσεις αυτές λαμβάνουν πλήρως υπόψη τη στοχαστική φύση των φαινομένων της ακτινοβολίας χρησιμοποιώντας διατομές αλληλεπιδράσεων (cross sections) και προσομοιώνουν τόσο τις φυσικές αλληλεπιδράσεις που προκαλούν άμεσες βλάβες στο DNA, όσο και τις χημικές αλληλεπιδράσεις που προκαλούν έμμεσες βλάβες μέσω της παραγωγής και των αρχικών αντιδράσεων χημικών ειδών. (84)

Οι MCTS χρησιμοποιούνται για την προσομοίωση των τροχιών των σωματιδίων σε βιολογικά υλικά, προσφέροντας ακριβείς εκτιμήσεις των παραμέτρων των επιπτώσεων της ακτινοβολίας στη ραδιοθεραπεία και την προστασία από την ακτινοβολία. Έτσι πολλές θεωρητικές μελέτες μαζί με τις MCTS προσομοιώσεις έχουν βοηθήσει στην κατανόηση των διαφόρων ποιοτήτων ακτινοβολίας, την ποσοτικοποίηση της δυναμικής των συσσωρευμένων βλαβών στο DNA και τις προσπάθειες για την παραγωγή πειραμάτων καθοδηγούμενων από μοντέλα. (84)

Οι κώδικες δομής τροχιάς είναι χρήσιμα εργαλεία για την προσομοίωση των τροχιών των σωματιδίων σε βιολογική ύλη, παρέχοντας μεγάλη εμπειρία στην εκτίμηση των παραμέτρων

των επιπτώσεων της ακτινοβολίας σε σχέση με τη ραδιοθεραπεία και την προστασία από την ακτινοβολία. (84)

### **3.1.3. Ανίχνευση Πολύπλοκων Βλαβών στο DNA**

Οι πρώτες τεχνικές ανίχνευσης βλαβών στο DNA βασίζονταν στην ηλεκτροφόρηση και την κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιώντας το συλλογικό σήμα από χιλιάδες μόρια και μπορούσαν να διεξαχθούν *in vitro*, αλλά όχι *in situ*. Σήμερα χρησιμοποιούνται πιο σύγχρονες τεχνικές ανίχνευσης όπως η Κυτταρογενετική και ο *in situ* Ανοσοφθορισμός. Η κυτταρογενετική είναι η μελέτη των χρωμοσωμάτων και των ανωμαλιών τους, χρησιμοποιώντας μικροσκοπικές τεχνικές για την ανίχνευση και ανάλυση των χρωμοσωμικών βλαβών. Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση βλαβών στο DNA, όπως διαγραφές, μεταθέσεις και άλλες χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Ο *in situ* ανοσοφθορισμός είναι μια τεχνική που χρησιμοποιεί φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών ή δομών στο σημείο που βρίσκονται στα κύτταρα. Μία από τις κύριες τεχνικές *in situ* ανοσοφθορισμού είναι η ανίχνευση των γ-*H2AX* foci, όπου τα αντισώματα στοχεύουν τη φωσφορυλιωμένη ιστόνη *H2AX*, που είναι δείκτης για την παρουσία διπλών θραυσμάτων στο DNA. Τέλος, η ανίχνευση του συν-εντοπισμού (colocalization) σημαίνει την παρουσία δύο ή περισσότερων φθοροφόρων στην ίδια φυσική θέση, υποδηλώνοντας πιθανή βιολογική αλληλεπίδραση μεταξύ των μακρομορίων. Για να γίνει οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων στην ανοσοφθορισμομετρία, χρησιμοποιούνται αντισώματα κατά των ενζύμων επιδιόρθωσης DNA. Συγκεκριμένα ο *in situ* Ανοσοφθορισμός χρησιμοποιεί αντισώματα συνδεδεμένα με φθοροφόρα για την ανίχνευση βλαβών DNA σε κατεστραμμένα κύτταρα. (84)

### **3.1.4. Αρχές μέτρησης των συγκεντρωμένων βλαβών στο DNA**

**Προσέγγιση με Χρήση Ενζύμων Επιδιόρθωσης DNA:** Μια πρωτοποριακή μέθοδος που αναπτύχθηκε από τον Sutherland και τους συνεργάτες του (87) χρησιμοποιεί ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA (όπως γλυκοζυλάσες DNA και ενδονουκλεάσες AP) για την ανίχνευση συγκεντρωμένων βλαβών. Τα ένζυμα αυτά λειτουργούν *in vitro*, δηλαδή σε απομονωμένο DNA που φέρει συγκεντρωμένες βλάβες. Όταν το ένζυμο ανιχνεύσει τη βλάβη, την απομακρύνει και διασπά την αλυσίδα DNA, δημιουργώντας μονόκλωνες ή δίκλωνες θραύσεις ανάλογα με τη φύση της βλάβης. Η δημιουργία επιπλέον δίκλωνων θραύσεων από τα ένζυμα

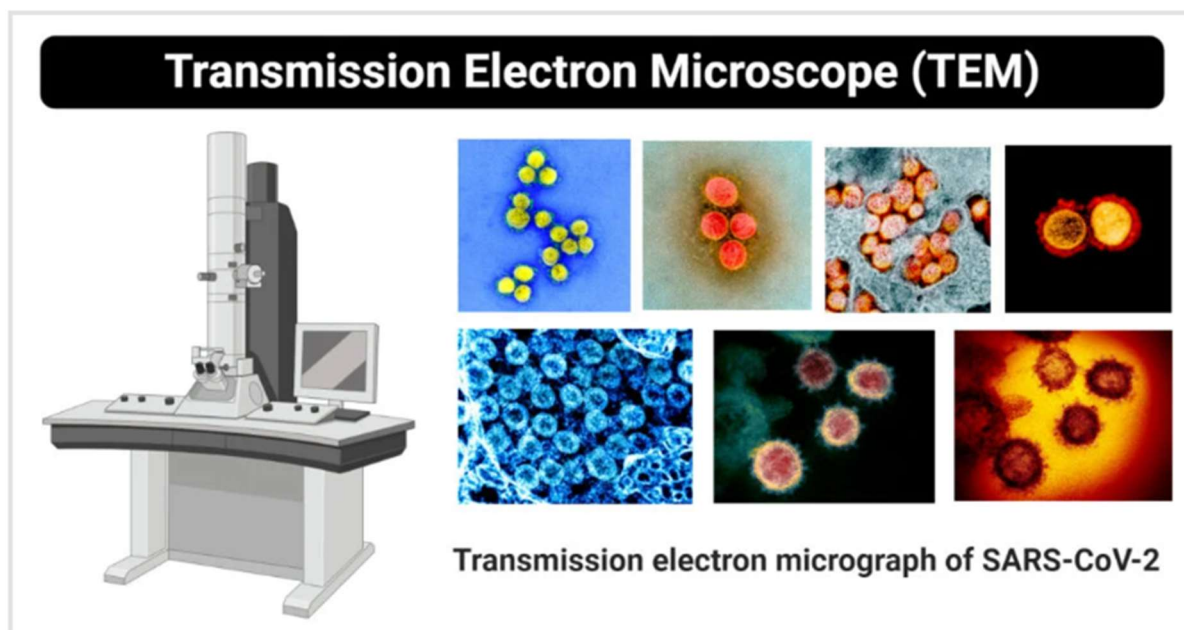
επιδιόρθωσης μπορεί να μετρηθεί με ηλεκτροφόρηση πηκτής σε ουδέτερο πεδίο ή παλμικό πεδίο (PFGE), ακολουθώντας την ανάλυση μήκους των DNA θραυσμάτων (NALA). (88)

**Ηλεκτροφόρηση σε Ουδέτερο Άγαρ:** Η ανίχνευση συγκεντρωμένων βλαβών DNA χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε ουδέτερο άγαρ περιλαμβάνει την εφαρμογή ενζύμων επιδιόρθωσης στο απομονωμένο DNA. Τα ένζυμα προκαλούν θραύσεις στις θέσεις των βλαβών, οι οποίες στη συνέχεια ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση πηκτής. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από DNA με και χωρίς θεραπεία με ένζυμα, μπορεί να γίνει υπολογισμός των συγκεντρωμένων βλαβών. (88)

Στην περίπτωση που οι απουσίες βάσεων είναι σε πολύ κοντινά νουκλεοτίδια (1-5pb), ακολουθείται διαφορετική προσέγγιση από τις παραπάνω, γιατί οι ενδονουκλεάσες AP δεν μπορούν να τις ανιχνεύσουν. Τότε γίνεται χρήση πολυαμινών όπως η πουτρεσκίνη, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση πολύ κοντινών απουσιών βάσεων (AP sites). Στη συνέχεια πραγματοποιείται μια τροποποιημένη έκδοση της μεθόδου Ηλεκτροφόρηση Μικρογέλης (Comet Assay) για την ανίχνευση συγκεντρωμένων βλαβών DNA σε μονοκύτταρα. Η μέθοδος αυτή έχει ευρεία εφαρμογή για την ανίχνευση χαμηλών επιπέδων βλαβών DNA, συμπεριλαμβανομένων των μονόκλωνων και δίκλωνων θραύσεων και των οξειδωμένων βάσεων. (88)

### 3.1.4. Μικροσκοπία και Ανάλυση Εικόνας

**Μικροσκοπία TEM (Transmission Electron Microscopy):** Η TEM προσφέρει υψηλή διακριτική ικανότητα που φτάνει μερικά νανόμετρα. Επιτρέπει την παρατήρηση λεπτομερειών σε πολύ μικρή κλίμακα, παρέχοντας σαφείς εικόνες των εσωτερικών δομών των κυττάρων. Για να πραγματοποιηθεί απαιτείται ύπαρξη υψηλού κενού. (εικόνα 2.4) Τα δείγματα πρέπει να είναι πολύ λεπτά, μικρότερα από το πάχος ενός κυττάρου, γεγονός που καθιστά αδύνατη την παρατήρηση ζωντανών κυττάρων και απαιτείται τεχνική εξειδίκευση για την προετοιμασία των δειγμάτων. Επίσης το κόστος της συσκευής είναι πολύ υψηλό. (84)



Εικόνα 3.8. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπικού και παρασκευασμάτων SARS-CoV-2. Image Credit: NIAID/NIH, a figure created with biorender.com

**Μικροσκοπία Φθορισμού:** Η μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιείται για την παρατήρηση τόσο σταθερών όσο και ζωντανών κυττάρων, με τη βοήθεια φθορίζοντων χρωστικών που επισημαίνουν συγκεκριμένες δομές ή πρωτεΐνες στα κύτταρα. Υπάρχουν διάφοροι τύποι Μικροσκοπίας Φθορισμού, όπως:

1. Συμβατική (Widefield) Μικροσκοπία Φθορισμού (WFM): Χαρακτηρίζεται από τον ταυτόχρονο φωτισμό ολόκληρου του δείγματος.
2. Συνοπτική Μικροσκοπία (Confocal Microscopy, CFM): Χρησιμοποιεί λέιζερ για τον φωτισμό του δείγματος και επιτρέπει την οπτική τομή του δείγματος.
3. Συνοπτική Μικροσκοπία με Περιστρεφόμενο Δίσκο (Spinning Disk Confocal Microscopy): Χρησιμοποιεί περισσότερες από μία οπές για την επιτάχυνση της διαδικασίας απεικόνισης.
4. Μικροσκοπία Υπερ-Ανάλυσης (Super-Resolution Microscopy, SRM): Ξεπερνά το όριο διάθλασης χρησιμοποιώντας φακούς με αρνητικό δείκτη διάθλασης. (84)

Πίνακας 3.7. Τεχνικές και μοντέλα

Τεχνική/Μοντέλο	Περιγραφή
Γραμμικό Τετραγωνικό Μοντέλο (LQ)	Χρησιμοποιείται για την ερμηνεία της επιβίωσης των κυττάρων μετά από ακτινοβολία. Περιγράφει την επιβίωση των κυττάρων βάσει της εξίσωσης $S=e^{-(\alpha D+\beta D^2)}$ .

Προσομοιώσεις Monte Carlo (MC)	Χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των βλαβών στο DNA. Βοηθούν στην κατανόηση των επιπτώσεων της ακτινοβολίας στο γενετικό υλικό.
Ανίχνευση Πολύπλοκων Βλαβών στο DNA	Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των πολύπλοκων βλαβών στο DNA που προκαλούνται από ακτινοβολία.
Αρχές μέτρησης των συγκεντρωμένων βλαβών στο DNA	Αρχές που αφορούν τη μέτρηση των συγκεντρωμένων βλαβών στο DNA, βοηθώντας στην εκτίμηση της βλάβης που προκαλείται από την ακτινοβολία.
Μικροσκοπία και Ανάλυση Εικόνας	Χρησιμοποιείται για την ανάλυση και την καταγραφή εικόνων βλαβών στο DNA μέσω μικροσκοπικών τεχνικών.

### 3.2. Μεταλλάξεις που προκαλούνται από ιοντίζουσα ακτινοβολία

Η ακτινοβολία μπορεί να αλλάξει το DNA ενός κυττάρου. Οι μεταλλάξεις σε σωματικά κύτταρα που προκαλούν ζημιά ή θάνατο επηρεάζουν μόνο στον οργανισμό όπου εμφανίζεται η μετάλλαξη και επομένως ονομάζονται σωματικές ή μη κληρονομικές επιδράσεις. Ο καρκίνος είναι η πιο σημαντική μακροπρόθεσμη σωματική επίδραση. Αντίθετα, οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στα γενετικά κύτταρα (σπερματοζωάρια και ωάρια) μπορούν να μεταδοθούν σε μελλοντικές γενιές και έτσι ονομάζονται γενετικές ή κληρονομικές επιδράσεις. Οι γενετικές επιδράσεις μπορεί να μην εμφανιστούν μέχρι πολλές γενιές αργότερα. (27)

Υπάρχουν πολλές δυσκολίες στη μέτρηση των γενετικών επιπτώσεων της έκθεσης του ανθρώπινου πληθυσμού στην ακτινοβολία και άλλους μεταλλαξογόνους παράγοντες. Πάνω από 20 χρόνια μετά την πρώτη αντιμετώπιση των ζητημάτων ακτινοβολίας από την Επιτροπή BEAR, υπάρχει ακόμα αβεβαιότητα και διαμάχη. Τα γενετικά αποτελέσματα ακτινοβολίας εκφράζονται όχι στα άτομα που έχουν εκτεθεί, αλλά στους απογόνους τους, είτε άμεσους είτε μακροπρόθεσμους. Απαιτούνται μακροχρόνιες επιδημιολογικές μελέτες με μακροπρόθεσμη παρακολούθηση για να συγκεντρωθούν επαρκή δεδομένα για στατιστική ανάλυση. Επιπλέον, η αναλογία των ατόμων στον πληθυσμό που εκτίθενται σε ακτινοβολία διαφέρει ανάλογα με την ηλικία και το φύλο, και οι πιθανότητες να αποκτήσουν παιδιά επίσης διαφέρουν αναλόγως. Αυτές οι μεταβλητές είναι κρίσιμες για την εκτίμηση κινδύνου και πρέπει να ληφθούν υπόψη σε έρευνες για τις γενετικές επιπτώσεις της ακτινοβολίας. (89)

Οι γενετικές επιδράσεις της ακτινοβολίας πρωτοαποδείχθηκαν σε φρουτόμυγες τη δεκαετία του 1920. Η γενετική μετάλλαξη λόγω ακτινοβολίας δεν παράγει τα ορατά τέρατα της επιστημονικής φαντασίας. Όπως οι καρκίνοι, έτσι και οι γενετικές επιδράσεις της ακτινοβολίας

είναι αδύνατο να διακριθούν από μεταλλάξεις λόγω άλλων αιτιών. Σήμερα, τουλάχιστον 1.300 ασθένειες είναι γνωστό ότι προκαλούνται από μετάλλαξη. Κατά την περίοδο που μελετήθηκαν οι ασθένειες αυτές από την Συμβουλευτική Επιτροπή, υπήρχε σημαντική συζήτηση στην επιστημονική κοινότητα για την έκταση και τις συνέπειες των μεταλλάξεων που προκλήθηκαν από ακτινοβολία. (90)

Σε αντίθεση με τις εκτιμήσεις του καρκινικού κινδύνου, οι οποίες βασίζονται εν μέρει σε μελέτες ανθρώπινων πληθυσμών, οι εκτιμήσεις του κληρονομικού κινδύνου βασίζονται κυρίως σε ζωικές μελέτες και μελέτες Ιαπώνων επιζώντων των ατομικών βομβαρδισμών. Ο κίνδυνος γενετικής μετάλλαξης εκφράζεται σε όρους της διπλασιαστικής δόσης, δηλαδή η ποσότητα ακτινοβολίας που θα προκαλούσε επιπλέον μεταλλάξεις ίσες σε αριθμό με εκείνες που συμβαίνουν φυσικά από όλες τις αιτίες, διπλασιάζοντας έτσι τον φυσικά εμφανιζόμενο ρυθμό μετάλλαξης. (90)

Γενικά πιστεύεται ότι οι ρυθμοί μετάλλαξης εξαρτώνται γραμμικά από τη δόση και δεν υπάρχει κατώφλι κάτω από το οποίο οι ρυθμοί μετάλλαξης δεν θα αυξάνονταν. Οι τυχαίες μεταλλάξεις (άσχετες με την ακτινοβολία) συμβαίνουν φυσικά με ρυθμό περίπου 1/10.000 έως 1/1.000.000 κυτταρικών διαιρέσεων ανά γονίδιο, με μεγάλη διακύμανση από το ένα γονίδιο σε άλλο. (90)

Έχουν γίνει προσπάθειες να εκτιμηθεί η συνεισφορά της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στους ανθρώπινους ρυθμούς μετάλλαξης μελετώντας τους απογόνους των Ιαπώνων επιζώντων από ατομικές βόμβες τόσο εκτεθειμένων όσο και μη εκτεθειμένων. Αυτές οι εκτιμήσεις βασίζονται σε συγκρίσεις του ρυθμού διαφόρων συγγενών ελαττωμάτων και καρκίνου μεταξύ εκτεθειμένων και μη εκτεθειμένων επιζώντων, καθώς και σε άμεση καταμέτρηση μεταλλάξεων σε έναν μικρό αριθμό γονιδίων. Για όλα αυτά τα σημεία, δεν έχει παρατηρηθεί καμία υπερβολή μεταξύ των απογόνων των εκτεθειμένων επιζώντων. (90)

Δεδομένης αυτής της έλλειψης άμεσων αποδείξεων για οποιαδήποτε αύξηση στις ανθρώπινες κληρονομικές (γενετικές) επιδράσεις που προκύπτουν από την έκθεση σε ακτινοβολία, οι εκτιμήσεις των γενετικών κινδύνων στους ανθρώπους έχουν συγκριθεί με πειραματικά δεδομένα που έχουν ληφθεί με εργαστηριακά ζώα. Ωστόσο, οι εκτιμήσεις των ανθρώπινων γενετικών κινδύνων διαφέρουν σημαντικά από τα δεδομένα των ζώων. Για παράδειγμα, οι φρουτόμυγες έχουν πολύ μεγάλα χρωμοσώματα που φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στην ακτινοβολία. Οι άνθρωποι μπορεί να είναι λιγότερο ευάλωτοι από ό,τι πιστευόταν παλαιότερα. Έχουν υπολογιστεί στατιστικά κατώτερα όρια για τη διπλασιαστική δόση που είναι συμβατά με τα παρατηρούμενα ανθρώπινα δεδομένα. Με βάση την αδυναμία μας να αποδείξουμε ένα

αποτέλεσμα στους ανθρώπους, το κατώτερο όριο για τη γενετική διπλασιαστική δόση θεωρείται ότι είναι κάτω από 100 rem. (90)

Μελέτη σε ποντίκια υπό την ηγεσία του Δρ. Yuri E. Dubrova από το Πανεπιστήμιο του Leicester, Ηνωμένο Βασίλειο, έδειξε ότι γενετικές αλλαγές λόγω έκθεσης σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας, όπως οι ακτίνες X, μπορεί να κληρονομηθούν από μελλοντικές γενιές. Οι απόγονοι των εκτεθειμένων ποντικών εμφάνισαν υψηλότερο ρυθμό μεταλλάξεων συγκριτικά με αυτούς που δεν είχαν εκτεθεί. Οι αλλαγές ήταν διακριτικές και εντοπίζονταν σε τμήματα του DNA που δεν είχαν σημαντικές λειτουργίες, αλλά η δυνατότητα κληρονομικότητας των γενετικών αλλαγών αποτελεί αιτία ανησυχίας, ειδικά σε σχέση με την καρκινογένεση και άλλες γενετικές νόσους. Σύμφωνα με τη μελέτη, ακόμα και αν οι γενετικές αλλαγές δεν εντοπίζονται άμεσα, οι επιπτώσεις τους μπορεί να είναι μακροχρόνιες και να επηρεάσουν τις μελλοντικές γενιές. Η ανακάλυψη των γενετικών αλλαγών απαιτεί προσεκτική εξέταση και μπορεί να είναι περίπλοκη λόγω των μεγάλων διαφορών στο γενετικό υλικό ανάμεσα στα άτομα. (91)

Η Επιτροπή BEIR I (NRC72) ανέπτυξε πέντε γενικές αρχές για την εκτίμηση του κινδύνου. Οι επόμενες επιτροπές, έχουν γενικά ακολουθήσει αυτές τις οδηγίες όπου είναι δυνατόν, όπως φαίνεται παρακάτω:

1. Χρησιμοποιήστε σχετικά δεδομένα από όλες τις πηγές, αλλά δώστε έμφαση στα δεδομένα από ανθρώπινες μελέτες όπου είναι εφικτό. Γενικά, όταν υπάρχουν δεδομένα με συγκρίσιμη ακρίβεια, δώστε μεγαλύτερη έμφαση σε οργανισμούς που είναι πιο κοντά στον άνθρωπο.
2. Χρησιμοποιήστε δεδομένα από τις χαμηλότερες δόσεις και ρυθμούς δόσης για τις οποίες υπάρχουν αξιόπιστα δεδομένα, καθώς αυτά είναι πιο σχετικά με τις συνήθεις συνθήκες της ανθρώπινης έκθεσης.
3. Χρησιμοποιήστε απλή γραμμική καμπύλη μεταξύ των χαμηλότερων αξιόπιστων δεδομένων δόσης και της αυτόματης ή μηδενικής δόσης ρυθμού. Για να ληφθεί οποιοδήποτε είδους ακρίβεια από πειράματα εύκολου μεγέθους, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν δόσεις πολύ υψηλότερες από αυτές που αναμένονται για τον ανθρώπινο πληθυσμό. Κάποια μαθηματική υπόθεση είναι απαραίτητη, και το γραμμικό μοντέλο, αν και όχι πάντα σωστό, είναι πιθανό να κάνει λάθη προς την ασφαλή κατεύθυνση.
4. Εάν τα στάδια κυτταρικού κύκλου διαφέρουν στην ευαισθησία, ζύγισε τα δεδομένα σύμφωνα με τη διάρκεια του σταδίου.

5. Εάν τα φύλα διαφέρουν στην ευαισθησία, χρησιμοποίησε το μη ζυγισμένο μέσο όρο των δεδομένων για τα δύο φύλα. (89)

Η επίτευξη σκοπούμενης έκθεσης ανθρώπων σε ακτινοβολία χωρίς διαγνωστική ή θεραπευτική δικαιολογία είναι απαράδεκτη, και γι' αυτό τον λόγο οι περισσότερες γενετικές μελέτες πρέπει να διεξαχθούν σε πειραματικούς οργανισμούς, ιδιαίτερα στα ποντίκια. Τέτοιες μελέτες θέτουν πολλά επιπλέον προβλήματα, συμπεριλαμβανομένης της εκτίμησης των αποτελεσμάτων που έχουν ληφθεί σε πειραματικές συνθήκες που αφορούν την έκθεση του πληθυσμού, όπως ο ρυθμός δόσης, η κλασμάτωση και άλλες μεταβλητές· καθώς και την εκτίμηση από τον πειραματικό οργανισμό όπως το ποντίκι, όπου τα αποτελέσματα για τις επιπτώσεις της ακτινοβολίας μπορούν να εκτιμηθούν με κάποια εμπιστοσύνη, στους ανθρώπους, επειδή οι οργανισμοί διαφέρουν στην ευαισθησία τους στην ακτινοβολία.

Το UNSCEAR (UN86) έχει περιλάβει τρεις βασικές υποθέσεις που είναι απαραίτητες για την εξαγωγή δεδομένων από ποντίκια και άλλα κατάλληλα θηλαστικά σε ανθρώπους:

1. Η ποσότητα γενετικών βλαβών που προκαλείται από ένα συγκεκριμένο τύπο ακτινοβολίας σε ένα συγκεκριμένο σύνολο συνθηκών είναι η ίδια στα γεννητικά κύτταρα των ανθρώπων και σε αυτά των ειδών που χρησιμοποιούνται ως μοντέλο.
2. Διάφοροι βιολογικοί παράγοντες (π.χ. φύλο, στάδιο γεννητικών κυττάρων, ηλικία, κλπ.) και φυσικοί παράγοντες (π.χ. ποιότητα ακτινοβολίας, ρυθμός δόσης, κλπ.) επηρεάζουν το μέγεθος της βλάβης με παρόμοιο τρόπο και σε παρόμοιο βαθμό στα πειραματικά είδη από τα οποία γίνονται οι εκτιμήσεις και στους ανθρώπους.
3. Σε χαμηλές δόσεις και σε χαμηλούς ρυθμούς δόσης ακτινοβολίας χαμηλής ικανότητας μεταφοράς ενέργειας υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ της δόσης και της συχνότητας των γενετικών επιπτώσεων που μελετώνται. (92)

Οι άμεσες μελέτες των γενετικών επιπτώσεων της ακτινοβολικής έκθεσης σε ανθρώπινες πληθυσμιακές ομάδες έχουν διεξαχθεί στα παιδιά των Ιαπώνων πληθυσμών στην Χιροσίμα και το Ναγκασάκι που εκτίθηκαν στις ατομικές βομβιστικές επιθέσεις τον Αύγουστο του 1945. Τα αποτελέσματα αυτών των προσεκτικών και πολύ εκτεταμένων μελετών, όταν λαμβάνονται κατ' επιφάνεια, υποδηλώνουν ότι οι άνθρωποι μπορεί να είναι κάπως λιγότερο ευαίσθητοι στην ακτινοβολία σε σχέση με τα ποντίκια. (89)

Η Επιτροπή BEIR I (NRC72) χρησιμοποίησε δύο μεθόδους για την εκτίμηση των γενετικών επιπτώσεων. Μια μέθοδος βασίστηκε σε άμεσες εκτιμήσεις και χρησιμοποιήθηκε όποτε ήταν δυνατόν, για παράδειγμα σε χρωμοσωμικές αναδιατάξεις. Η άλλη μέθοδος ήταν έμμεση και

χρησιμοποιήθηκε για περιπτώσεις όπως η γενετική μετάλλαξη. Η έμμεση μέθοδος απαιτούσε εκτιμήσεις του ρυθμού μετάλλαξης, της επίπτωσης γενετικών ασθενειών στον ανθρώπινο πληθυσμό και του βαθμού στον οποίο η επίπτωση αυτή εξαρτάται από επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις, προκειμένου να συμπεράνει την αυξημένη πρόκληση γενετικών ασθενειών που οφείλονται στην έκθεση στην ακτινοβολία. Και οι άμεσες και οι μακροπρόθεσμες επιπτώσεις προσδιορίστηκαν είτε από τις άμεσες είτε από τις έμμεσες εκτιμήσεις των προκαλούμενων μεταλλάξεων, λαμβάνοντας υπόψη τις θεωρητικές τιμές εξάλειψης μεταλλάξεων για να προβλέψουν τον λόγο της νεοπλαστικής γενετικής ζημιάς σε σχέση με αυτήν που μεταδίδεται από προηγούμενες γενιές. Η Επιτροπή BEIR III (NRC80) επανεξέτασε και ενημέρωσε την έκθεση BEIR I (NRC72). Νέες εκτιμήσεις προκάλεσαν μερικές αλλαγές στις προηγούμενες μελέτες, και προστέθηκαν ορισμένες νέες μέθοδοι προσδιορισμού μεταλλάξεων. (89)

### **3.2.1. Επιπτώσεις ιοντίζουσας ακτινοβολίας στο DNA**

Στις ραδιοβιολογικές μελέτες, το DNA έχει αναδειχθεί ως κύριος στόχος για τις βιολογικές επιδράσεις της ακτινοβολίας. Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι η ακτινοβολία προκαλεί μια ευρεία γκάμα βλαβών στο DNA, που περιλαμβάνουν βλάβες στις βάσεις των νουκλεοτιδίων, αλλά και θραύσεις στον έναν κλώνο του DNA (SSB) ή και στους δύο κλώνους (DSB). Οι βλάβες στο DNA από ακτινοβολία είναι θεμελιώδεις για την πρόκληση κυτταρικού θανάτου, την διαφοροποίηση κυττάρων και την καρκινογένεση μέσω της επαγωγής γονιδιακών μεταλλάξεων και χρωμοσωμικών ανωμαλιών. (93)

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία επηρεάζει την εσωκυττάρια μετάδοση σημάτων στα κύτταρα προκαλώντας επιπτώσεις στη λειτουργία και την ανάπτυξή τους. Αυτή η επίδραση προκαλείται από τον διαφορετικό τρόπο που η ιοντίζουσα ακτινοβολία δρα στα μόρια και τις διαδικασίες εντός των κυττάρων. (43)

*Επίδραση της LDIR στην αντίσταση των κυττάρων στην HDIR:* Η χαμηλή δόση ιοντίζουσας ακτινοβολίας (LDIR) μπορεί να ενισχύσει την αντίσταση των κυττάρων στην υψηλή δόση ιοντίζουσας ακτινοβολίας (HDIR), μειώνοντας έτσι τις επιπτώσεις στη χρωματική παραμόρφωση και τη βλάβη του DNA. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται "προσαρμοστική αντίδραση" και συμβάλλει στη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας και λειτουργίας. (43)

*Μηχανισμός διασταυρούμενου σήματος (Signal Transduction):* Η LDIR επηρεάζει τη μετάδοση των σημάτων στα κύτταρα, ενεργοποιώντας τη φωσφορυλίωση και μεθυλίωση πρωτεϊνών μετάδοσης σημάτων εντός και εκτός του κυττάρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση

της μεταγραφής και έκφρασης γονιδίων, καθώς και των δομικών και λειτουργικών αλλαγών στα κύτταρα που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση τους. (43)

*Δράση σηματοδοτών μοριακών διαδρόμων:* Η επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στους σηματοδότες μοριακών διαδρόμων όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες C (PKC), η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) και οι υποδοχείς τυροσίνης -κινάσης (RTK) επηρεάζει την πορεία της ακτινοβολίας στην ενεργοποίηση διαφόρων μοριακών μονοπατιών. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού και στην επιβίωση των κυττάρων, καθώς και στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου. (43)

Συνολικά, η επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας στη σήμανση εντός των κυττάρων και την εκτέλεση διαδικασιών μετάδοσης σημάτων είναι πολύπλοκη και εξαρτάται από τον τύπο, τη δόση και τον ρυθμό της ακτινοβολίας, καθώς και από το είδος του κυττάρου και το περιβάλλον. (43)

Οι βάσεις DNA που βλάπτονται από την ιοντίζουσα ακτινοβολία έχουν μελετηθεί εκτενώς *in vitro* μέσω της ακτινοβόλησης ελεύθερων βάσεων, νουκλεοσιδίων, ολιγονουκλεοτιδίων ή DNA σε στερεή κατάσταση ή σε υδατικά διαλύματα. Παρόλο που ορισμένοι τύποι βλαβών των βάσεων του DNA όπως το 8-υδροξυδεοξυγουανωσίνη έχουν σημαντική βιολογική σημασία σε κάποιες μελέτες, τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι αυτές οι μεμονωμένες βλάβες στις βάσεις πιθανώς παίζουν δευτερεύοντα ρόλο στην πρόκληση μεταλλάξεων. Οι βλάβες στις βάσεις μπορούν να επιδιορθωθούν μέσω επιδιορθωτικών μηχανισμών. (94) Επίσης οι μελέτες για τις βλάβες ακτινοβολίας σε επιμέρους σημεία του DNA υποδεικνύουν ότι οι SSB δεν είναι επίσης σημαντικές σε θηλαστικά κύτταρα. Μία SSB προκαλείται από την αντίδραση οποιουδήποτε από τα υδρογόνα της δεοξυριβόζης. Στην παρουσία οξυγόνου, η ακτινοβολία θα αυξήσει την παραγωγή των αλκαλικά ευάλωτων σημείων. Παρόλα αυτά οι περισσότερες SSB που προκαλούνται από ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορούν να επιδιορθωθούν μέσω της επανασύνδεσης του κλώνου. (94)

Αντίθετα, οι DSB που προκαλούνται από ιοντίζουσα ακτινοβολία ή άλλα καρκινογόνα χημικά θεωρούνται η πιο σημαντική βλάβη για τις μεταλλάξεις και την καρκινογένεση. Τα μη επιδιορθωμένα και λανθασμένα επιδιορθωμένα DSB αποτελούν σοβαρή απειλή για τη γενετική ακεραιότητα. Τα DSB οδηγούν σε χρωμοσωματικές ανωμαλίες, επηρεάζοντας ταυτόχρονα πολλά γονίδια που προκαλούν δυσλειτουργία και θάνατο στα κύτταρα. Σημειώνεται ότι τα DSB μπορούν επίσης να παραχθούν σε μια σειρά φυσικών διαδικασιών,

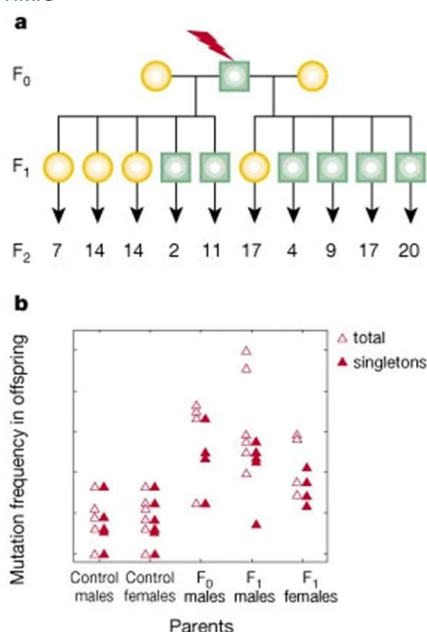
όπως οξειδωτικοί μεταβολισμοί, αναπαραγωγή, μείωση και παραγωγή ή διαμόρφωση αντισωμάτων. (95)

Η προστασία του γονιδιώματος απαιτεί τη δυνατότητα επιδιόρθωσης των DSB και την εξασφάλιση ότι η επιδιόρθωση γίνεται με επαρκή ακρίβεια. Υπάρχουν δύο κύριες διαδρομές επιδιόρθωσης DSB: ο ομόλογος ανασυνδυασμός (HR) και η μη ομόλογη ένωση τελών (NHEJ), οι οποίες είναι αντίστοιχα χωρίς σφάλματα και με πιθανά σφάλματα. Αυτές οι διαδρομές επιδιόρθωσης διατηρούνται από τη *Saccharomyces cerevisiae* μέχρι τα θηλαστικά κύτταρα, παρά τη διαφορετική τους σχετική σημασία. (96)

### **3.2.2. Επιπτώσεις της έκθεσης των γονέων σε ιοντίζουσα ακτινοβολία στην επόμενη γενιά**

Η έκθεση των γονέων σε ιοντίζουσα ακτινοβολία αυξάνει τη συχνότητα των γενετικών μεταλλάξεων που είναι ανιχνεύσιμες στην επόμενη γενιά. Η έκθεση των γονέων μπορεί επίσης να αυξήσει το ρυθμό μετάλλαξης στα σωματικά κύτταρα και να προκαλέσει προδιάθεση για καρκίνο στα παιδιά, υποδηλώνοντας ότι θα μπορούσε να υπάρχει έμμεση επίδραση της ακτινοβολίας στη σταθερότητα του γενετικού υλικού των σωματικών κυττάρων που μεταδίδεται μέσω της γενετικής γραμμής των ακτινοβολημένων γονέων. Αυτός ο έμμεσος αντίκτυπος επεκτείνεται και στη γενετική γραμμή των μη εκτιθέμενων απογόνων πρώτης γενιάς σε ποντίκια, όπως αποκαλύπτεται από την αυξημένη αστάθεια των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA στους απογόνους τους. (97)

Έχει παρατηρηθεί ότι η πατρική έκθεση σε νετρόνια συσχετίζεται με την αύξηση του ποσοστού μεταλλάξεων σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος, γνωστές ως επαναλαμβανόμενες απλές-αναδιπλοϊδωτές ενώσεις (ESTR), στη γραμμή των γεννήσεων των ποντικών της πρώτης γενιάς (F1). Αυτή η αύξηση στο ποσοστό μεταλλάξεων φαίνεται να οφείλεται σε μία συνδυασμένη επίδραση μεταξύ της αυξημένης μεταλλακτικής μωσαϊκότητας στη γενετική γραμμή των ποντικών της F1 γενιάς και της επίδρασης καθυστερούμενης γενετικής αστάθειας που προκαλείται από την ακτινοβολία σε ποντίκια που δεν έχουν εκτεθεί σε αυτήν, αλλά κατάγονται από γεννήσεις F1. (εικόνα 2.5) (97)



Εικόνα 3.9. Γενεαλογικό δέντρο και μεταλλάξεις ποντικών (62)

Οι επιστήμονες υποστηρίζουν ότι αυτή η επίδραση μπορεί να προέρχεται από μια επικείμενη σήμανση στο γονιδίωμα του F<sub>0</sub> πατέρα, η οποία μεταφέρεται μέσω ενός μόνο σπέρματος στους απογόνους της F<sub>1</sub>. Αυτή η σήμανση πιθανότατα είναι εξαρτημένη από το DNA και είναι πιθανό να συνδέεται με αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA, μιας διαδικασίας που μπορεί να επηρεάσει τον τρόπο λειτουργίας των συστημάτων επισκευής του. (97)

Το ενδιαφέρον για τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης επεκτείνεται στις επιπτώσεις της ακτινοβολίας στην ανθρώπινη υγεία, καθώς προτείνουν ότι η γενετική αστάθεια μπορεί να μεταφερθεί και σε μη εκτεθμένους απογόνους των ατόμων που εκτίθενται στην ακτινοβολία, προκαλώντας καθυστερημένους γενετικούς κινδύνους και προωθώντας τη μωσαϊκότητα στα γεννητικά κύτταρα. (97)

### 3.3. Μεταλλάξεις που προκαλούνται από τη μη ιοντίζουσα ακτινοβολία

#### 3.3.1. Υπεριώδεις ακτίνες (UV)

Το υπεριώδες φως UVB επηρεάζει άμεσα τη σύνδεση μεταξύ των νουκλεοτιδίων στο DNA. Οι δύο κύριες βλάβες του DNA που προκαλούνται από την έκθεση στο UVB είναι οι διμερείς πυριμιδίνες πυριμιδίνιο δίμερες (CPD) και τα φωτοπροϊόντα πυριμιδίνης πυριμιδίνιου 6-4 (6-4PPs), καθώς και οι ισομερείς του Dewar. (98)

Οι CPDs δημιουργούνται όταν δύο διπλανές πυριμιδίνες (θυμίνη - TT ή κυτοσίνη - CC) συνδέονται παράγοντας έναν κυκλικό δακτύλιο. Τα 6-4PPs προκύπτουν από έναν μοναδικό συνδετικό δεσμό που δημιουργείται μεταξύ της 5' άκρης της C4 των διπλανών πυριμιδίων. Αυτό οδηγεί στη δημιουργία ενός ασταθούς μεσολάβου οξετάνης ή αζετιδίνης ανάλογα με το εάν η πυριμιδίνη στην 3' άκρη είναι θυμίνη ή κυτοσίνη. (98)

Η σταδιακή αυτόματη αναδιάταξη αυτών των ενδιαμέσων δημιουργεί το 6-4PP. Οι διμερείς πυριμιδίνες προκαλούν μια καμπύλη στον σπονδυλωτό του DNA, διακόπτοντας τη μεταγραφή και τη σύνθεση πρωτεϊνών. Τα πρόσθετα πυριμιδίνης πυριμιδινίου 6-4 υπόκεινται σε ισομεροποίηση στη μορφή Dewar μετά από έκθεση σε άλλο φωτόνιο φωτός από την ακτινοβολία UVB ή UVA. Η πιο συνηθισμένη μετάλλαξη που προκαλείται από τη UVB είναι η μετάλλαξη C σε T. Οι διπλές μετατοπίσεις βάσεων (CC σε TT) συμβαίνουν επίσης, αν και λιγότερο συχνά. (98)

Η ακτινοβολία UVA (και επίσης η UVB) προκαλεί έμμεση ζημιά στο DNA μέσω της απορρόφησης φωτονίων από μη-DNA χρωμοφόρους. Αυτό δημιουργεί ενεργές ρίζες οξυγόνου όπως το μονοατομικό οξυγόνο ή το υπεροξείδιο του υδρογόνου που οξειδώνουν τις βάσεις του DNA προκαλώντας μεταλλάξεις. Η πιο συνηθισμένη μετάλλαξη είναι η μετάλλαξη G-T, όπου η γουανίνη οξειδώνεται σε 8-οξο-7,8-διυδρογουανίνη (8-οξοG), εμποδίζοντας τη συζεύξη της με την κυτοσίνη. Κατά τη διαδικασία αντιγραφής, το 8-οξοG συζεύγνεται με αδενίνη. Κατά τη σύνθεση της δεύτερης αλυσίδας, το 8-οξοG αντικαθίσταται από μια θυμίνη που οδηγεί σε μια μετάλλαξη G-T. (99)

### **3.3.2. Επιπτώσεις Ηλεκτρομαγνητικών πεδίων χαμηλών συχνοτήτων (ELF-EMFs)**

Υπάρχει μια πληθώρα πειραματικών ευρημάτων που συνδέουν την έκθεση πειραματοζώων ή κυττάρων in vivo ή in vitro σε ακραία χαμηλές συχνότητες (ELF) (3-3000 Hz) ή ραδιοσυχνότητες (RF)/μικροκυμάτων (300 kHz-300 GHz) ηλεκτρομαγνητικά πεδία (ΗΜΠ) με γενετική ζημιά/αλλαγές (ζημιά στο DNA, ζημιά στα χρωμοσώματα και μεταλλάξεις, ανάμεσα σε άλλα), θάνατο κυττάρων και συναφή επιπτώσεις. Τα περισσότερα ευρήματα αφορούν την έκθεση σε ΗΜΠ από ασύρματες επικοινωνίες (ΑΕΗΜΠ) [από κινητά τηλέφωνα/κεραίες, ασύρματα οικιακά τηλέφωνα (DECT: ψηφιακά βελτιωμένη τηλεπικοινωνία χωρίς καλώδια), διαδίκτυο (Wi-Fi: ασύρματη συνδεσιμότητα) ή ασύρματες συνδέσεις 'Bluetooth', μεταξύ άλλων], οι οποίες απαραίτητα συνδυάζουν συχνότητες φορέα RF/μικροκυμάτων με ELF παλμώσεις και διαμόρφωση, καθώς και υπερχαμηλές συχνότητες

(ULF) (0-3 Hz) τυχαίας μεταβλητότητας του σήματος. Σήμερα, σχεδόν όλα τα τεχνικά RF ΗΜΠ (όχι μόνο από ΑΕΗΜΠ, αλλά και από ραντάρ, ραδιοφωνικές και τηλεοπτικές κεραίες, μεταξύ άλλων) περιλαμβάνουν στοιχεία ELF/ULF στη μορφή απενεργοποίησης/ενεργοποίησης παλμών, διαμόρφωσης και μεταβλητότητας του σήματος. Αυτά συνήθως ονομάζονται απλώς 'RF', αλλά στην πραγματικότητα είναι μια συνδυασμένη μορφή RF και ELF/ULF. (100)

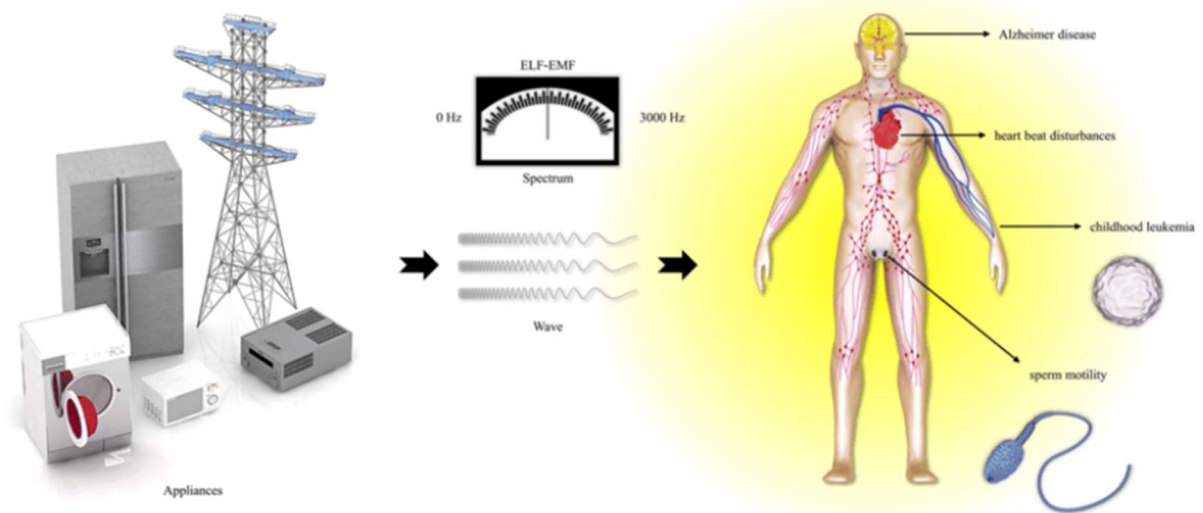
Πολλά από τα προαναφερθέντα ευρήματα αφορούν τη ζημιά στο DNA και το συνακόλουθο θάνατο κυττάρων στα αναπαραγωγικά κύτταρα διαφόρων ζώων, με αποτέλεσμα τη μείωση της αναπαραγωγής. Ειδικότερα, τα εφέ των παλμικών ΗΜΠ από ασύρματες επικοινωνίες στο DNA των κυττάρων αναπαραγωγής, όπως αναφέρονται από διάφορες μελέτες σε διάφορα ζώα, εμφανίζουν σημαντική ομοιότητα και εξηγούν άλλα ευρήματα που συνδέουν την έκθεση σε ΑΕΗΜΠ με την ανικανότητα εντόμων, πουλιών και θηλαστικών (συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων), ή με τη μείωση των πληθυσμών πουλιών και εντόμων (ιδιαίτερα των μελισσών) τα τελευταία 15 χρόνια. Μια σημαντική μείωση στην αναπαραγωγή (μείωση στην απόθεση αυγών ή θάνατος εμβρύων) μετά την έκθεση σε ακτινοβολία κινητής τηλεφωνίας (AKT) παρατηρήθηκε επίσης στις μύγες των φρούτων, τα αυγά κοτόπουλων, τα πουλιά και τις μέλισσες. Παρόμοια ευρήματα αναφέρονται για αμφίβια, ποντίκια, καθώς και για τα σπέρματα των ανθρώπων (μείωση στον αριθμό και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων). Αυτά τα ευρήματα, που είναι εξαιρετικά παρόμοια σε διαφορετικούς οργανισμούς από διαφορετικά ερευνητικά γκρουπ, εξηγούνται από τον παρατηρημένο θάνατο κυττάρων στα αναπαραγωγικά κύτταρα μετά τη ζημιά στο DNA. Η μείωση της αναπαραγωγής μετά από ζημιά του DNA και θάνατο των κυττάρων στα αναπαραγωγικά κύτταρα ή ο θάνατος του εμβρύου αναφέρεται επίσης ότι προκαλείται από εκθέσεις σε ELF ΗΜΠ. (101)

Παράλληλα, επιδημιολογικές/στατιστικές μελέτες συνδέουν όλο και περισσότερο την έκθεση σε ανθρωπογενή ΑΗΜΠ με προβλήματα υγείας, ζημιές στο γενετικό υλικό και καρκίνο στον ανθρώπινο πληθυσμό. Συγκεκριμένα, τα ΑΗΜΠ στο εύρος των χαμηλών συχνοτήτων από γραμμές ηλεκτρομαγνητικού πεδίου και μετασχηματιστές υψηλής τάσης συνδέονται με λευχαιμία παιδιών για ένταση μαγνητικού πεδίου κάτω από 2 mG (0.2  $\mu$ T) ή αποστάσεις από γραμμές ηλεκτρομαγνητικού πεδίου έως και 600 μέτρα, καθώς και ένταση ηλεκτρικού πεδίου κάτω από 10 V/m. Η έκθεση σε ΑΗΜΠ από διάφορα είδη κεραιών, πάντα περιλαμβάνοντας στοιχεία ELF, ιδίως από κεραίες κινητής τηλεφωνίας, συνδέεται με διάφορες μορφές καρκίνου. Μια σύνδεση μεταξύ της εμφάνισης καρκίνου του δέρματος (μελανώματος) σε ανθρώπους και της έκθεσης σε ραδιοφωνικές εκπομπές αναφέρθηκε από τους Hallberg και Johansson, (102)

ενώ δύο πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν σημαντικά αυξημένες γενετικές ζημιές στα λεμφοκύτταρα του αίματος περιφερειακών ατόμων που κατοικούν κοντά σε βάσεις κινητής τηλεφωνίας. Τα τελευταία 15 χρόνια, επιδημιολογικές μελέτες βρήκαν μια αυξανόμενη σχέση μεταξύ της χρήσης κινητού ή ασύρματου τηλεφώνου και των εγκεφαλικών όγκων σε ανθρώπους. Επιπλέον, τα τελευταία 20 χρόνια, στατιστικές μελέτες βρήκαν συσχετίσεις μεταξύ της έκθεσης σε βάσεις και συσκευές κινητής τηλεφωνίας και αναφερόμενων συμπτωμάτων ασθένειας που αποκαλούνται "σύνδρομο μικροκυμάτων" ή "ηλεκτρο-υπερευαισθησία". (103)

Μια ανασκόπηση μελετών που αφορούν την έκθεση σε πολύπλοκα ΑΗΜΒ με ELF παλμούς έδειξε ότι το 93% από αυτές ανέφεραν επικράτηση της υπερπαραγωγής OS/ROS σε βιολογικά συστήματα. (104) Έχει αναφερθεί επίσης η επικράτηση καρκίνου σε πειραματόζωα από μακροχρόνια έκθεση σε MT, συμπεριλαμβανομένων των ELF παλμών. Μια πρόσφατη μελέτη του Εθνικού Προγράμματος Τοξικολογίας (NTP) των ΗΠΑ ανέφερε ότι οι αρουραίοι που εκτέθηκαν για 2 χρόνια, 9 ώρες την ημέρα, στο κοντινό πεδίο εξομοίωσης εκπομπών 2ης γενιάς (2G) ή 3ης γενιάς (3G) MT, ανέπτυξαν καρκίνο του εγκεφάλου (γλοίωμα) και καρκίνο της καρδιάς, με χαμηλότερα και υψηλότερα επίπεδα ακτινοβολίας από τα επίσημα αποδεκτά όρια. Επιπλέον, η μελέτη ανέφερε σημαντικά αυξημένες γενετικές ζημιές (διακεκομμένες αλυσίδες) στους εγκεφάλους των εκτεθειμένων ζώων, επιβεβαιώνοντας ότι η γενετική ζημία σχετίζεται στενά με την καρκινογένεση. Μια ιταλική μελέτη εκθέτοντας αρουραίους σε μια προσομοίωση του απομακρυσμένου πεδίου εκπομπών MT 2ης γενιάς επίσης ανέφερε την επικράτηση καρκινικών όγκων της καρδιάς και του εγκεφάλου, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της μελέτης του NTP. (105)

Αυτά τα ευρήματα για την καρκινογένεση στα ζώα, μαζί με τις επιδημιολογικές μελέτες για τον καρκίνο στους ανθρώπους, τη γενετική ζημία και την υπεροξειδωτική στρεβλωτική εύρεση, καθώς και τα δυσμενή αποτελέσματα στην αναπαραγωγή λόγω γενετικής ζημίας στα γαμετικά κύτταρα ή τον εμβρυϊκό θάνατο, δείχνουν προς την ίδια κατεύθυνση, δηλαδή ότι η έκθεση σε ανθρωπογενείς ΑΗΜΒ προκαλεί υπεροξειδωτικό στρεβλωτικό αποτέλεσμα και γενετική ζημία που μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο, μειωμένη αναπαραγωγή και σχετικές νόσους. (εικόνα 2.6) Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα επίπεδα έκθεσης στην πλειονότητα των προαναφερθέντων μελετών ήταν σημαντικά κάτω από τα επίσημα αποδεκτά όρια έκθεσης για τα ELF και RF ΑΗΜΒ, τα οποία έχουν τεθεί για να αποτρέψουν τις εκπομπές σε ανθρώπους στην περίπτωση των ELF και τη θέρμανση των ζωντανών ιστών στην περίπτωση των RF. (106)



Εικόνα 3. 10. Επιπτώσεις ELF στον άνθρωπο. [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-illustration-of-ELF-EMF-effects-on-human-health-The-excessive-exposure-to\\_fig2\\_342012191](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-illustration-of-ELF-EMF-effects-on-human-health-The-excessive-exposure-to_fig2_342012191)

Η συντριπτική πλειονότητα των μελετών που εξετάζουν τις επιπτώσεις των ανθρωπογενών ηλεκτρομαγνητικών πεδίων (ΑΗΜΒ) στο DNA και στην υγεία ανθρώπων και ζώων δείχνουν σύνδεση με οξειδωτικό στρεβλωτικό αποτέλεσμα και γενετική ζημία που μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο, μειωμένη αναπαραγωγή και σχετικές ασθένειες. Αν και οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες δεν αποτελούνται από ανεξάρτητα επαναλαμβανόμενα πειράματα, οι επιστήμονες αναγνωρίζουν τη σημασία τους και προτείνουν αναθεώρηση της κατηγοριοποίησης των ΑΗΜΒ από το Διεθνές Ινστιτούτο Ερευνών για τον Καρκίνο (IARC). Παρόλο που η θέρμανση είναι κατά κύριο λόγο η κύρια μορφή δράσης των ΑΗΜΒ, είναι πιθανό να υπάρχουν και μη θερμικά εφέ, ιδίως σε συνθήκες με υψηλή συχνότητα και ισχύ. (107)

#### 4. Επιπτώσεις από τη μη επιτυχή επιδιόρθωση βλαβών που προκαλούνται στο DNA

Οι μοριακές αλλαγές που συμβαίνουν στις μεταλλάξεις των θηλαστικών κυττάρων έχουν μελετηθεί τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, παρόλο που η μεταλλακτική ικανότητα της ακτινοβολίας περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Muller το 1927. Οι μεταλλάξεις ή οι διαγραφές ορισμένων ουσιαστικών γονιδίων σχετίζονται στενά με την επιβίωση του κυττάρου, και οι μελέτες περιορίζονται στην ανίχνευση μεγάλων διαγραφών ή μεταλλάξεων σε κρίσιμα γονίδια, ιδιαίτερα σε κάποια θανατηφόρα. Το φάσμα μεταλλάξεων που προκαλείται από ακτινοβολία διαφέρει από εκείνο των αυθόρμητων μεταλλάξεων ή των μεταλλάξεων που προκαλούνται από υπεριώδες φως και χημικά μεταλλαξογόνα, με τις περισσότερες από τις τελευταίες να είναι αποτέλεσμα σημειακών μεταλλάξεων. Οι ιονίζουσες ακτινοβολίες μπορούν να προκαλέσουν ευρύ φάσμα μεταλλάξεων, από σημειακές μεταλλάξεις σε μεμονωμένα γονίδια έως την απουσία πολλών γονιδίων, όπως φαίνεται από μελέτες στο γονίδιο HPRT που βρίσκεται στο X χρωμόσωμα. (108) Σε μοριακό επίπεδο, οι περισσότερες ενδείξεις υποδηλώνουν ότι η απώλεια γονιδίων λόγω διαγραφών του DNA που επάγονται από ακτινοβολία αποτελούν τα κύρια γεγονότα που οδηγούν σε μεταλλαξογόνες επιδράσεις.

Η αναπαραγωγή του ζημιωμένου (ή ακατάλληλα επισκευασμένου) DNA που μπορεί να συμβεί πριν την επισκευή ή τον φραγμό μπορεί να οδηγήσει σε γενετικές μεταλλάξεις, οι οποίες στη συνέχεια θα οδηγήσουν σε αλλοιωμένες πρωτεΐνες. Μεταλλάξεις σε ογκογονίδια, γονίδια υποκαταστολής όγκου, γονίδια επισκευής του DNA ή γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο μπορούν να δημιουργήσουν έναν κλώνο κυττάρων με διακριτική ικανότητα πολλαπλασιασμού. Η μεθυλοποίηση του DNA που ενδέχεται να αποτρέψει την έκφραση γονιδίων επισκευής του DNA και τη σύνθεση σχετικών πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε επισκευή του DNA με ακρίβεια. Πολλά τέτοια γεγονότα, τα οποία ενδέχεται να συσσωρευτούν μέσα σε μεγάλο χρονικό διάστημα σε περιπτώσεις χρόνιας έκθεσης σε καρκινογόνους παράγοντες, μπορούν να οδηγήσουν σε γενετική αστάθεια και καρκίνο. (109)

Όταν το γονιδιακό DNA ενός κυττάρου είναι κατεστραμμένο από έναν εξωτερικό παράγοντα καταπόνησης και η ζημία είτε δεν μπορεί να επισκευαστεί είτε επισκευάζεται ακατάλληλα, είναι δυνατές οι ακόλουθες επιπτώσεις:

- i) Η κυτταρική απόλυση (νέκρωση) ή η οδηγούμενη αυτοκτονία (ενδογενής απόπτωση). Στην περίπτωση κυττάρων που έχουν τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού, ο οργανισμός αντισταθμίζει τον απώλεια τους δημιουργώντας

νέα κύτταρα, πρακτικά χωρίς αρνητικές συνέπειες εκτός από την κατανάλωση ενέργειας, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε επιταχυνόμενη γήρανση όταν τέτοια γεγονότα συμβαίνουν σε υψηλό ρυθμό. Στην περίπτωση κυττάρων που δεν έχουν τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού, όπως τα νευρικά κύτταρα ή οι χόνδροι, η απώλεια ενός σημαντικού αριθμού κυττάρων θα οδηγήσει πιθανότατα στην ανικανότητα ορισμένων ιστών/οργάνων να λειτουργούν κανονικά. Στην περίπτωση νευρικών κυττάρων, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε νευροεκφυλιστικές νόσους όπως η νόσος του Alzheimer και του Parkinson και αυτοανοσία, μεταξύ άλλων. (101)

- ii) Το κύτταρο δεν πεθαίνει αλλά επιβιώνει με τροποποιημένο DNA. Στην περίπτωση σωματικών κυττάρων που πολλαπλασιάζονται, το τροποποιημένο γονιδίωμα θα αναπαραχθεί. Αν και ο οργανισμός ενδέχεται να αναγνωρίσει αυτά τα μεταλλαγμένα κύτταρα ως ξένα και να προσπαθήσει να τα απομονώσει και να τα αφαιρέσει, κάποια καταφέρνουν να επιβιώσουν και ενδέχεται να αρχίσουν να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, ενεργοποιώντας τον καρκίνο. Στην περίπτωση των γονιδιακών κυττάρων (ωοθηκών και σπερματοθηκών), αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλαγμένα νέα οργανισμούς που ενδέχεται να είναι προβληματικοί με πολλούς τρόπους ή προδιαθεσικοί στον καρκίνο. Και στις δύο περιπτώσεις (σωματικά ή γονιδιακά κύτταρα) η κυτταρική γήρανση είναι μια εναλλακτική διαδρομή για την εξάλειψη των επιζώντων γενετικά ελαττωματικών κυττάρων. Επομένως, τα κύτταρα με ανεπανόρθωτα κατεστραμμένο γονιδίωμα θα οδηγήσουν σε κυτταρική γήρανση, κυτταρική απόλυση, καρκίνο ή μεταλλαγμένο απογόνο ανάλογα με τον τύπο κυττάρου και τις συγκεκριμένες βιολογικές/περιβαλλοντικές συνθήκες. (101)

Η διάρκεια ανάπτυξης καρκίνου (περίοδος καθυστέρησης) μετά από ανεπανόρθωτη βλάβη στο DNA μπορεί να είναι αρκετά χρόνια, ανάλογα με τον οργανισμό και τον τύπο του καρκίνου. Η περίοδος καθυστέρησης για τα γλοιώματα (ένας τύπος καρκίνου του εγκεφάλου) είναι συνήθως >20 χρόνια στους ανθρώπους. Αυτό εξηγεί πιθανότατα γιατί μόνο κατά τα τελευταία ~15 χρόνια οι επιδημιολογικές μελέτες άρχισαν να δείχνουν συσχέτιση μεταξύ χρήσης κινητού τηλεφώνου και καρκίνου, ενώ ο καρκίνος από γραμμές ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, που είναι αρκετές δεκαετίες παλαιότερες από τα κινητά τηλέφωνα, έχει αναφερθεί πολύ νωρίτερα. (53)

#### 4.1. Μελαγχρωματική ξηροδερμία

Η Μελαγχρωματική Ξηροδερμία (XP) είναι μια σπάνια, αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή που χαρακτηρίζεται από ευαισθησία στον ήλιο και σημαντικά αυξημένο κίνδυνο καρκίνων του δέρματος και των βλεννογόνων μεμβρανών που προκαλούνται από την υπερϊώδη ακτινοβολία (UV). Επιπλέον, οι ασθενείς με XP εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο για αυθόρμητους εσωτερικούς καρκίνους, όπως όγκους του εγκεφάλου, λευχαιμίες, γαστρικά καρκινώματα και καρκίνους των πνευμόνων, υποδεικνύοντας τον σχηματισμό ενδογενών υποστρωμάτων DNA για την οδό NER. Είναι γνωστές οκτώ διαφορετικές ομάδες γενετικής συμπληρωματικότητας της XP, που αντιπροσωπεύουν τα κύρια συστατικά της οδού NER (XPA έως XPG) και μια παραλλαγή που είναι ελαττωματική σε μια εξειδικευμένη DNA πολυμεράση σύνθεσης μέσω βλαβών (XPV). Η απώλεια αυτών των πρωτεϊνών οδηγεί σε συσσώρευση ογκωδών βλαβών βάσεων, όπως τα φωτοπροϊόντα που προκαλούνται από την UV, και κατά συνέπεια, (i) κατάρρευση της θηλιάς της αντιγραφής ή μεταλλαξιογένεση σε διαιρούμενα κύτταρα και (ii) προβλήματα μεταγραφής τόσο σε διαιρούμενα όσο και σε μη διαιρούμενα κύτταρα. Είναι πιθανό ότι η προδιάθεση για καρκίνο των ασθενών με XP προκύπτει από μεταλλαξιογόνες παρακάμψεις βλαβών που λαμβάνουν χώρα στον πληθυσμό διαιρούμενων κυττάρων. (110)

Αξιοσημείωτο είναι ότι περίπου το ένα τέταρτο των ασθενών με XP αναπτύσσουν νευρολογικά συμπτώματα, όπως μικροκεφαλία, νοητική επιδείνωση, αταξία της παρεγκεφαλίδας, αισθητηριακή κώφωση και περιφερική νευροπάθεια, τα οποία φαίνεται να περιλαμβάνουν γενικευμένη ατροφία του εγκεφάλου. Αυτή η νευροπαθολογία παρατηρείται σε περίπου 25% των ασθενών με XP με μετάλλαξη στα XPA, XPB, XPD, XPF ή XPG, όπου η γενετική μετάλλαξη φαίνεται να επηρεάζει δυσμενώς ειδικά την οδό TC-NER. Οι ασθενείς με XPC, που έχουν ελάττωμα στην GG-NER αλλά όχι στην TC-NER, δείχνουν λίγες νευρολογικές επιπτώσεις, αν και έχει αναφερθεί ήπια ατροφία του εγκεφάλου και ένας όγκος στον εγκέφαλο. Βάσει των συλλογικών δεδομένων, έχει θεωρηθεί ότι η οδός TC-NER είναι πιο κρίσιμη για τη διατήρηση της λειτουργίας των μη διαιρούμενων κυττάρων και των νευρώνων απέναντι σε φυσιολογικές ενδογενείς βλάβες στο DNA. Τέλος, αναφέρεται ότι συγκεκριμένες μεταλλάξεις στα XPB, XPD και XPG οδηγούν σε ένα διπλό φαινότυπο XP/CS, που περιλαμβάνει διάφορους βαθμούς νευρικών, αναπτυξιακών και δερματικών ανωμαλιών. (111)

## 4.2. Μεταλλάξεις γονιδίων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία του οργανισμού

Η έκθεση σε ακτινοβολίες μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια, τα οποία μπορεί να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία του οργανισμού. Μερικά από τα σημαντικότερα γονίδια που μπορούν να μεταλλαχθούν κατά την έκθεση σε ακτινοβολίες και οι πιθανές επιπτώσεις τους είναι τα παρακάτω:

### 4.2.1. TP53:

Ο TP53 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53, η οποία είναι σημαντική για την αποκατάσταση του DNA και την απόπτωση. Οι μεταλλάξεις στο TP53 μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια της ικανότητας του κυττάρου να διορθώνει το DNA και να προλαμβάνει την ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση, αυξάνοντας τον κίνδυνο καρκίνου. Η πρωτεΐνη όγκου 53 (TP53; p53) είναι το πιο συχνά αλλοιωμένο γονίδιο στον ανθρώπινο καρκίνο. Η αναγνώριση των αδυναμιών που επιβάλλονται από τις αλλοιώσεις στο TP53 μπορεί να επιτρέψει αποτελεσματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις. (112)

### 4.2.2. ATM:

Το ATM γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από διπλά θραύσματα του DNA. Οι μεταλλάξεις στο ATM μπορεί να προκαλέσουν την ασθένεια αταξία-τελαγγειεκτασία, η οποία χαρακτηρίζεται από ευαισθησία στην ακτινοβολία, νευρολογικές διαταραχές και αυξημένο κίνδυνο καρκίνου. (113)

### 4.2.3. BRCA1 και BRCA2:

Αυτά τα γονίδια είναι ζωτικής σημασίας για την επιδιόρθωση του DNA μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού. Το BRCA1 (γονίδιο ευαισθησίας στον καρκίνο του μαστού 1) και το BRCA2 λειτουργούν ως καταστολείς όγκων, και οι μεταλλάξεις σε αυτά αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι πρωτεΐνες BRCA συμμετέχουν σε πολλές σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες. Συγκεκριμένα, και τα δύο γονίδια παίζουν ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA και στη ρύθμιση της μεταγραφής ως απάντηση στη βλάβη του DNA. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες BRCA είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της χρωμοσωμικής σταθερότητας, προστατεύοντας το γονιδίωμα από βλάβες. Επιπλέον, τα νέα δεδομένα αποκαλύπτουν ότι τα BRCA ρυθμίζουν τη

μεταγραφή ορισμένων γονιδίων που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA, στον κυτταρικό κύκλο και στην απόπτωση. Πολλές από αυτές τις λειτουργίες πραγματοποιούνται μέσω της αλληλεπίδρασης με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες. Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών BRCA συνδέονται επίσης με συγκεκριμένα γεγονότα φωσφορύλωσης, αν και ο ρόλος των φωσφορυλιωμένων μονοπατιών στην καταστολή των όγκων παραμένει ασαφής.. (114)

#### **4.2.4. RAD51:**

Το RAD51 συμμετέχει στην αποκατάσταση του DNA μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού. Οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο μπορεί να οδηγήσουν σε ανεπάρκεια στην αποκατάσταση του DNA, αυξάνοντας την πιθανότητα καρκινογένεσης. Οι ελαττωματικές οδοί επιδιόρθωσης του DNA αναδεικνύονται ως διακριτικά χαρακτηριστικά του καρκίνου. Η ακριβής επιδιόρθωση και αναπαραγωγή του DNA είναι απαραίτητα στοιχεία για τη γονιδιακή σταθερότητα. Τα καρκινικά κύτταρα απαιτούν υπολειμματικές ικανότητες επιδιόρθωσης του DNA για να επιδιορθώσουν τη βλάβη από το στρες αναπαραγωγής και τους γενοτοξικούς αντι-όγκογονους παράγοντες. Η ελαττωματική επιδιόρθωση του DNA προάγει επίσης τη συσσώρευση γονιδιακών αλλαγών που τελικά οδηγούν σε καρκινογένεση, πρόοδο του όγκου και θεραπευτική αντίσταση στους αντι-ογκογονους παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA. Ο παράγοντας Rad51 είναι ένας κρίσιμος παράγοντας του ομόλογου ανασυνδυασμού, ο οποίος είναι ένας ουσιαστικός μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA για τα διπλά θραύσματα. Η Rad51 έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σε πολλούς κακοήθεις συμπαγείς όγκους και σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Σε πολλούς τύπους όγκων, η Rad51 είναι κρίσιμη για τον μεταβολισμό του όγκου, τη μετάσταση και την αντοχή στα φάρμακα. (115)

#### **4.2.5. MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2:**

Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την επιδιόρθωση των ασυμμετριών του DNA (mismatch repair). Οι μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια μπορεί να προκαλέσουν το σύνδρομο Lynch, το οποίο αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο του παχέος εντέρου και άλλους καρκίνους. Το σύνδρομο Lynch (LS) είναι μια αυτοσωμική επικρατής κληρονομική νόσος που προκαλείται από παθογόνες παραλλαγές (PVs) στη γενετική αλληλουχία των γονιδίων επιδιόρθωσης ασυμφωνίας (MMR). Ο καρκίνος του ενδομητρίου που συνδέεται με το σύνδρομο Lynch (LS-EC) είναι ο πιο συνηθισμένος εξωεντερικός καρκίνος που προκαλείται από παθογόνες παραλλαγές στα MMR γονίδια, όπως τα MLH1,

MSH2, MSH6 και PMS2. Τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά του LS-EC περιλαμβάνουν πρώιμη ηλικία έναρξης, χαμηλότερο δείκτη μάζας σώματος (BMI), ενδομητριοειδές καρκίνωμα και εμπλοκή του κάτω τμήματος της μήτρας. (116)

#### 4.2.6. NBS1 (Nibrin):

Το NBS1 συμμετέχει στην αναγνώριση και αποκατάσταση των θραυσμάτων του DNA. Οι μεταλλάξεις στο NBS1 μπορεί να προκαλέσουν το σύνδρομο Nijmegen breakage, το οποίο χαρακτηρίζεται από ευαισθησία στην ακτινοβολία, μικροκεφαλία και αυξημένο κίνδυνο καρκίνου. Το σύνδρομο ρήξης της Nijmegen (NBS) είναι μια σπάνια αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή που χαρακτηρίζεται από προδιάθεση σε αιματολογικές κακοήθειες, ελαττώματα στους ελέγχους του κυτταρικού κύκλου και ευαισθησία στην ιονίζουσα ακτινοβολία. Το NBS προκαλείται από μια μετάλλαξη του γονιδίου NBS1, το οποίο κωδικοποιεί την νιβρίνη, που σχηματίζει ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα με τα Mre11 και Rad50, τα οποία εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA. Η νιβρίνη εντοπίζεται σε χρωμοσωμικές θέσεις όπου γίνεται αλλαγή τάξης και τα B κύτταρα από ασθενείς με NBS δείχνουν αυξημένη παρουσία μικροομολογιών στις θέσεις ανασυνδυασμού αλλαγής τάξης. Επειδή η νιβρίνη είναι κρίσιμη για την επιβίωση του εμβρύου, δεν έχει επιτευχθεί μέχρι σήμερα η άμεση επίδειξη μέσω στοχευμένης διαγραφής ότι η νιβρίνη λειτουργεί στον ανασυνδυασμό αλλαγής τάξης. Μέσω κυτταρικού τύπου ειδικής συνθήκης απενεργοποίησης του Nbn, του ομολόγου του NBS1 στους ποντικούς, παρατηρείται ότι η νιβρίνη παίζει ρόλο στην επιδιόρθωση της βλάβης από ακτινοβολία γ, στη διατήρηση της χρωμοσωμικής σταθερότητας και στον ανασυνδυασμό των γονιδίων της σταθερής περιοχής των Ig σε B λεμφοκύτταρα. (117)

Η επίδραση των μεταλλάξεων αυτών των γονιδίων μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τη θέση και τον τύπο της μετάλλαξης, καθώς και άλλους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Πίνακας 4.8. Γονίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία του οργανισμού και η δράση τους.

Γονίδιο	Σημασία και Δράση
TP53	Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53, σημαντική για την αποκατάσταση του DNA και την απόπτωση. Μεταλλάξεις οδηγούν σε ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση και αυξάνουν τον κίνδυνο καρκίνου.

ATM	Κωδικοποιεί πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από διπλά θραύσματα του DNA. Μεταλλάξεις προκαλούν αταξία-τελαγγειεκτασία, με ευαισθησία στην ακτινοβολία και αυξημένο κίνδυνο καρκίνου.
BRCA1 και BRCA2	Ζωτικά για την επιδιόρθωση του DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Μεταλλάξεις αυξάνουν τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών.
RAD51	Συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Μεταλλάξεις αυξάνουν την πιθανότητα καρκινογένεσης.
MLH1, MSH2, MSH6 και PMS2	Κωδικοποιούν πρωτεΐνες επιδιόρθωσης ασυμμετριών του DNA. Μεταλλάξεις προκαλούν σύνδρομο Lynch, αυξάνοντας τον κίνδυνο καρκίνου του παχέος εντέρου και άλλων καρκίνων.
NBS1 (Nibrin)	Συμμετέχει στην αναγνώριση και επιδιόρθωση των θραυσμάτων του DNA. Μεταλλάξεις προκαλούν σύνδρομο Nijmegen breakage, με ευαισθησία στην ακτινοβολία και αυξημένο κίνδυνο καρκίνου.

### 4.3. Καρκινογένεση

Τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι ζεύγη αντίθετων λειτουργικών γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική δραστηριότητα ζωής στα φυσιολογικά ευκαρυωτικά κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα συνδέονται σε μεγάλο βαθμό με αυτά τα ζεύγη γονιδίων. Η ενεργοποίηση των πρωτο-ογκογονιδίων προκαλείται από μεταλλάξεις σημείων ή μετατοπίσεις χρωμοσωμάτων, ενώ η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων προκαλείται από μετάλλαξη, διαγραφή και εισαγωγή. Γενικά, η αλλαγή ενός ενιαίου πρωτο-ογκογονιδίου ή ογκοκατασταλτικού γονιδίου δεν μπορεί να προκαλέσει απαραίτητα την καρκινογένεση, ωστόσο οι συσσωρευμένες μεταλλάξεις πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση μπορούν αναπόφευκτα να οδηγήσουν σε τέτοια καταστροφικά αποτελέσματα. Δυστυχώς, αυτό μπορεί τελικά να οδηγήσει σε διαταραχή του συστήματος ελέγχου πολλαπλασιασμού των κυττάρων και τελικά στον καρκίνο. (43)

Ο καρκινογόνος μηχανισμός από την έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία παραμένει ασαφής μέχρι σήμερα λόγω των διαφόρων παραγόντων που τον επηρεάζουν. Συνοπτικά, οι γενετικές αλλαγές που προκαλούνται από την ιονίζουσα ακτινοβολία προέρχονται κυρίως από μεγάλες διαγραφές τμημάτων DNA, και συνεπώς αποτρέπουν τις αλλαγές στα γονίδια και μειώνουν

αποτελεσματικά την καρκινογένεση. (118) Η HDIR θεωρείται συχνά η αιτία καρκινογένεσης των κυττάρων. Για παράδειγμα, η ιονίζουσα ακτινοβολία οδηγεί σε δομικές αλλαγές ορισμένων πρωτεϊνών μετάδοσης σήματος, τη δημιουργία αυτόματης διμεροποίησης και την περαιτέρω φωσφορυλίωση, με αποτέλεσμα τη συνεχή ενεργοποίηση των σημάτων και την πρόληψη της κακοήθους κυτταρικής ανάπτυξης. Η ακτινοβολία μπορεί να οδηγήσει στη διαγραφή του εξωκυττάριου τομέα του κανονικού EGFR, το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε διμερή πρωτεϊνούχο όγκο ErbB μέσω αυτοδεσμεύσεως, το οποίο μπορεί να προκαλέσει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, η έλλειψη του γονιδίου ελέγχου κυτταρικής επαλήθευσης p53 μπορεί να οδηγήσει στην εξαφάνιση του ελέγχου ζημιάς στο DNA, η οποία θα οδηγήσει στην καρκινογένεση των κυττάρων. Συνήθως, η συγκέντρωση της κυκλίνης p53 στα κύτταρα είναι πολύ χαμηλή επειδή είναι πολύ ασταθής και μπορεί να υποβιβαστεί γρήγορα. Ενώ αντίθετα υπό στρες, η έκφραση του γονιδίου p53 αυξάνεται, παρόμοια με τις συνθήκες HDIR. Όταν ο έλεγχος G1 της p53 ρυθμίζεται αναστρόφως, το ζημιωμένο DNA μπορεί να αναπαραχθεί και να συνεχίσει να μεταλλάσσεται. Αυτή η διαδικασία μπορεί στη συνέχεια να μεταδοθεί στα κύτταρα απογόνους και, τελικά, να οδηγήσει σε αναποτελεσματικά κύτταρα. Επιπλέον, η p53 ενεργοποιεί την πρωτεΐνη p21 CIP για να αναστείλει τη μίτωση του συνθετικού κύτταρου κύκλου B-CDK1, με αποτέλεσμα την παγίδευση στη φάση G2. Ωστόσο, στην πραγματικότητα, η LDIR επίσης παίζει ρόλο στον ενεργοποίηση και αναστολή ορισμένων ειδικών γονιδίων κύκλου που σχετίζονται με την κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο Bong et al. (119) εκτέλεσε ακτινοβολία AKR/J ποντικών με IDIR και HDIR για να εξετάσει τη διαφορά στην έκφραση γονιδίων. Τα αποτελέσματα του μικροσκοπίου τους έδειξαν ότι η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τους όγκους CDS1, Itga 4, Myc και Itgb 1 αυξήθηκε. Αυτό υποδηλώνει ότι η έκθεση στην ακτινοβολία επηρέασε αποτελεσματικά το επίπεδο έκφρασης των γονιδίων. (43)

#### **4.4. Μελέτη περίπτωσης: Ισχυρές επιπτώσεις της ιονίζουσας ακτινοβολίας από το Τσερνομπίλ στα ποσοστά μετάλλαξης**

Η καταστροφή του Τσερνομπίλ στις 26 Απριλίου 1986 θεωρείται το χειρότερο πυρηνικό ατύχημα στην ιστορία. Είναι ένα από τα δύο μόνα γεγονότα που έχουν ταξινομηθεί ως “Επίπεδο 7 (μείζον ατύχημα)”, το υψηλότερο δυνατό επίπεδο στην Κλίμακα Διεθνών Πυρηνικών και Ραδιολογικών Συμβάντων – ένα σύστημα ταξινόμησης που χρησιμοποιείται από τον Διεθνή Οργανισμό Ατομικής Ενέργειας (ΙΑΕΑ) για την επικοινωνία πληροφοριών ασφαλείας που σχετίζονται με πυρηνικά ατυχήματα. Το μόνο άλλο γεγονός “Επιπέδου 7”, η

πυρηνική καταστροφή της Φουκουσίμα Ντάιτσι, έλαβε χώρα το 2011 στην Ιαπωνία ως συνέπεια του σεισμού και του τσουνάμι του Τοχόκου. Η έκρηξη στο Τσερνομπίλ και η επακόλουθη πυρηνική πυρκαγιά, που έκαιγε για δέκα ημέρες, οδήγησε στην απελευθέρωση μεταξύ  $9.35 \times 10^3$  και  $1.25 \times 10^4$  πεταμπεκερέλ (PBq) ραδιονουκλιδίων στην ατμόσφαιρα. Οι ραδιενεργοί ρύποι που απελευθερώθηκαν από το ατύχημα του Τσερνομπίλ κατατέθηκαν στη συνέχεια σε περιοχές της Λευκορωσίας, της Ρωσίας και της Ουκρανίας, αλλά και αλλού στην Ευρώπη, καθώς και στην Ασία και τη Βόρεια Αμερική. Το πρότυπο μόλυνσης είναι ετερογενές, λόγω των ατμοσφαιρικών συνθηκών κατά τη στιγμή του ατυχήματος. Παρόλο που πολλά ραδιονουκλίδια, όπως το  $^{131}\text{I}$ ώδιο, είτε διαλύθηκαν είτε διασπάστηκαν μέσα σε λίγες ημέρες, το  $^{137}\text{Cs}$  (137Cs), το  $^{90}\text{Sr}$  (90Sr) και το  $^{239}\text{Pu}$  (239Pu, και άλλα στοιχεία μετά-ουρανίου) και τα προϊόντα διάσπασής τους (π.χ. το  $^{241}\text{Am}$ αμερικού) εξακολουθούν να παραμένουν στο περιβάλλον ακόμη και εκατοντάδες χιλιόμετρα από το Τσερνομπίλ. Ακόμη και σήμερα, η ποσότητα του ραδιενεργού υλικού που παραμένει είναι τεράστια. Δεδομένης της ημιζωής του  $^{137}\text{Cs}$ , του  $^{90}\text{Sr}$  και του  $^{239}\text{Pu}$  (30, 29 και 24,000 χρόνια, αντίστοιχα), είναι πιθανό να έχουν σημαντική επίδραση για μεγάλο χρονικό διάστημα. (120)

Λόγω της πρωτοφανούς κλίμακας και της παγκόσμιας επίδρασης του ατυχήματος, δεν προκαλεί έκπληξη ότι προκάλεσε σημαντικό ενδιαφέρον τόσο στην επιστημονική κοινότητα όσο και στο ευρύ κοινό. Ως αποτέλεσμα, έχουν διεξαχθεί πολυάριθμες μελέτες για την αξιολόγηση των συνεπειών του Τσερνομπίλ στην ανθρώπινη υγεία, τη γεωργία και τις βιολογικές του επιδράσεις από το επίπεδο του DNA έως ολόκληρα οικοσυστήματα. Έχουν υπάρξει επίσης αρκετές ποιοτικές ανασκοπήσεις που προσπαθούν να συνοψίσουν τα ευρήματα. Κάποιες από αυτές, ιδίως οι επίσημες εκθέσεις του ΟΗΕ, παρουσιάζουν μια αισιόδοξη εικόνα, δηλώνοντας ότι οι συνέπειες για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον είναι πολύ μικρότερες από τις αναμενόμενες. Αυτό το θέμα έχει επαναληφθεί και ερμηνευθεί στα δημοφιλή και επιστημονικά μέσα. Αυτά τα συμπεράσματα αμφισβητήθηκαν από άλλες ανασκοπήσεις, οι οποίες αμφισβητούν τη μεθοδολογία των εκθέσεων του ΟΗΕ και ισχυρίζονται ότι η αισιόδοξία τους είναι αβάσιμη. Ωστόσο, και παρόλο της διαμάχης γύρω από αυτό το θέμα, μέχρι σήμερα δεν έχουν γίνει προσπάθειες να χρησιμοποιηθούν αυστηρές ποσοτικές μέθοδοι για να συνοψιστεί η όλη βιβλιογραφία και να φτάσουμε σε εμπειρικά βασισμένα συμπεράσματα. (121)

Η μετα-ανάλυση (MA) χρησιμοποιείται για την ποσοτική αξιολόγηση επιστημονικών ευρημάτων σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένης της τοξικολογίας και της παχυσαρκίας, ενώ τα τελευταία 20 χρόνια, η MA έχει γίνει προτιμώμενη μέθοδος για τη

σύνθεση έρευνας στην οικολογία και την εξέλιξη. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθούν οι επιπτώσεις της ακτινοβολίας από το Τσερνομπίλ στα ποσοστά μετάλλαξης σε όλα τα taxa και να αξιολογηθούν οι διαφορές στην απόκριση στην ακτινοβολία μεταξύ των taxa και η ευαισθησία των ανθρώπων σε σχέση με αυτά. Βρέθηκε ότι το μέσο μέγεθος επίδρασης ήταν σημαντικά μεγαλύτερο για τα φυτά από ότι για τα ζώα. Ενώ όταν μελετήθηκαν τα διάφορα είδη ξεχωριστά, υπήρξε μεγάλη και σημαντική διακύμανση μεταξύ των ειδών, με τους ανθρώπους να βρίσκονται κοντά στη διάμεσο. Το μέσο μέγεθος επίδρασης είναι ασυνήθιστα μεγάλο, υποδεικνύοντας σημαντική αύξηση στα ποσοστά μετάλλαξης σε μολυσμένες περιοχές, ενώ οι διαφορές μεταξύ Ειδών στην αντοχή στην ακτινοβολία μπορεί να οφείλονται σε φυσιολογικούς μηχανισμούς, τρόπο ζωής, μέγεθος γενετικού υλικού και συμπεριφορικές διαφορές. (121)

Η μετα-ανάλυση αποκάλυψε σημαντικές επιδράσεις της ακτινοβολίας στις μεταλλάξεις σε διάφορα taxa, με διαφορές μεταξύ των ειδών. Δεν βρέθηκαν ενδείξεις μείωσης των μεταλλαξιογόνων επιδράσεων με την πάροδο του χρόνου, και τα αποτελέσματα ήταν ανθεκτικά έναντι πιθανών προκαταλήψεων δημοσίευσης. Η μελέτη υπογραμμίζει την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα και προτείνει πρακτικές εφαρμογές για την κατανόηση των επιπτώσεων της ακτινοβολίας μετά από πυρηνικά ατυχήματα όπως αυτό της Φουκουσίμα. (121)

## 5. Τεχνικές εντοπισμού μεταλλάξεων

Για τον εντοπισμό μεταλλάξεων στο DNA χρησιμοποιούνται τεχνικές, οι οποίες κυμαίνονται από την κλασική συγχρονική ανάλυση μέχρι τις πιο σύγχρονες μεθόδους μαζικής διαδοχικής αλληλούχησης. Επίσης, για τον εντοπισμό δομικών και αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές που επιτρέπουν την ανάλυση τόσο της δομής όσο και του αριθμού των χρωμοσωμάτων σε κυτταρικό επίπεδο. Ορισμένες από τις κύριες τεχνικές περιλαμβάνουν:

### 5.1. Αλληλούχηση DNA (DNA Sequencing)

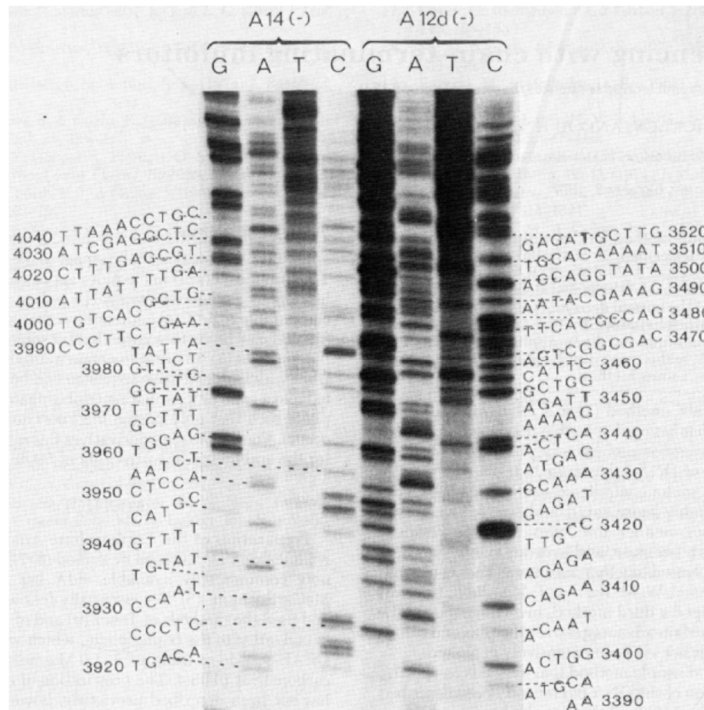
#### 5.1.1. Αλληλούχηση κατά Sanger

Η αλληλούχηση είναι η κύρια τεχνική για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο DNA. Η κλασική μέθοδος Sanger είναι πολύ ακριβής, αλλά μπορεί να αναλύσει μόνο μικρά τμήματα DNA. Αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στη μοριακή βιολογία από το 1977, διότι επιτρέπει την αποκωδικοποίηση της αλληλουχίας των βάσεων του DNA. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης I να αντιγράφει αλληλουχίες βάσεων από μονόκλωνο DNA. (122)

Για να λειτουργήσει η DNA πολυμεράση I, χρειάζεται ένας εκκινητής RNA, ο οποίος μπορεί να παραχθεί είτε μέσω ενζυμικής διάσπασης είτε με χημική σύνθεση και είναι συμπληρωματικός με μερικά νουκλεοτίδια στην αρχή της αλληλουχίας που θέλουμε να μελετήσουμε. Το μίγμα για αυτή την τεχνική περιέχει τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (A, T, G, C) που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση και επιμήκυνση της συμπληρωματικής αλυσίδας. Η ιδιαιτερότητα της τεχνικής Sanger έγκειται στην προσθήκη κατάλληλων 2'3'διδεοξυ-αναλόγων των νουκλεοτιδίων. Καθώς η DNA πολυμεράση προσθέτει βάσεις, κάποια στιγμή ενσωματώνει ένα από αυτά τα ανάλογα μόρια. Η έλλειψη του 3' υδροξυλικού άκρου στη νέα αλυσίδα εμποδίζει την περαιτέρω επιμήκυνσή της, με αποτέλεσμα, μετά από πολλούς κύκλους αντιγραφής του αρχικού μονόκλωνου DNA, να δημιουργούνται μονόκλιωνα τμήματα DNA που σταματούν σε ένα από τα τέσσερα 2'3'διδεοξυ-ανάλογα. (122)

Αυτές οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες διαχωρίζονται στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση, και χρησιμοποιώντας αυτοραδιογραφία μπορούμε να προσδιορίσουμε το είδος του τελευταίου δεοξυριβονουκλεοτιδίου της αλυσίδας, και έτσι να ανακαλύψουμε την αλληλουχία βάσεων

στο αρχικό μόριο DNA. (εικόνα 5.11) Η ανάγνωση της αυτοραδιογραφίας γίνεται από κάτω προς τα πάνω, γιατί τα μικρότερα τμήματα που βρίσκονται πιο κοντά στην περιοχή του εκκινητή κινούνται γρηγορότερα στο πήκτωμα. Με αυτόν τον τρόπο εντοπίζονται οι θέσεις των βάσεων και μέσω αυτής της μεθόδου προσδιορίστηκε η αλληλουχία των 5386 βάσεων στο DNA του φX174, αποτελώντας την πρώτη πλήρη αποκωδικοποίηση ενός γονιδιώματος. (122)



Εικόνα 5.11. Αυτοραδιογραφία στο gel ηλεκτροφόρησης στη μέθοδο Sanger. 1977

### 5.1.2. Next Generation Sequencing, NGS

Σήμερα οι τεχνικές μαζικής αλληλούχισης (Next Generation Sequencing, NGS) επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών τμημάτων του γονιδιώματος, αυξάνοντας την ευκολία και την ταχύτητα ανίχνευσης μεταλλάξεων. Οι τεχνικές μαζικής αλληλούχισης διακρίνονται σε δεύτερης, τρίτης και τέταρτης γενιάς. Η ανάπτυξη της Τεχνολογίας Αλληλουχίας Νέας Γενιάς (NGS) έχει προωθήσει σημαντικά τις γενετικές διαγνώσεις, βελτιώνοντας τη φροντίδα των ασθενών και αυξάνοντας την ακρίβεια της γενετικής συμβουλευτικής. Η NGS επιτρέπει την λεπτομερή ανάλυση των ακολουθιών DNA, καλύπτοντας τεχνικές όπως τα πολυγονιδιακά πάνελ, την Αλληλούχιση Όλου του Εξωνίου (WES) και την Αλληλούχιση Όλου του Γονιδιώματος (WGS). Αυτές οι μέθοδοι βοηθούν στον εντοπισμό γενετικών παραλλαγών που κατηγοριοποιούνται από ακίνδυνες έως παθογόνες, με βάση αυστηρά κριτήρια. (123)

**Μέθοδοι αλληλούχισης δεύτερης γενιάς:** Οι μέθοδοι αλληλούχισης δεύτερης γενιάς μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες: αλληλούχιση μέσω υβριδισμού και αλληλούχιση μέσω σύνθεσης (SBS). Οι μέθοδοι SBS αποτελούν περαιτέρω ανάπτυξη της αλληλούχισης Sanger, χωρίς τους τερματιστές διδεοξυ, σε συνδυασμό με επαναλαμβανόμενους κύκλους σύνθεσης, απεικόνισης και μεθόδους για την ενσωμάτωση επιπλέον νουκλεοτιδίων στην αυξανόμενη αλυσίδα. Αυτές οι μέθοδοι μπορεί να φαίνονται ακριβές αρχικά, αλλά οι αντιδράσεις γίνονται παράλληλα σε πολύ μικρούς όγκους, μειώνοντας έτσι το κόστος ανά ζευγάρι βάσεων. Συνεχείς βελτιώσεις και μειώσεις όγκου μειώνουν περαιτέρω το κόστος. (124)

Η μέθοδος αλληλούχισης μέσω υβριδισμού αναπτύχθηκε αρχικά τη δεκαετία του '80, χρησιμοποιώντας σειριακά διατεταγμένα ολιγονουκλεοτίδια DNA γνωστής αλληλουχίας σε φίλτρα που υβριδίζονταν με επισημασμένα τμήματα του DNA που έπρεπε να αλληλουχηθούν. Με επαναλαμβανόμενο υβριδισμό και ξέπλυμα του μη υβριδοποιημένου DNA, ήταν δυνατό να καθοριστεί αν τα επισημασμένα τμήματα ταίριαζαν με την αλληλουχία των probes στο φίλτρο. Η αλληλούχιση μέσω υβριδισμού χρησιμοποιείται κυρίως σε τεχνολογίες που βασίζονται στη χρήση ειδικών probes για τη διερεύνηση αλληλουχιών, όπως σε διαγνωστικές εφαρμογές για την ταυτοποίηση γενετικών διαταραχών που σχετίζονται με ασθένειες, όπως την ανίχνευση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) σε συγκεκριμένα γονίδια ή την εξακρίβωση μεγάλων χρωμοσωμικών ανωμαλιών (μετατάξεις, διαγραφές, διπλασιασμοί, παραλλαγές αριθμού αντιγράφων, CNVs). (124)

Οι μέθοδοι αλληλούχισης μέσω σύνθεσης (SBS) έχουν αναπτύξει πολλές διακριτές προσεγγίσεις. Οι μέθοδοι "δεύτερης γενιάς" γενικά χρησιμοποιούν ένα στερεό υποστήριγμα που περιλαμβάνει μικροκανάλια ή λάκκους όπου συμβαίνουν οι αντιδράσεις αλληλούχισης. Οι περισσότερες νέες μέθοδοι SBS δεν χρησιμοποιούν τερματικά διδεόξυ-, αν και κάποιες τεχνολογίες χρησιμοποιούν "αναστρέψιμους" τερματιστές, επιτρέποντας την κανονική προσθήκη νουκλεοτιδίων κατά την απεικόνιση, και στη συνέχεια αφαιρώντας τις μονάδες που εμποδίζουν τη σύνθεση για την προσθήκη της επόμενης βάσης στην αλληλουχία. (124)

Οι σύγχρονες μέθοδοι SBS διαφέρουν από την αρχική αλληλούχιση Sanger καθώς βασίζονται σε πολύ μικρότερες αναγνώσεις (περίπου 300–500 βάσεις). Επιπλέον, έχουν γενικά υψηλότερο ενδεχόμενο σφάλματος σε σχέση με την αλληλούχιση Sanger και βασίζονται σε μαζική κάλυψη αλληλουχιών, για την ακριβή αναγνώριση βάσει της εξαγωγής ενός συναινετικού αποτελέσματος. Παρ' όλα αυτά, σε κάποιες τεχνολογίες συμβαίνουν σφάλματα λόγω του περιεχομένου της ακολουθίας, τα οποία δεν διορθώνονται πάντα με την αύξηση του αριθμού

των αναγνώσεων. Για παράδειγμα, οι ακολουθίες ομοπολυμερών προκύπτουν όταν το DNA περιέχει διαδοχικά πολλαπλά ίδια βάση, όπως ΑΑΑΑΑΑΑΑ. Σε αυτή την περίπτωση, οι πλατφόρμες αλληλούχησης αντιμετωπίζουν δυσκολίες στον ακριβή καθορισμό του αριθμού των διαδοχικών βάσεων. Κάθε πλατφόρμα παράγει το δικό της μοναδικό σύνολο πιθανών σφαλμάτων αλληλουχίας και οι χρήστες πρέπει να είναι ενήμεροι για αυτούς τους περιορισμούς. Συχνά χρησιμοποιούνται πολλαπλές πλατφόρμες με διαφορετικές τεχνολογίες για την αντιμετώπιση αυτών των ζητημάτων. (124)

Η τάση από τεχνολογίες με "μεγαλύτερο μήκος ανάγνωσης" προς "τεχνολογίες με κοντινή ανάγνωση" επιστρέφει τώρα προς την ανάπτυξη τεχνολογιών που παράγουν μακρύτερα πρωτογενή μήκη ανάγνωσης, διατηρώντας ταυτόχρονα τη "μαζικά παράλληλη" φύση της τεχνολογίας. Αυτό συμβαίνει κυρίως στις "τρίτη" και "τέταρτη" γενιά τεχνολογιών. Τα περισσότερα SBS συστήματα χρησιμοποιούν μεθόδους όπου τα μεμονωμένα μόρια DNA διανέμονται σε εκατομμύρια διαφορετικές θέσεις, υποβάλλονται σε αντιδράσεις σύνθεσης DNA με χρήση επισημασμένων νουκλεοτιδίων ή σε χημικές αντιδράσεις που βασίζονται στην ενσωμάτωση ενός συγκεκριμένου νουκλεοτιδίου, τα οποία μπορούν να απεικονιστούν ή να ανιχνευτούν με άλλους τρόπους. Έχουν αναπτυχθεί πολλές δημιουργικές τεχνολογίες για την παραγωγή εκατομμυρίων αναγνώσεων αλληλουχίας DNA σε μία μόνο ανάλυση. Οι αναλύσεις αυτές μπορεί να διαρκούν από λίγες ώρες έως αρκετές ημέρες, ανάλογα με τον όγκο δεδομένων. (124)

**Μέθοδοι αλληλούχησης τρίτης γενιάς:** Σε αντίθεση με τις μεθόδους αλληλούχησης δεύτερης γενιάς, οι μέθοδοι τρίτης γενιάς στοχεύουν στην αλληλούχηση μεγάλων μορίων DNA (και RNA). Η εταιρεία Pacific Biosciences (PacBio) είναι ηγέτιδα σε αυτό τον τομέα, έχοντας εμπορευματοποιήσει δύο συστήματα αλληλούχησης: το αρχικό μοντέλο RSII και πιο πρόσφατα, το Sequel™. Η αλληλούχηση PacBio, γνωστή ως SMRT (Single Molecule Real Time), επιτρέπει την αλληλούχηση πολύ μεγάλων τμημάτων, έως 30–50 kb. Η μέθοδος SMRT χρησιμοποιεί μια τεχνητά τροποποιημένη DNA πολυμεράση που δένεται στον πάτο ενός πηγαδιού σε ένα SMRT κελί, όπου λαμβάνει χώρα η αλληλούχηση. Ένας θάλαμος μετρητών ανίχνευσης (ZMW) είναι μια μικρή καμπίνα που οδηγεί φωτεινή ενέργεια σε μια περιοχή με διαστάσεις μικρότερες από το μήκος κύματος του φωτός που χρησιμοποιείται. Χάρη στον σχεδιασμό του ZMW και το μήκος κύματος του φωτός, η απεικόνιση συμβαίνει μόνο στον πυθμένα του ZMW όπου η DNA πολυμεράση, δεμένη με το DNA, ενσωματώνει κάθε βάση σε μια αναπτυσσόμενη αλυσίδα. Η εισαγωγή κάθε νουκλεοτιδίου απεικονίζεται σε χρονική κλίμακα χιλιοστών του δευτερολέπτου. Τέσσερα διαφορετικά φωσφο-συνδεδεμένα

φθοροφόρα, που το καθένα αντιστοιχίζεται σε ένα από τα τέσσερα νουκλεοτίδια, χρησιμοποιούνται για τη διαφορική ανίχνευση. Όταν ένα νουκλεοτίδιο ενσωματώνεται στην αυξανόμενη αλυσίδα, γίνεται απεικόνιση τη στιγμή που το σωστό φθοριζέ φωτεινό νουκλεοτίδιο δεσμεύεται. Μετά την ενσωμάτωση, το φθοριζέ μέρος που συνδέεται με τη φωσφορική ομάδα απελευθερώνεται, "επιπλέει" μακριά από τον πυθμένα του ZMW και δεν μπορεί πλέον να ανιχνευθεί. Το επόμενο νουκλεοτίδιο μπορεί τότε να ενσωματωθεί. Η απεικόνιση είναι χρονικά συγχρονισμένη με τον ρυθμό ενσωμάτωσης του νουκλεοτιδίου, έτσι ώστε κάθε βάση να ταυτοποιείται καθώς ενσωματώνεται στην αυξανόμενη αλυσίδα DNA. (125)

Η προετοιμασία του προτύπου στη διαδικασία της PacBio είναι μοναδική καθώς περιλαμβάνει την παραγωγή ενός "SMRTbell", ενός κυκλικού διπλού νήματος DNA με έναν γνωστό αντάπτορα που είναι συμπληρωματικός με τα πρωταρχικά τμήματα που χρησιμοποιούνται για να ξεκινήσει η σύνθεση DNA στο πρότυπο. Αυτό επιτρέπει στην πολυμεράση να διαβάσει επανειλημμένα μεγάλα πρότυπα κυκλικά σε κάθε ZMW μέχρι να σταματήσει, για να δημιουργήσει μια συναινετική αλληλουχία (CCS, circular consensus sequence). Καθώς οι αντάπτορες που έχουν συνδεθεί σε κάθε πλευρά της εισαγωγής διαθέτουν θέσεις πρωταρχικών τμημάτων της σύνθεσης DNA, η πολυμεράση μπορεί να διασχίσει τον κυκλικό SMRTbell στην κατεύθυνση 5'→3' σε οποιοδήποτε από τα δύο νήματα DNA, παρέχοντας συμπληρωματικές πληροφορίες και από τα δύο νήματα του διπλού νήματος "SMRTbell". (126)

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της διαδικασίας απεικόνισης και ανίχνευσης της αλληλούχισης σε πραγματικό χρόνο της PacBio είναι ότι ο ρυθμός προσθήκης κάθε νουκλεοτιδίου κατά τη σύνθεση μπορεί να μετρηθεί, και αυτός ο χρόνος ονομάζεται διάρκεια μεταξύ των παλμών (IPD). Πολλά νουκλεοτίδια με μεταβολές στη βάση, όπως κάποιες μεθυλώσεις της αδενίνης και κυτοσίνης, αλλάζουν το IPD και έτσι μπορούν να αναγνωριστούν ως τροποποιημένες βάσεις. Αυτό επιτρέπει την ανίχνευση και καταγραφή πολλών διαφορετικών μεταβολών για επιγενετικές μελέτες. (127) Σε αυτό το σημείο, δεν μπορούν να αναγνωριστούν όλες οι μεταβολές, συμπεριλαμβανομένου του m5C λόγω μικρής τροποποίησης του IPD. Ωστόσο, η χημική τροποποίηση τέτοιων νουκλεοτιδίων μπορεί να επιτρέψει την ανίχνευσή τους. (123)

Η αλληλούχιση PacBio SMRT έχει υψηλό σφάλμα εγγενώς, αλλά αυτό αντισταθμίζεται συνήθως λόγω του μεγάλου αριθμού αναγνώσεων για κάθε πρότυπο SMRTbell σε κάθε ZMW. Οι σφάλματα είναι τυχαία και όχι συστηματικά, έτσι η πολλαπλή αλληλούχιση και η συγκέντρωση των αναγνώσεων οδηγεί σε υψηλή ακρίβεια. Επιπλέον, το PacBio επιτρέπει την

γρήγορη ταυτοποίηση τόπων μεθυλίωσης για επιγενετικές μελέτες και παρέχει μακριές αναγνώσεις για την σύνθεση γονιδιωμάτων. (125)

**Μέθοδοι αλληλούχισης τέταρτης γενιάς:** Στις μεθόδους αλληλούχισης τέταρτης γενιάς, η γενική ιδέα είναι ότι είναι δυνατό να περάσουμε μεγάλα μόρια DNA μέσα από μικρές διαμέτρους "τρύπες" και να μετρήσουμε διαφορετικά ρεύματα καθώς κάθε νουκλεοτίδιο περνά από έναν συνδεδεμένο ανιχνευτή. (128)

Θεωρητικά, πάνω από εκατό χιλιάδες βάσεις DNA μπορούν να περάσουν μέσα από το νανοπόρο, και διαθέτοντας πολλά κανάλια, δεκάδες έως εκατοντάδες Gb ακολουθίας μπορούν να επιτευχθούν σε σχετικά χαμηλό κόστος. Υπάρχουν δύο τύποι συστημάτων νανοπόρων για την αλληλούχιση DNA: τα βιολογικά μεμβρανικά συστήματα και η τεχνολογία αισθητήρων από στερεά υλικά. Η αλληλούχιση με βιολογικούς νανοπόρους βασίζεται στη χρήση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ενσωματωμένων σε λιπιδική μεμβράνη για τη δημιουργία των πόρων. Η ταχύτητα διέλευσης του DNA ρυθμίζεται με την προσθήκη πρωτεϊνών που βοηθούν την διέλευσή του. Η τεχνολογία αισθητήρων από στερεά υλικά χρησιμοποιεί διάφορα μεταλλικά ή μεταλλοκράματα υλικά με νανομετρικούς πόρους για τη διέλευση DNA ή RNA. (129)

Η αλληλούχιση DNA με βάση την τεχνολογία νανοπόρων προτάθηκε για πρώτη φορά στα τέλη της δεκαετίας του 1990 και πρόσφατα εμπορευματοποιήθηκε από την Oxford Nanopore Technologies (ONT) με τη φορητή συσκευή MinION, την επιτραπέζια GridION και την υψηλής ροής PromethION. Αυτοί οι αναλυτές χρησιμοποιούν πρωτεϊνικούς νανοπόρους σε μια ηλεκτρικά ανθεκτική πολυμερική μεμβράνη, διαπιστώνοντας χαρακτηριστικές αλλαγές ρεύματος καθώς κάθε νουκλεοτίδιο περνά από τον ανιχνευτή. (129)

Τα μεγάλα μόρια dsDNA συνδέονται αρχικά με ένα διαδοχικό ένζυμο, όπως η πολυμεράση phi29. Καθώς το σύμπλεγμα συναντά έναν νανοπόρο, ένα νήμα DNA εισέρχεται στον νανοπόρο και η ταχύτητα διέλευσης ρυθμίζεται από τη σύνθεση και τη διαδοχική διέλευση της DNA πολυμεράσης. Το διαδοχικό ένζυμο επιτρέπει στο DNA να διατηρείται συνεχώς σε κίνηση μέσω της επιμήκυνσής του. Καθώς ένα νουκλεοτίδιο περνά από τον πόρο, διακόπτει ένα ρεύμα που έχει εφαρμοστεί στον νανοπόρο, παρέχοντας ένα χαρακτηριστικό ηλεκτρονικό σήμα που καταγράφεται. Η καταγραφή γίνεται σε πραγματικό χρόνο και ενώ 10kb αναγνώσεις είναι πλέον ένας λογικός στόχος, θεωρητικά εκατοντάδες kb DNA μπορούν να διασχίσουν κάθε νανοπόρο και να ανιχνευθούν. Μόλις το DNA φύγει από έναν νανοπόρο, ο πόρος είναι διαθέσιμος για χρήση από ένα διαφορετικό μόριο DNA. (130)

Λόγω του μικρού και φορητού μεγέθους του, το MinION προσφέρει πολλές εφαρμογές όπου η φορητότητα και οι απαιτήσεις χώρου είναι σημαντικές. Αν και το ποσοστό σφάλματος είναι ακόμα υψηλό, αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με τον μεγάλο αριθμό μορίων που αλληλουχούνται. Η τεχνολογία νανοπόρων έχει χρησιμοποιηθεί για την αλληλούχιση περιβαλλοντικών και μεταγενωμικών δειγμάτων, είναι εγκατεστημένη στον διαστημικό σταθμό και έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών. Η τεχνολογία αυτή επιτρέπει επίσης την ταυτοποίηση τροποποιήσεων βάσεων και πραγματοποιεί απευθείας αλληλούχιση RNA. Επιπλέον, η αλληλούχιση νανοπόρων προσφέρει επίσης απευθείας αλληλούχιση RNA καθώς και αλληλούχιση cDNA χωρίς PCR. Έτσι, η τεχνολογία νανοπόρων έχει τη δυνατότητα να προσφέρει σχετικά χαμηλού κόστους αλληλούχιση DNA και RNA, παρακολούθηση περιβαλλοντικής κατάστασης και γενετυποποίηση. (131)

## 5.2. Τεχνική Ταχείας Αλληλούχισης MinION

Το MinION είναι μια φορητή συσκευή για την αλληλούχιση DNA και RNA σε πραγματικό χρόνο, που αναπτύχθηκε από την Oxford Nanopore Technologies. Χρησιμοποιεί τεχνολογία αλληλούχισης νανοπόρων, η οποία επιτρέπει την ανάλυση μεγάλων θραυσμάτων DNA ή RNA περνώντας τα μέσα από έναν νανοπόρο, μια μικρή πρωτεϊνική οπή ενσωματωμένη σε μια μεμβράνη. Είναι μια αυτοματοποιημένη τεχνική η οποία βασίζεται σε μια συμπαγή, φορητή συσκευή που ζυγίζει περίπου 90 γραμμάρια, η οποία συνδέεται σε έναν υπολογιστή μέσω μιας τυπικής θύρας USB 3.0. (132)

Κατά την χρήση της τεχνικής αυτής, μεγάλα θραύσματα DNA (8-20 κιλοβάσεις) περνούν μέσω ενός νανοπόρου. Καθώς το DNA περνά μέσω του νανοπόρου, διαταράσσει το ηλεκτρικό ρεύμα που διαπερνά τον πόρο. Αυτές οι διαταραχές καταγράφονται ως ηλεκτρικά σήματα, που αντιπροσωπεύουν την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων. Τα δεδομένα αυτά από τις αναγνώσεις αναπαριστώνται σε ένα "διάγραμμα σκίτσου" (squiggle plot), που δείχνει τις διαταραχές του ηλεκτρικού σήματος. Στη συνέχεια, η μετατροπή σε βάσεις (basecalling) είναι η διαδικασία μετατροπής των ακατέργαστων ηλεκτρικών σημάτων σε αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, η οποία επιτυγχάνεται μέσω ειδικού λογισμικού, όπως τα MinKNOW, Metrichor, Nanocall, Albacore και Chiron, τα οποία έχουν διαφορετική ακρίβεια και χαρακτηριστικά. (132)

Πρόσθετες αναλύσεις μπορούν να ανιχνεύσουν μεταλλάξεις, να χαρακτηρίσουν επαναλαμβανόμενες βάσεις και να εντοπίσουν μοτίβα μεθυλίωσης, συγκρίνοντας τα δεδομένα

με γονιδιώματα αναφοράς χρησιμοποιώντας λογισμικό ευθυγράμμισης όπως το BWA-MEM, BLAST και GraphMap. (132)

Τα δείγματα DNA πρέπει να υποβληθούν σε προετοιμασία, που συχνά διευκολύνεται από κιτ όπως το Ligation Sequencing Kit 1D και το Rapid Sequencing Kit. Αυτό σε συνδυασμό με πρόσφατες εξελίξεις στο λογισμικό μετατροπής σε βάσεις και στη χημεία των νανοπόρων, καθώς και τη βελτίωση των flow cells, δηλαδή του αναλώσιμου μέρους του MinION που περιέχει τους νανοπόρους, έχουν βελτιώσει σημαντικά την ακρίβεια και την απόδοση της αλληλούχησης. (132)

Το MinION έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην αλληλούχηση ολόκληρου γονιδιώματος, στην αναγνώριση μονο-νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών και στην ανάλυση γονιδιώματος καρκίνου. Επίσης παρέχει τη δυνατότητα δημιουργίας γενετικού προφίλ των εγκεφαλικών όγκων με μεγάλη ταχύτητα, εντοπίζοντας κρίσιμες γενετικές μεταλλάξεις σε μια διαδικασία διάγνωσης την ίδια μέρα. Η συσκευή είναι επίσης αποτελεσματική στη μικροβιολογία για τον εντοπισμό ειδών παθογόνων σε κλινικά δείγματα, όπως φαίνεται στη χρήση της για την αλληλούχηση σε πραγματικό χρόνο δειγμάτων του ιού Έμπολα κατά την επιδημία της Δυτικής Αφρικής. (132)

Το MinION παρέχει μια οικονομική, φορητή και ακριβή λύση για την ταχεία αλληλούχηση γονιδίων, με εφαρμογές που εκτείνονται από την κλινική διάγνωση μέχρι την εξατομικευμένη ιατρική. Η δυνατότητά του να παράγει δεδομένα σε πραγματικό χρόνο το καθιστά ένα ανεκτίμητο εργαλείο τόσο στην έρευνα όσο και στις κλινικές εφαρμογές, ιδιαίτερα στη νευροχειρουργική για τη διάγνωση και τη θεραπεία των όγκων του ΚΝΣ. (132)

### 5.3. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Η PCR είναι μια τεχνική που επιτρέπει τον εκθετικό πολλαπλασιασμό ενός ειδικού τμήματος του DNA, καθιστώντας δυνατή την εξέτασή του για την παρουσία μεταλλάξεων. Υπάρχουν διάφορες επιμέρους τεχνικές PCR, οι οποίες έχουν αναπτυχθεί για να προσαρμόζονται σε συγκεκριμένες ανάγκες έρευνας και διαγνωστικής. Συγκεκριμένα αυτές που χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό μεταλλάξεων στο DNA είναι πολλές και διάφορες, ανάλογα με την ειδικότητα και την ευαισθησία που απαιτείται για κάθε περίπτωση. Αναλυτικά, κάποιες από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους είναι:

### 5.3.1 Κλασική PCR:

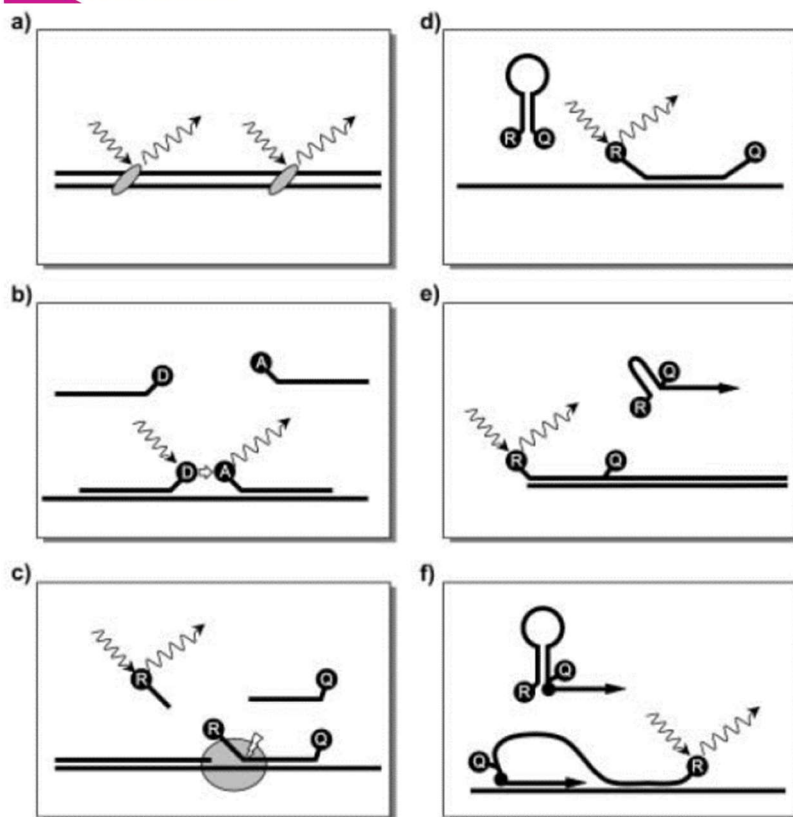
Η αρχική μορφή της PCR, είναι μια μοριακή βιολογική μέθοδος που χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει και να αναπαράγει μικρά τμήματα DNA ώστε να δημιουργηθούν εκατομμύρια αντίγραφα συγκεκριμένων ακολουθιών DNA. (133)

Αρχικά πραγματοποιείται εκχύλιση του DNA από τα δείγματα που εξετάζονται και σχεδιάζονται ειδικές σύντομες αλληλουχίες εκκινητών (primers) που αντιστοιχούν στα άκρα του τμήματος του DNA που θέλουμε να αντιγραφεί. Το DNA που εκχυλίστηκε, μαζί με τους primers προστίθεται σε ένα ependorf παρουσία DNA πολυμεράσης, dNTPs (νουκλεοτίδια), και άλλων απαραίτητων συστατικών. (133)

Η διαδικασία της PCR πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή που έχει τη δυνατότητα να ελέγχει τις εναλλαγές της θερμοκρασίας και το χρόνο της αντίδρασης. Η εναλλαγή των θερμοκρασιών γίνεται κυκλικά. Πιο συγκεκριμένα, Αρχικά το μίγμα θερμαίνεται σε υψηλή θερμοκρασία (συνήθως γύρω στους 95°C) για να διαχωριστεί το δίκλωνο DNA σε μονόκλωνα και στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώνεται συνήθως γύρω στους 50-65°C ώστε οι primers να συνδεθούν στις θέσεις που παρατηρείται συμπληρωματικότητα και να ξεκινήσει η επιμήκυνση του DNA με τη δράση της DNA πολυμεράσης. Η επιμήκυνση πραγματοποιείται γύρω στους 72°C, γιατί είναι η κατάλληλη θερμοκρασία για την taq DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην PCR. Ο κύκλος θερμοκρασιών επαναλαμβάνεται συνήθως 25-35 φορές σε μια αντίδραση PCR. Κάθε κύκλος διπλασιάζει την ποσότητα του ειδικού τμήματος DNA που αντιγράφεται. Τα τελικά προϊόντα της PCR μπορούν να αναλυθούν μέσω ηλεκτροφόρησης σε αгарόζη, όπου τα μεγέθη των προϊόντων μπορούν να συγκριθούν με έναν πρότυπο δείκτη μεγέθους. (133)

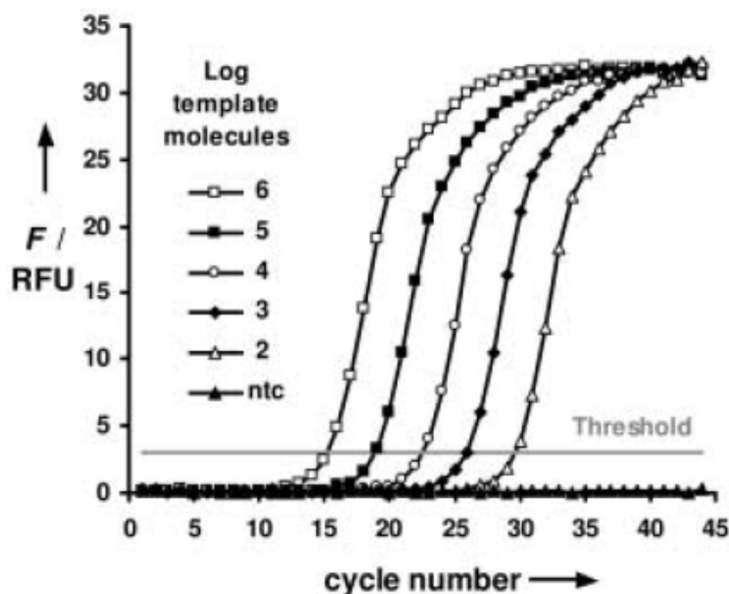
### 5.3.2. Real-Time PCR

Η τεχνική real-time PCR, που παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από τον Higuchi το 1993, (134) είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και βασίζεται σε μια κινητική αντίδραση φθορισμού. Σε αυτή τη μέθοδο, ο πολλαπλασιασμός του στόχου DNA και η ανίχνευση του προϊόντος πραγματοποιούνται ταυτόχρονα μέσα στον ίδιο σωλήνα. Ο φθορισμός ειδικής χρωστικής που συνδέεται με το προϊόν μετρείται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Οι χρωστικές και οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν κυρίως τη χρωστική SYBR Green I, τους ανιχνευτές υδρόλυσης, τους ανιχνευτές TaqMan, τους μοριακούς φάρους και τους σκορπιούς. (εικόνα 5.12) (135)



Εικόνα 5.12. Ανιχνευτές που έχουν χρησιμοποιηθεί στην real-time PCR. a) χρωστική SYBR green I, b) ανιχνευτές υδρόλυσης, c) ανιχνευτές Taqman, d) μοριακοί φάροι, e) ανιχνευτές sunrise, f) σκορπιοί. (130)

Κατά την εξέλιξη της τεχνικής, ανάλογα με τη συγκέντρωση του αρχικού δείγματος, αλλάζει ο κύκλος PCR στον οποίο η ποσότητα των προϊόντων θα φτάσει σε μια τιμή –κατώφλι. (εικόνα 5.13) Αυτές οι μετρήσεις δίνουν τη δυνατότητα στον ερευνητή να ποσοτικοποιήσει την αρχική ποσότητα του DNA κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα του DNA, τόσο λιγότεροι κύκλοι PCR χρειάζονται για να φτάσει η αντίδραση στο όριο ανίχνευσης. Η ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται δημιουργώντας μια καμπύλη αναφοράς που συνδέει τον κύκλο ανίχνευσης με τον λογάριθμο των αντιγράφων του DNA. Στο τέλος της διαδικασίας, είναι σημαντικό να γίνει ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων για να επιβεβαιωθεί ότι δεν έχουν ενισχυθεί μη ειδικά μόρια. Εκτός από τον απόλυτο προσδιορισμό του στόχου DNA, μπορεί να γίνει και σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός, ο οποίος βασίζεται στη σύγκριση της ποσότητας του στόχου DNA με την ποσότητα ενός γονιδίου αναφοράς. (136)



Εικόνα 5.13. Φθορισμός συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων αρχικής ποσότητας DNA (131).

Η τεχνική real-time PCR έχει κερδίσει σημαντική προσοχή τα τελευταία χρόνια λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων της σε σύγκριση με άλλες μορφές PCR. Διακρίνεται για την εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία της και την ικανότητά της να ποσοτικοποιεί ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων DNA. Επιπλέον, απαιτεί λιγότερο χρόνο, καθώς είναι μια διαδικασία σε πραγματικό χρόνο που δεν χρειάζεται επιπλέον χειρισμούς. Η αυτοματοποίησή της μειώνει σημαντικά τις πιθανότητες επιμόλυνσης του δείγματος. (136)

### 5.3.3. *Allele-Specific PCR (AS-PCR)*

Η Allele-Specific PCR (AS-PCR), γνωστή και ως Allele-Specific Polymerase Chain Reaction, αποτελεί μια παραλλαγή της κλασικής PCR. Σαν τεχνική εστιάζει στην ενίσχυση ενός συγκεκριμένου αλληλόμορφου ενός γονιδίου και κυρίως στην ανίχνευση και τη διάκριση μεταξύ ειδικών αλληλόμορφων, συμπεριλαμβανομένων μεταλλάξεων και πολυμορφισμών. (137)

Για να επιτευχθεί αυτή η στόχευση οι primers που σχεδιάζονται είναι αλληλοειδικοί, συνήθως με μια αλλαγή στο 3' τέλος τους, η οποία τους επιτρέπει να αναγνωρίζουν και να συνδέονται μόνο με ειδικά αλληλόμορφα καθιστώντας έτσι την τεχνική αυτή ιδανική για γενετικές αναλύσεις ανίχνευσης συγκεκριμένων αλληλομόρφων. Συγκεκριμένα, οι primers πρέπει να είναι αλληλοειδικοί, με το 3' τέλος του primer να περιέχει την πολυμορφική βάση που διαφοροποιεί τα αλληλόμορφα. Αυτή η βάση στο 3' τέλος είναι κρίσιμη, καθώς η πολυμεράση

δεν θα προχωρήσει εάν η βάση δεν ταιριάζει ακριβώς, παρέχοντας την ειδικότητα της αντίδρασης. (137)

Οι συνθήκες της αντίδρασης πρέπει να είναι αυστηρές, όπως σε κάθε τεχνική PCR με τη θερμοκρασία αντίδρασης και τον χρόνο να είναι τέτοια ώστε να ευνοούν την επιλεκτική σύνδεση των primers μόνο με το στοχευμένο αλληλόμορφο. Επιπλέον, η συγκέντρωση των primers και άλλων συστατικών μπορεί να ρυθμιστεί για να βελτιστοποιήσει την ειδικότητα. (137)

Κατά τη διάρκεια της PCR, οι primers συνδέονται με το DNA εάν και μόνο εάν η στοχευμένη βάση είναι παρούσα στο σημείο αλληλοειδικής σύνδεσης. Αυτό προκαλεί την ενίσχυση μόνο του στοχευμένου αλληλόμορφου και τα προϊόντα της ενίσχυσης μπορούν να αναλυθούν μέσω ηλεκτροφόρησης ή πιο σύγχρονων τεχνικών όπως η real-time PCR, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των αλληλοειδών. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων συχνά βασίζεται στην παρουσία ή απουσία προϊόντος της αντίδρασης, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία ή απουσία αντίστοιχα των ειδικών αλληλόμορφων. Επιπλέον, στην περίπτωση της real-time PCR, τα αποτελέσματα μπορούν να δώσουν πληροφορίες για την αλληλική συχνότητα και άλλες ποσοτικές μετρήσεις. (137)

#### **5.3.4. Multiplex PCR**

Αρκετός χρόνος και κόπος μπορεί να εξοικονομηθεί με την ταυτόχρονη ενίσχυση πολλαπλών ακολουθιών σε μία μόνο αντίδραση, μια διαδικασία που αναφέρεται ως πολυπλεκτική (multiplex) αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η πολυπλεκτική PCR απαιτεί να οδηγούν τα primers στην ενίσχυση μοναδικών περιοχών του DNA, τόσο σε ζεύγη ξεχωριστά όσο και σε συνδυασμούς πολλών primers, υπό ένα ενιαίο σύνολο συνθηκών αντίδρασης. Επιπλέον, πρέπει να υπάρχουν μέθοδοι για την ανάλυση κάθε ατομικού προϊόντος ενίσχυσης από το μείγμα όλων των προϊόντων. Η πολυπλεκτική PCR γίνεται μια γρήγορη και βολική δοκιμασία έλεγχου τόσο στο κλινικό όσο και στο ερευνητικό εργαστήριο. (138)

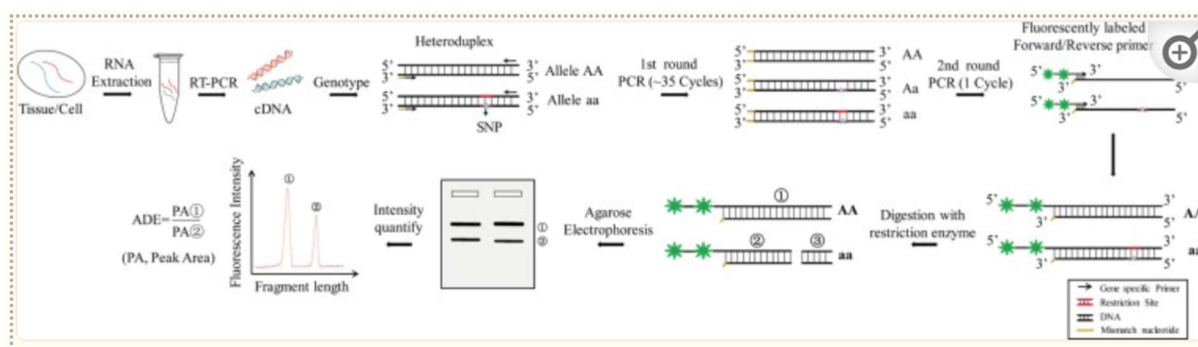
Η ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής πολυπλεκτικής PCR συνήθως απαιτεί στρατηγικό σχεδιασμό και πολλαπλές προσπάθειες για την βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης. Για μια επιτυχημένη δοκιμασία πολυπλεκτικής PCR, η σχετική συγκέντρωση των primers, η συγκέντρωση του διαλύματος PCR, η ισορροπία μεταξύ των συγκεντρώσεων του χλωριούχου μαγνησίου και των δεοξυριβονουκλεοτίδων, οι θερμοκρασίες κυκλισμού, και η ποσότητα του DNA προτύπου και της DNA πολυμεράσης Taq είναι σημαντικές. Μια βέλτιστη συνδυασμός

της θερμοκρασίας σύζευξης και της συγκέντρωσης του διαλύματος είναι ουσιώδης στην πολυπλεκτική PCR για να ληφθούν ιδιαίτερα ειδικά προϊόντα ενίσχυσης. Η συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου χρειάζεται μόνο να είναι ανάλογη με την ποσότητα των dNTP, ενώ η ρύθμιση της συγκέντρωσης των primers για κάθε στοχευμένη ακολουθία είναι επίσης ουσιώδης. (138)

Σαν τεχνική είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη παράμετροι οι οποίοι θα λύσουν πιθανά προβλήματα της τεχνικής αυτής, όπως τα απροσδόκητα προϊόντα ενίσχυσης, η ανισόμετρη ή καθόλου ενίσχυση κάποιων στοχευμένων ακολουθιών, και οι δυσκολίες στην αναπαραγωγή κάποιων αποτελεσμάτων. Παρόλα αυτά δίνει τη δυνατότητα ταυτόχρονου ελέγχου διαφορετικών αλληλουχιών για τον πιθανό εντοπισμό μεταλλάξεων ταυτόχρονα κερδίζοντας έτσι χρόνο σε περιπτώσεις που απαιτούνται άμεσα αποτελέσματα. (138)

### 5.3.5. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την πολλαπλασιασμό του DNA με PCR και την περαιτέρω ανάλυσή του με χρήση ενζύμων περιορισμού. Η μέθοδος είναι ποσοτική και χρησιμοποιεί φθορίζοντα πρωτεϊνικό αντιδραστήριο (fPCR-RFLP) για την ανάλυση της διαφορετικής εκφραστικότητας των αλληλομορφών (ADE) σε διπλοειδή οργανισμούς. (εικόνα 5.14) Η ADE είναι σημαντική καθώς συχνά οδηγεί σε συγκεκριμένες ποικιλίες φαινοτύπων, επηρεάζοντας τις διαφορές στην έκφραση των γονιδίων μεταξύ των αλληλομορφών. (139)



Εικόνα 5.14. Σχηματικό Διάγραμμα της Μεθόδου Fluorescence PCR-RFLP (fPCR-RFLP). (134)

Η μεθοδολογία της τεχνικής περιλαμβάνει μια διπλή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR). Δηλαδή δύο γύρους ενίσχυσης PCR χρησιμοποιώντας ένα ζεύγος πρωτεϊνικών αντιδραστηρίων, ένα εκ των οποίων φέρει διπλή ετικέτα με το φθορίζοντικό χρωμοφόρο 6-FAM. Στη συνέχεια τα δύο αλληλόμορφα διαχωρίζονται μέσω RFLP, δηλαδή χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών που έχουν την ικανότητα να εντοπίζουν συγκεκριμένες

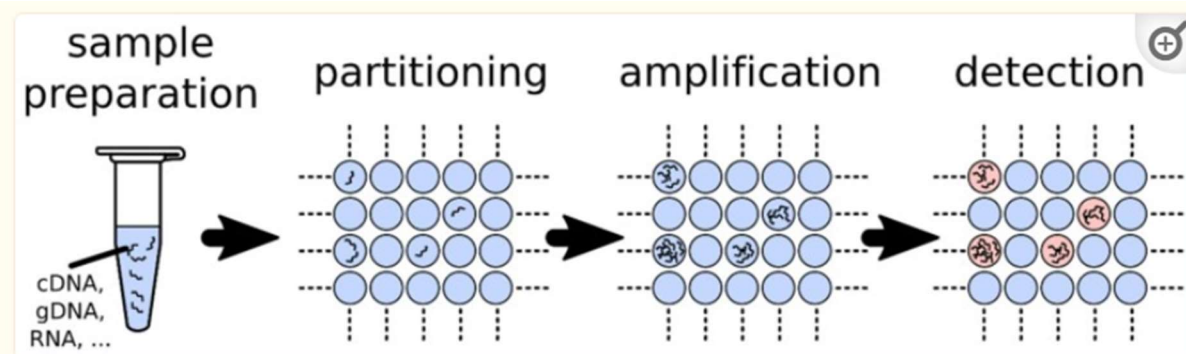
αλληλουχίες δίκλωνου DNA και να κόβουν τους 3'-5' φωσφοριεστερικούς δεσμούς σε αυτούς. Αν υπάρχει διαφορετικό αλληλόμορφο που έχει προκληθεί από πιθανή μετάλλαξη, οι αλληλουχίες αυτές μπορεί να βρίσκονται με μεγαλύτερη ή μικρότερη συχνότητα από ότι στο φυσιολογικό αλληλόμορφο, προκαλώντας διαφορετικά μεγέθη των περικοπών, τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν με ηλεκτροφόρηση. Επίσης η ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης μπορεί να γίνει με βάση της πυκνότητας της φθορίζουσας ουσίας. (139)

Αυτά τα χαρακτηριστικά της τεχνικής δίνουν τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ αλληλομόρφων γονιδίων σε πολύ μεγάλο ποσοστό και όταν χρησιμοποιήθηκε η τεχνική αυτή για επιβεβαίωση γονιδίων σε χοίρους επιβεβαιώθηκαν τα γονίδια PLAG1 και KIT, τα οποία σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά του ρυθμού ανάπτυξης και της ανοσοαπόκρισης τους, ως ADE σε διάφορα στάδια ανάπτυξης και σε διάφορους ιστούς. (140) Έτσι αποδεικνύεται ότι η τεχνική fPCR-RFLP είναι μια ακριβής και ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση της ADE τόσο σε επίπεδο DNA όσο και RNA, παρέχοντας ένα ισχυρό εργαλείο για την ανάλυση των μεταλλάξεων που προκαλούν την ADE. (139)

### 5.3.6. Digital PCR (dPCR)

Η Ψηφιακή Αντίδραση Πολυμεράσης (dPCR) είναι μια πιο εξελιγμένη μορφή της PCR που παρέχει απόλυτη κβαντική ανάλυση του DNA, χωρίς την ανάγκη για εξωτερικά πρότυπα. Η dPCR είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε πολύ χαμηλά επίπεδα, όπως σε περιπτώσεις όπου το DNA είναι σπάνιο ή λίγο (π.χ., σε περιπτώσεις καρκίνου).

Η dPCR επιτρέπει την απόλυτη ποσοτικοποίηση των στοχευμένων νουκλεϊκών οξέων που παρουσιάζονται σε ένα δείγμα και αντιμετωπίζει τις αδυναμίες της qPCR. (141) Στην dPCR, το δείγμα αρχικά διαμερίζεται σε πολλές ανεξάρτητες υπο-αντιδράσεις PCR, ώστε κάθε διαμέρισμα να περιέχει είτε λίγες είτε καθόλου στοχευμένες αλληλουχίες. Μετά την PCR, η αναλογία των διαμερισμάτων που έχουν θετική ενίσχυση χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης της στοχευμένης αλληλουχίας με στατιστικά καθορισμένη ακρίβεια χρησιμοποιώντας τη στατιστική του Πουασόν. (142) Η διαμερισματοποίηση του δείγματος συγκεντρώνει αποτελεσματικά τις στοχευμένες αλληλουχίες μέσα στους απομονωμένους μικροαντιδραστήρες. Αυτό το φαινόμενο συγκέντρωσης μειώνει τον ανταγωνισμό του προτύπου και έτσι επιτρέπει την ανίχνευση σπάνιων μεταλλάξεων σε ένα υπόβαθρο από φυσιολογικές αλληλουχίες. Επιπλέον, μπορεί επίσης να επιτρέψει μεγαλύτερη ανοχή στους αναστολείς που παρουσιάζονται στο δείγμα. (εικόνα 5.15)



Εικόνα 5.15. Αρχές της digital PCR (137)

Η κύρια διαφορά μεταξύ της dPCR και της qPCR βρίσκεται στη στρατηγική μέτρησης της ποσότητας της στοχευμένης αλληλουχίας. Στην qPCR, η αντίδραση παρακολουθείται σε όλη τη διαδικασία της ενίσχυσης και η ποσοτικοποίηση βασίζεται στην ανάλυση του φθοριστικού σήματος κατά την εκθετική φάση. Αντίθετα, η dPCR συλλέγει φθοριστικά σήματα μέσω τελικής μέτρησης και χρησιμοποιεί τον αριθμό των θετικών διαμερισμάτων σε σχέση με το συνολικό αριθμό για να υπολογίσει αντίστροφα τη συγκέντρωση του στόχου. Η dPCR μειώνει την ποσοτικοποίηση στην καταμέτρηση μιας σειράς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων, μετατρέποντας έτσι ένα συνεχές ή αναλογικό σήμα σε μια σειρά δυαδικών ή ψηφιακών σημάτων. Σε αντίθεση με την qPCR, η dPCR δεν βασίζεται σε καμπύλες βαθμονόμησης για την ποσοτικοποίηση του δείγματος. Επομένως, αποφεύγει τις παγίδες που σχετίζονται με τις διακυμάνσεις στις αποδόσεις των αντιδράσεων. (143) Η ποσοτικοποίηση με dPCR βασίζεται στην διωνυμική στατιστική που καθορίζει μαθηματικά την εγγενή ακρίβεια και τις μετρικές απόδοσής της.

Συνοπτικά, η dPCR είναι μια μέθοδος απόλυτης ποσοτικοποίησης νουκλεϊκών οξέων που βασίζεται στην ανίχνευση τελικών φθοριστικών σημάτων και στην καταμέτρηση διωνυμικών συμβάντων (απουσία (0) ή παρουσία (1) φθορισμού σε ένα διαμέρισμα). Αυτή η στατιστική βάση επιτρέπει την αναγνώριση των παραμέτρων που περιορίζουν τις μετρικές απόδοσης αυτής της αναλυτικής μεθόδου. Θεωρητικά, η dPCR προσφέρει πλεονεκτήματα έναντι της qPCR λόγω της αποτελεσματικής δυνατότητας διαμερισματοποίησης δειγμάτων και της στοχευμένης ενίσχυσης μεμονωμένων μορίων. Στην πράξη, η qPCR μπορεί ακόμη να υπερέχει της dPCR για συγκεκριμένες εφαρμογές χάρη στην υψηλότερη ευαισθησία. (144)

## 5.4. Microarrays (DNA chips)

Οι microarrays χρησιμοποιούνται για την ανάλυση μεταλλάξεων σε μεγάλο αριθμό γονιδίων ταυτόχρονα. Αυτή η μέθοδος είναι χρήσιμη για την αναγνώριση γενετικών πολυμορφισμών και μεταλλάξεων σε ευρύ φάσμα. Τα DNA chips που χρησιμοποιούνται στην τεχνική αυτή είναι μικρές, στερεές βάσεις όπως οι διαφάνειες μικροσκοπίου, στις οποίες τοποθετούνται χιλιάδες cDNA ή ολιγονουκλεοτίδια, αντιπροσωπεύοντας γνωστά γονίδια ή απλά κλώνους EST, ή καλύπτοντας ολόκληρη την αλληλουχία ενός γονιδίου με όλες τις πιθανές μεταλλάξεις του. Το DNA ή RNA επισημασμένο με φθορίζουσα ουσία, που έχει εξαχθεί από ιστούς υβριδίζεται με τον πίνακα. Η σάρωση του chip με λέιζερ επιτρέπει την ποσοτική αξιολόγηση κάθε ατομικής συμπληρωματικής αλληλουχίας που παρουσιάζεται στο δείγμα. Η τεχνολογία των DNA chips προτείνεται επί του παρόντος για ποιοτικές και ποσοτικές εφαρμογές, πρώτον για τον εντοπισμό των σημειακών μεταλλάξεων, των μικρών διαγραφών και των εισαγωγών σε γονίδια που εμπλέκονται σε ανθρώπινες ασθένειες ή επηρεάζονται κατά την πρόοδο του καρκίνου· δεύτερον, για να καθορίσει σε επίπεδο γονιδιώματος το μοτίβο της γονιδιακής έκφρασης σε όγκους, καθώς και σε πολλές πειραματικές καταστάσεις. Η εξαιρετική δύναμη των DNA chips έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ιατρική στο άμεσο μέλλον, τόσο στην μοριακή χαρακτηριστική των όγκων και των γενετικών ασθενειών όσο και στην ανακάλυψη και αξιολόγηση φαρμάκων. (145)

Η τεχνολογία DNA microarray είναι επαναστατική επειδή παρέχει μια πλατφόρμα για την εκτέλεση αναλύσεων έκφρασης σε επίπεδο γονιδιώματος σε διάφορα βιολογικά μοντέλα. Επειδή οι φυσιολογικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν περίπλοκα ρυθμιστικά δίκτυα που επηρεάζουν τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης, η χρήση των DNA microarrays για την ταυτόχρονη παρακολούθηση της αντίδρασης χιλιάδων γονιδίων επιτρέπει την παρατήρηση γονιδίων που δρουν με συντονισμένο τρόπο. Συγκεκριμένα, παράγονται είτε εκτυπώνοντας προ-συνθεσμένα cDNAs (500–2000 βάσεις) ή συνθέτοντας σύντομα ολιγονουκλεοτίδια (20–50 βάσεις) σε γυάλινες διαφάνειες μικροσκοπίου ή μεμβράνες. Τα cDNAs για microarrays μπορεί να περιλαμβάνουν πλήρης αλληλουχίες γονιδίων γνωστής λειτουργίας ή συλλογές cDNA αλληλουχιών που είναι μέρος ενός γονιδίου που προέρχονται από ετικέτες ακολουθίας που εκφράζονται (ESTs) αντιστοιχούν σε μηνύματα RNA άγνωστων γονιδίων. (146)

Οι μετρήσεις έκφρασης επιτυγχάνονται μέσω ανταγωνιστικού, ταυτόχρονου υβριδισμού ανεστραμμένων cDNA χρησιμοποιώντας μια μέθοδο διπλής χρωματικής φθορίζουσας ουσίας ή σύγκριση δύο δειγμάτων επισημασμένων με βιοτίνη ή ραδιενεργά, τα οποία υβριδίζονται σε διαφορετικά chips. Για παράδειγμα, μπορεί κανείς να συγκρίνει δύο διαφορετικούς ιστούς,

κανονικό έναντι παθολογικού ιστού ή κύτταρα που δεν έχουν λάβει θεραπεία έναντι κυττάρων που έλαβαν. Οι σαρωμένες εικόνες που αντιπροσωπεύουν τα δύο δείγματα στη συνέχεια επικαλύπτονται χρησιμοποιώντας ειδικό λογισμικό επεξεργασίας εικόνας που αναθέτει μια ένταση χρώματος αντίστοιχη με την ποσότητα της φθορίζουσας ή ραδιενεργού ακτινοβολίας. Η αναλογία της έντασης για ένα δείγμα σε σύγκριση με το άλλο χρησιμοποιείται ως μέτρο για το αν ένα γονίδιο διαφέρει σημαντικά (δηλαδή, ενεργοποιημένο ή ανασταλμένο) σε ένα δείγμα από το άλλο. (146)

### 5.5. Ανίχνευση ανώμαλων προτύπων μεθυλίωσης

Η μεθυλίωση του DNA, δηλαδή η προσθήκη μιας μεθυλομάδας σε κυτοσίνες και αδερίνες, ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων σε ένα επίπεδο που συνήθως αναφέρεται ως επιγενετικό, δηλαδή διατηρείται σταθερά κατά τις κυτταρικές διαιρέσεις. Στους ανθρώπους, η παραβατική μεθυλίωση του DNA συνδέεται με αρκετές κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου και των λεγόμενων διαταραχών εκτυπώματος, κάνοντάς την ένα ελκυστικό στόχο για διαγνωστικούς σκοπούς. Οι δοκιμασίες μεθυλίωσης του DNA έχουν γίνει η τυπική διαδικασία στη διάγνωση των διαταραχών εκτυπώματος, και πρόκειται να μεταφέρουν τη διαγνωστική και προγνωστική του καρκίνου στο επόμενο επίπεδο της μοριακής ιατρικής. (147)

Η μεθυλίωση του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) χαρακτηρίζεται από την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση C5 του κυκλικού δακτυλίου της πυριμιδίνης κυτοσίνης ή στη θέση N6 του δακτυλίου της πουρίνης αδερίνης. Αν και η μεθυλίωση του DNA ανακαλύφθηκε πριν αποκαλυφθεί η δομή του DNA, οι έρευνες για τις πολλαπλές λειτουργίες της στα ζωντανά οργανισμούς είναι ακόμα εν εξελίξει. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην πολυπλοκότητα των διαδικασιών που σχετίζονται με τη μεθυλίωση του DNA και στο γεγονός ότι η ανάλυση της μεθυλίωσης είναι δύσκολη. Στα βακτήρια, η μεθυλίωση των αδερινών και κυτοσινών χρησιμοποιείται ως μηχανισμός άμυνας που επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ του αμεθυλοποιημένου DNA εισβολικών βακτηριοφάγων και του μεθυλοποιημένου δικού τους DNA. Καθώς τα νεοσυντιθέμενα DNA μεθυλοποιούνται αμέσως, αυτό το χαρακτηριστικό του διατηρείται σταθερά κατά τη διαίρεση των κυττάρων. Επιπλέον, τα βακτήρια χρησιμοποιούν τα μοτίβα μεθυλίωσης του DNA για να μεταφέρουν πληροφορίες σχετικά με την έκφραση των γονιδίων από το μητρικό κύτταρο στα θυγατρικά, επιτρέποντας τη διατήρηση των αποκτηθέντων περιβαλλοντικών προσαρμογών σε διαδοχικές γενιές. (148) Αντίστοιχα, η μεθυλίωση του DNA μπορεί να οριστεί ως μια επιγενετική τροποποίηση, επειδή μεταδίδει

σχετικές πληροφορίες, οι οποίες δεν περιέχονται εντός της ίδιας της αλληλουχίας του DNA, στην επόμενη γενιά. Στους ανθρώπους, η μεθυλίωση περιορίζεται στα υπολείμματα κυτοσίνης και συναντάται κυρίως στα δινουκλεοτίδια κυτοσίνη-γουανίνη (CG), τα οποία συνήθως συντομογραφούνται ως «CpG». Αυτό το δινουκλεοτίδιο βρίσκεται σε όλο το γονιδίωμα, αλλά συναντάται με αυξημένα ποσοστά σε τμήματα 0,3-3 kb, τις λεγόμενες νησίδες CpG. Περίπου το 40% των ανθρώπινων γονιδίων περιέχει μια νησίδα CpG στην περιοχή του υποκινητή τους, και η μεθυλίωσή τους συνήθως συνδέεται με καταστολή της έκφρασης. Η μεθυλίωση του DNA θεσπίζεται και διατηρείται από τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs), με τις DNMT3A και DNMT3B να διαμεσολαβούν την de-novo μεθυλίωση και τη DNMT1 να διατηρεί την ήδη υπάρχουσα μεθυλίωση του DNA. (149)

Η μεθυλίωση του DNA εκπληρώνει τις εξής λειτουργίες στους ανθρώπους:

1. Ρύθμιση συγκεκριμένων γονιδίων: Για να διατηρηθεί η σωστή λειτουργία των κυτταρικών διαδικασιών, η έκφραση των γονιδίων πρέπει να ελέγχεται αυστηρά. Οι βραχυπρόθεσμες αλλαγές στα μοτίβα έκφρασης συνήθως επάγονται από παράγοντες μεταγραφής, ενώ η μακροπρόθεσμη ρύθμιση των γονιδίων επιτυγχάνεται μέσω ενός σύνθετου παιχνιδιού ρύθμισης της χρωματίνης και τροποποιήσεων. (147)
2. Γενετική εκτύπωση (Genomic imprinting): Η γενετική εκτύπωση αναφέρεται σε γονιδιωματικές περιοχές από τις οποίες εκφράζεται μόνο το πατρικό ή το μητρικό αλληλόμορφο. Αυτό το μοτίβο εκφραστικής εξάρτησης από τον γονέα προέλευσης διαμεσολαβείται από επιγενετικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένης της μεθυλίωσης του DNA, είτε του πατρικού είτε του μητρικού αλληλόμορφου. (150)
3. Αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος (lyonisation): Η μεθυλίωση του DNA εμπλέκεται στην αδρανοποίηση ενός από τα δύο αντίγραφα του X χρωμοσώματος που υπάρχουν στις γυναίκες, εξασφαλίζοντας παρόμοιες ποσότητες προϊόντων γονιδίων του X χρωμοσώματος τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά. (151)
4. Άμυνα του γονιδιώματος: Παρασιτικά στοιχεία του γονιδιώματος, όπως τα ρετροτρανσποζόν, αδρανοποιούνται μέσω της μεθυλίωσης της ακολουθίας του DNA τους, καθιστώντας τη μεθυλίωση του DNA έναν κύριο παράγοντα στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος. (147)

Λαμβάνοντας υπόψη τον καίριο ρόλο της στη ρύθμιση των γονιδίων και άλλων γενετικών στοιχείων, δεν είναι εκπληκτικό πως η παραβατική μεθυλίωση του DNA συνδέεται με πολλά νοσήματα. Για παράδειγμα, μη τυχαία αδρανοποίηση του X μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση

συνδρόμων Χ-συνδεδεμένων υπολειπόμενων ασθενειών σε φορείς γυναίκες, λόγω προτιμησιακής αδρανοποίησης του υγιούς αλληλόμορφου. Εναλλακτικά, συντονισμένες μεταλλάξεις στον μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να οδηγήσουν σε παραβατική μεθυλίωση του DNA και σε τροποποιημένα μοτίβα έκφρασης γονιδίων, ενώ γενετικές αλλαγές όπως οι μη κωδικοποιητικές επεκτάσεις τρινουκλεοτιδίων μπορεί να προκαλέσουν ασθένεια μέσω της σίγασης του αντίστοιχου γονιδίου. Τέλος, ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA σε κοινές διαταραχές, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, γίνεται όλο και πιο εμφανής. (147)

Οι δοκιμασίες για την ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA πρέπει να είναι ικανές να ανιχνεύσουν αυτή τη μικρή χημική τροποποίηση με τρόπο ειδικό για την ακολουθία, ένα καθήκον που δυσχεραίνεται από το γεγονός ότι η μεθυλίωση του DNA δεν αναπαράγεται (και έτσι δεν ενισχύεται) κατά τη διαδικασία της αντίδρασης αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR). Οι τεχνικές για την ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA μπορούν να κατηγοριοποιηθούν από το σύστημα ανίχνευσης μεθυλίωσης και τον αριθμό των περιοχών που ερευνώνται, με τα συστήματα ανίχνευσης να χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

1. Αντισώματα που δημιουργήθηκαν εναντίον μεθυλιωμένων κυτοσινών.
2. Θεραπεία με διθειάνθρακα που μετατρέπει τις αμεθυλιωμένες κυτοσίνες (αλλά όχι τις μεθυλιωμένες) σε ουρακίλη.
3. Ενδονουκλεάσες (ή ένζυμα περιορισμού) που κόβουν ειδικά στην παρουσία ή απουσία μεθυλίωσης.

Όσον αφορά τον αριθμό των περιοχών που αναλύονται, είναι εφικτό τα πάντα από μεμονωμένες κυτοσίνες μέχρι ολόκληρα μεθυλώματα (δηλαδή τη μεθυλιακή κατάσταση όλων των λόκων σε ολόκληρο το γονιδίωμα). (147)

## 5.6. Καρυότυπος (Karyotype)

Ο καρυότυπος είναι η διαδικασία διάταξης και αντιστοίχισης όλων των χρωμοσωμάτων ενός οργανισμού, προσφέροντας μια πανοραμική άποψη των χρωμοσωμάτων ενός ατόμου. Οι καρυότυποι προετοιμάζονται με χρήση τυποποιημένων διαδικασιών βαφής, αποκαλύπτοντας τα ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά κάθε χρωμοσώματος. Οι κλινικοί κυτταρογενετιστές αναλύουν ανθρώπινους καρυότυπους για να ανιχνεύσουν μεγάλες γενετικές αλλαγές, όπως ανευπλοειδίες και δομικές ανωμαλίες όπως διαγραφές και διπλασιασμούς. (152)

Οι καρυότυποι παρασκευάζονται από μιτωτικά κύτταρα που έχουν παραληφθεί στα στάδια μεταφάσης ή προμεταφάσης, όπου τα χρωμοσώματα είναι πιο συμπυκνωμένα. Για τη διάγνωση καρκίνου, χρησιμοποιούνται δείγματα από βιοψίες όγκων ή δείγματα μυελού των οστών. Για προγεννητική διάγνωση, χρησιμοποιούνται δείγματα αμνιακού υγρού ή χοριακών λοχιών. Τα χρωμοσώματα αυτά λαμβάνονται από τα κύτταρα και στη συνέχεια υπόκεινται σε επεξεργασία με ειδικές χρωστικές. Οι τεχνικές χρώσης που έχουν αναπτυχθεί, όπως η χρώση G (Giemsa) και R (αντίστροφη), επιτρέπουν την παραγωγή χαρακτηριστικών μοτίβων για τη διαφοροποίηση των χρωμοσωμάτων. Η χρώση G, πιο δημοφιλής στη Βόρεια Αμερική, χρησιμοποιεί τρυψίνη για την προετοιμασία των χρωμοσωμάτων πριν τη χρήση της, ενώ η χρώση R αναδεικνύει περιοχές πλούσιες σε γονίδια κοντά στα τελομερή. (152)

Η διάταξη των χρωμοσωμάτων σε καρυογράμματα συμβάλλει στην απλοποίηση της αναγνώρισης ανωμαλιών. Τα καρυογράμματα, που ταξινομούνται κατά μέγεθος και μορφολογία των χρωμοσωμάτων, είναι κρίσιμα για την ανίχνευση ανευπλοειδιών και άλλων δομικών αλλαγών. Η τεχνολογία προχωρά, με τις τεχνικές όπως η ανοσοϊστοχημεία (FISH) και η συγκριτική γονιδιωματική υβριδισμό (CGH) να επιτρέπουν περαιτέρω διερεύνηση γενετικών ανωμαλιών σε επίπεδο μεμονωμένων γονιδίων, ενισχύοντας την απόδοση και την ακρίβεια των διαγνώσεων. (152)

## 5.7. FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)

Η εισαγωγή της Φθορίζοντικής Υβριδοποίησης in Situ (FISH) σημάδεψε την αρχή μιας νέας εποχής για τη μελέτη της δομής και λειτουργίας των χρωμοσωμάτων. Ως μια τεχνική που συνδυάζει μοριακές και κυτταρολογικές προσεγγίσεις, η FISH προσφέρει μια μοναδική δυνατότητα μεσαίας ανάλυσης που γεφυρώνει το χάσμα μεταξύ της ανάλυσης του DNA και των χρωμοσωματικών μελετών, παρέχοντας παράλληλα πληροφορίες σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. Αυτή η μέθοδος ήταν ουσιαστική για τις δραστηριότητες χαρτογράφησης και αλληλούχισης στα πλαίσια του Έργου του Ανθρώπινου Γονιδιώματος λόγω της ακρίβειας και της ευελιξίας της. Με τα χρόνια, η FISH έχει εξελιχθεί σημαντικά, υποστηριζόμενη από βελτιώσεις στη φθορισμική μικροσκοπία, την ψηφιακή απεικόνιση και τη διαθεσιμότητα γενομικών και βιοπληροφορικών πόρων. Η διαφοροποίηση των πρωτοκόλλων FISH έχει οδηγήσει σε πολυάριθμες εφαρμογές στη βιολογική και ιατρική έρευνα, περιλαμβάνοντας μια ποικιλία διαγνωστικών δοκιμασιών με βάση τη FISH. (153)

Η εισαγωγή της φθορισμού *in situ* υβριδισμού (FISH) πριν από σχεδόν 30 χρόνια σηματοδότησε την αρχή μιας νέας εποχής για τη μελέτη της δομής και της λειτουργίας των χρωμοσωμάτων. Η FISH είναι μια απλή τεχνική που κατά βάση συνίσταται στον υβριδισμό μιας αλληλουχίας DNA με την αντίστοιχη αλληλουχία της σε χρωμοσώματα που έχουν προηγουμένως στερεωθεί σε διαφάνειες. Οι αλληλουχίες είναι είτε απευθείας επισημασμένες, μέσω της ενσωμάτωσης φθορίζοντων νουκλεοτιδίων, είτε έμμεσα, μέσω της ενσωμάτωσης μορίων ανιχνευτών που στη συνέχεια ανιχνεύονται από φθορίζοντα αντισώματα ή άλλα μόρια συγγένειας. Οι αλληλουχίες και οι στόχοι τελικά οπτικοποιούνται *in situ* μέσω ανάλυσης με μικροσκόπιο. Ως συνδυασμός μοριακής και κυτταρολογικής προσέγγισης, το μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της οπτικά ελκυστικής τεχνικής βρίσκεται στην μοναδική της ικανότητα να προσφέρει έναν μεσαίο βαθμό ανάλυσης μεταξύ της ανάλυσης DNA και των χρωμοσωματικών ερευνών, διατηρώντας παράλληλα πληροφορίες σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. (153)

Η FISH κέρδισε ευρεία αναγνώριση ως τεχνική φυσικής χαρτογράφησης για την υποστήριξη μεγάλης κλίμακας χαρτογραφήσεων και προσπαθειών αλληλούχισης που σχετίζονται με το έργο του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ωστόσο, η ακρίβεια και η προσαρμοστικότητα της FISH εκμεταλλεύτηκαν ταυτόχρονα, ή λίγο αργότερα, και σε άλλους τομείς της βιολογικής και ιατρικής έρευνας. Ως αποτέλεσμα, μια πληθώρα διαφορετικών εφαρμογών και διαγνωστικών δοκιμασιών βασισμένων στη FISH έχει αναπτυχθεί σε διάφορους τομείς έρευνας, συμπεριλαμβανομένων της κλινικής γενετικής, της νευροεπιστήμης, της αναπαραγωγικής ιατρικής, της τοξικολογίας, της μικροβιακής οικολογίας, της εξελικτικής βιολογίας, της συγκριτικής γονιδιωματικής, της κυτταρικής γονιδιωματικής και της χρωμοσωματικής βιολογίας. Η διαφοροποίηση του αρχικού πρωτοκόλλου FISH σε έναν εντυπωσιακό αριθμό διαδικασιών που είναι διαθέσιμες σήμερα έχει προωθηθεί μέσα στα χρόνια από μια σειρά αλληλένδετων παραγόντων, όπως η βελτίωση στην ευαισθησία, την ειδικότητα και την ανάλυση της τεχνικής, η οποία ήρθε από μια βαθύτερη κατανόηση των χημικών και φυσικών ιδιοτήτων των νουκλεϊκών οξέων και της χρωματίνης, μαζί με την πρόοδο στους τομείς της φθορισμικής μικροσκοπίας και της ψηφιακής απεικόνισης, καθώς και την αυξανόμενη διαθεσιμότητα γονιδιωματικών και βιοπληροφορικών πόρων. (153)

Η Φθορίζοντική Υβριδοποίηση *in Situ* (FISH) είναι μια κρίσιμη τεχνική για την ανάλυση κυτταρολογικών δειγμάτων, προσφέροντας ακριβή διαγνωστικά και προγνωστικά αποτελέσματα, ειδικά στον τομέα του καρκίνου. Παρά την υπάρχουσα παρανόηση ότι τα κυτταρολογικά δείγματα είναι λιγότερο κατάλληλα για μοριακές αναλύσεις βασισμένες σε

DNA σε σύγκριση με το υλικό όγκων που έχει σταθεροποιηθεί σε παραφίνη (FFPE), η FISH προσφέρει ξεκάθαρα πλεονεκτήματα όταν εφαρμόζεται σε κυτταρολογικά δείγματα. Τα κύτταρα στα κυτταρολογικά δείγματα έχουν ολόκληρους πυρήνες, προσφέροντας καλύτερη ποιότητα DNA για τις αναλύσεις FISH και επιτρέποντας απευθείας αξιολόγηση και ερμηνεία των σημάτων FISH, ειδικά για αναδιατάξεις και διαγραφές. (154)

Οι αναλύσεις FISH εφαρμόζονται σε μια ευρεία γκάμα διαγνωστικών κυτταρολογικών δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων των παραδοσιακών ή υγρών προετοιμασιών, καθώς και δειγμάτων που έχουν βαφτεί με Papanicolaou ή Giemsa. Οι τεχνικές FISH βοηθούν στην εντοπισμό των θετικών κυττάρων για να διευκρινιστούν αμφίβολες περιπτώσεις, όπως είναι οι ατυπικές κυτταρικές μορφές σε ουροποιητικά δείγματα ή σε περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα. (154)

Σημαντικοί τεχνικοί παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την επιτυχία των αναλύσεων FISH σε κυτταρολογικά δείγματα περιλαμβάνουν τη χρήση διαφανειών με ηλεκτροστατικό θετικό φορτίο για να αποφευχθεί η απώλεια κυττάρων κατά την προετοιμασία και την απολύμανση του DNA, καθώς και την ανάγκη για αυτόματη επανατοποθέτηση των στοχευμένων κυττάρων χρησιμοποιώντας λογισμικό επανατοποθέτησης με αυτοματοποιημένη σκηνή και φωτοτεκμηρίωση των κυττάρων πριν από την αποσκεπασμό και υβριδοποίηση του δείγματος. Αυτή η εστιασμένη αξιολόγηση FISH κάτω από οπτικό έλεγχο βελτιώνει την ευαισθησία και την ειδικότητα των αναλύσεων. (154)

Τέλος, η FISH παραμένει μια ζωτικής σημασίας διαγνωστική εργαλειοθήκη στην κυτταρολογία, προσφέροντας ιδιαίτερα ακριβείς εξετάσεις για τον εντοπισμό και την αξιολόγηση γενετικών ανωμαλιών σε διάφορες καρκινικές και μη καταστάσεις. Οι ιδιαιτερότητες της εφαρμογής της FISH σε κυτταρολογικά δείγματα, όπως η δυνατότητα επιλογής του κατάλληλου κυτταρικού υλικού και η αξιοποίηση της μορφολογικής τους εμπειρίας, καθιστούν τους κυτταροπαθολόγους και τους κυτταροτεχνολόγους απαραίτητους στη διαδικασία της μοριακής δοκιμασίας. (154)

## 5.8. CGH (Comparative Genomic Hybridization)

Η συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση (Comparative Genomic Hybridization - CGH) είναι μια νεότερα περιγραφόμενη μοριακή-κυτταρογενετική δοκιμασία που εξετάζει σε παγκόσμιο επίπεδο τους διπλασιασμούς και τις απώλειες χρωμοσωμάτων σε ένα γονιδιωματικό συμπλήρωμα. Σε αυτή τη δοκιμασία, φυσιολογικά χρωμοσώματα μεταφάσης

του ανθρώπου υβριδοποιούνται ανταγωνιστικά με δύο διαφορετικά επισημασμένα γονιδιωματικά DNA (δοκιμαστικό και αναφοράς), τα οποία μέσω φθορισμικής μικροσκοπίας αποκαλύπτουν τις χρωμοσωματικές τοποθεσίες των αλλαγών αριθμού αντιγράφων στις αλληλουχίες DNA μεταξύ των δύο συμπληρωμάτων. (155)

Η εφαρμογή της CGH σε DNA που έχει εξαχθεί από φρεσκοπαγωμένα δείγματα και κυτταρικές γραμμές διαφόρων τύπων όγκων έχει αποκαλύψει αρκετές επαναλαμβανόμενες χρωμοσωματικές αποκτήσεις και απώλειες που δεν είχαν ανιχνευθεί από την παραδοσιακή κυτταρογενετική ανάλυση. Λίγες προηγουμένως γνωστές θέσεις βρέθηκαν να έχουν αυξημένο αριθμό αντιγράφων ή να έχουν χαθεί μέσω της CGH, ενώ πολλές νέες ενισχυμένες περιοχές ταυτοποιήθηκαν. Αυτές οι περιοχές απαιτούν περαιτέρω μοριακές γενετικές μελέτες με στόχο τον εντοπισμό των διαταραγμένων γονιδίων. Επειδή η CGH μπορεί επίσης να εκτελεστεί σε DNA που έχει εξαχθεί από δείγματα όγκου που έχουν διατηρηθεί σε φορμαλίνη και είναι ενσωματωμένα σε παραφίνη με λίγες τροποποιήσεις, μπορούν να καθοριστούν οι διπλασιασμοί και οι απώλειες γενετικού υλικού για δείγματα που διαφορετικά θα ήταν αδύνατο να αναλυθούν. Η προοπτική και αναδρομική εφαρμογή της CGH σε δείγματα όγκων θα επέτρεπε τη διεξαγωγή συσχετιστικών μελετών, πιθανόν να αναγνωρίζονται διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες της νόσου. Επίσης, η CGH μπορεί να έχει μελλοντικό ρόλο στην ανίχνευση και ταυτοποίηση χρωμοσωματικών ανωμαλιών στην προγεννητική διάγνωση και σε δυσμορφικές ανωμαλίες. (155)

Η διαδικασία της CGH περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

Εξαγωγή DNA: Το DNA εξάγεται από το δείγμα που είναι υπό έρευνα (test DNA) και από ένα φυσιολογικό δείγμα αναφοράς (reference DNA).

Επισήμανση του DNA: Τα DNA και από τα δύο δείγματα επισημαίνονται διαφορετικά, συνήθως το ένα με πράσινη και το άλλο με κόκκινη φθορίζουσα χρωστική, χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως η απευθείας ενσωμάτωση φθορίζουσών νουκλεοτιδίων.

Υβριδοποίηση: Τα επισημασμένα δείγματα DNA συμπυκνώνονται και συνυβρίζονται σε μια μικροσκοπική διαφάνεια που φέρει ολόκληρο το ανθρώπινο γονιδίωμα υπό μορφή αλληλουχίας.

Ανάλυση: Μετά την υβριδοποίηση, τα δείγματα αναλύονται με φθορισμικό μικροσκόπιο. Η σχετική ένταση της φθορίζουσας σήμανσης από τις δύο διαφορετικές χρωστικές αντιπροσωπεύει την ποσότητα του DNA από κάθε δείγμα σε κάθε χρωμοσωμική περιοχή. Ένα

υπερβολικό σήμα από ένα χρωματικό σήμα έναντι του άλλου υποδεικνύει μια αύξηση ή μείωση στον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου σε εκείνη την περιοχή.

Ερμηνεία: Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται με βάση τη σχετική αναλογία των φθορίζοντων σημάτων μεταξύ των δύο δειγμάτων. Αυτό επιτρέπει την ανίχνευση των γονιδιακών ανισοζυγιών και παρέχει πληροφορίες για γονιδιακές απώλειες ή ενισχύσεις που μπορεί να συνδέονται με παθολογικές καταστάσεις, όπως καρκίνος.

Η CGH είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για τη γονιδιωματική ανάλυση γιατί προσφέρει μια γενική επισκόπηση των γονιδιακών αλλαγών σε ένα γονιδίωμα, αντί να περιορίζεται σε ειδικά γονίδια ή περιοχές. Η χρήση της CGH μπορεί να βοηθήσει τους ερευνητές και τους κλινικούς ιατρούς να κατανοήσουν καλύτερα τις γονιδιακές βάσεις των ασθενειών και να αναπτύξουν πιο στοχευμένες θεραπείες. (155)

## 5.9. SNP array (Single Nucleotide Polymorphism array)

Οι SNP arrays ανιχνεύουν μεταβολές σε μεμονωμένα νουκλεοτίδια και είναι χρήσιμοι για την ανίχνευση αλλαγών στον αριθμό αντιγράφων καθώς και μικρών δομικών ανωμαλιών. Για την ανάπτυξη της τεχνικής αυτής απαιτούνται τεχνικές βιοπληροφορικής που επιτρέπουν τη δημιουργία πλατφόρμας, μέσω της οποίας μπορεί να γίνει η συσχέτιση μεταξύ των γονιδιωμάτων.

Οι SNPs έχουν αναδειχθεί ως ο γενετικός δείκτης επιλογής για τον χαρτογραφημένο εντοπισμό νόσων και τις μελέτες συσχέτισης υποψήφιων γονιδίων, λόγω της υψηλής πυκνότητας και της σχετικά ομοιόμορφης κατανομής τους στα ανθρώπινα γονιδιώματα. Υπάρχει ανάγκη για συστήματα που επιτρέπουν τη μέτρια πολυπλοκότητα (δέκα έως εκατοντάδες SNPs) με υψηλή επεξεργαστική ικανότητα, τα οποία μπορούν να παράγουν αποτελεσματικά και οικονομικά αποδοτικά αποτελέσματα γονοτύπων για πολύ μεγάλα σύνολα δειγμάτων (χιλιάδες ατόμων). (156) Χρειάζονται μέθοδοι που είναι ευέλικτοι, γρήγοροι, ακριβείς και οικονομικά αποδοτικοί. Αυτό έχει οδηγήσει σε απαίτηση για πλατφόρμες γονοτυποποίησης SNP υψηλής απόδοσης. (157)

Η ανάπτυξη μιας επιτυχημένης πλατφόρμας υψηλής απόδοσης εξαρτάται από τον συνδυασμό αξιόπιστης δοκιμής με ένα κατάλληλο σύστημα ανίχνευσης για την μεγιστοποίηση της αποδοτικότητας ως προς την ακρίβεια, την ταχύτητα και το κόστος. Οι τρέχουσες τεχνολογικές πλατφόρμες μπορούν να παραδώσουν πάνω από 100.000 γονοτυποποιήσεις την ημέρα, με

ακρίβεια πάνω από 99%, σε κόστος 20-30 σεντς ανά γονότυπο. Για να ανταποκριθούν στις απαιτήσεις των επερχόμενων ετών, οι πλατφόρμες γονοτυποποίησης πρέπει να παραδώσουν απόδοση της τάξης ενός εκατομμυρίου γονοτυποποιήσεων την ημέρα με κόστος μόνο λίγων σεντς ανά γονότυπο. Επιπλέον, πρέπει να μειωθούν οι απαιτήσεις για DNA ώστε να μπορούν να εξεταστούν εκατοντάδες χιλιάδες SNP χρησιμοποιώντας σχετικά μικρή ποσότητα γονιδιωματικού DNA. Έτσι, προβλέπεται ότι η επόμενη γενιά πλατφορμών υψηλής απόδοσης θα εκμεταλλεύεται αντιδράσεις μεγάλης κλίμακας πολυπλεξίας και συστήματα ανίχνευσης ανάλυσης στερεάς φάσης. (157)

Κάθε μία από αυτές τις τεχνικές έχει τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς της, και η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από τον σκοπό της διερεύνησης, την ποιότητα του διαθέσιμου δείγματος και τους διαθέσιμους πόρους.

Πίνακας 5.9. Τεχνικές εντοπισμού μεταλλάξεων συγκεντρωτικά

Τεχνική	Περιγραφή	Χρήση
Αλληλούχιση κατά Sanger	Παραδοσιακή μέθοδος αλληλούχισης DNA που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση μεταλλάξεων.	Χρησιμοποιείται για την αλληλούχιση μικρών τμημάτων DNA και την ταυτοποίηση συγκεκριμένων μεταλλάξεων.
Next Generation Sequencing (NGS)	Προηγμένη μέθοδος αλληλούχισης που επιτρέπει την ταχεία και ακριβή ανάλυση μεγάλων τμημάτων του γονιδιώματος.	Χρησιμοποιείται για τη λεπτομερή ανάλυση του γονιδιώματος, την ανίχνευση μεταλλάξεων και την εξέταση της ποικιλομορφίας του DNA.
Κλασική PCR	Βασική μορφή PCR για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του DNA.	Χρησιμοποιείται για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του DNA.
Real-Time PCR	Επέκταση της PCR που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του DNA σε πραγματικό χρόνο.	Χρησιμοποιείται για την ποσοτική ανάλυση του DNA, συνήθως για την εκτίμηση της γονιδιακής έκφρασης.
Allele-Specific PCR (AS-PCR)	Μέθοδος PCR που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με βάση την παρουσία ή απουσία αλληλομόρφου.	Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA που φέρουν μεταλλάξεις.
Multiplex PCR	Επέκταση της PCR που επιτρέπει την ταυτόχρονη	Χρησιμοποιείται για την ταυτόχρονη ανάλυση

	ανάλυση πολλαπλών στόχων σε ένα δείγμα.	πολλαπλών γονιδίων σε ένα δείγμα.
PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	Μέθοδος ανάλυσης μεταλλάξεων βάσει της διάσπασης του DNA με ειδικά ένζυμα περιορισμού.	Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση γενετικών παραλλαγών και μεταλλάξεων μέσω της ανάλυσης των μοτίβων διάσπασης του DNA.
Digital PCR (dPCR)	Προηγμένη μορφή PCR που επιτρέπει την ακριβή ποσοτικοποίηση των μορίων DNA.	Χρησιμοποιείται για την ακριβή ποσοτικοποίηση των μορίων DNA.
Microarrays (DNA chips)	Τεχνολογία που χρησιμοποιείται για την ανάλυση έκφρασης γονιδίων και ανίχνευση γονιδιακών παραλλαγών.	Χρησιμοποιείται για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης και την ανίχνευση γονιδιακών παραλλαγών.
Ανίχνευση ανώμαλων προτύπων μεθυλίωσης	Μέθοδος για την ανίχνευση ανώμαλων προτύπων μεθυλίωσης του DNA.	Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αλλαγών μεθυλίωσης σε γονιδιακές περιοχές.
Καρυότυπος (Karyotype)	Μέθοδος για την ανάλυση του αριθμού και της δομής των χρωμοσωμάτων.	Χρησιμοποιείται για την ανάλυση του αριθμού και της δομής των χρωμοσωμάτων.
FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)	Μέθοδος για την ανίχνευση και την τοπική αλληλούχιση συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος με τη χρήση φθορίζοντων ανιχνευτών.	Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τοπική αλληλούχιση συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος.
CGH (Comparative Genomic Hybridization)	Μέθοδος για τη σύγκριση του γονιδιώματος ενός δείγματος με ένα πρότυπο γονιδίωμα.	Χρησιμοποιείται για τη σύγκριση του γονιδιώματος ενός δείγματος με ένα πρότυπο γονιδίωμα.
SNP array (Single Nucleotide Polymorphism array)	Μέθοδος για την ανίχνευση μονοκλωνικών πολυμορφισμών στο DNA.	Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μονοκλωνικών πολυμορφισμών στο DNA.

## Βιβλιογραφία

1. **Schrader, T.J.** *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition(Second Edition)*,. 2003.
2. **Lijinsky, W., P. Shubik.** Benzo(a)pyrene and other polynuclear hydrocarbons in charcoal-broiled meat. *Science*. 1964., 145:53-55.
3. **Lijinsky, W., Ross A. E.** Production of carcinogenic polynuclear hydrocarbons in the cooking of food. *Food Cosmet. Toxicol.* 1967., 5:343-347.
4. **Howard, J. W., and T. Fazio.** Analytical methodology and reported findings of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* . 1980. , 63:1077-1104.
5. **Nagao, M., M. Honda, Y. Seino, T. Yahagi, and T. Sugimura.** Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat. *Cancer Lett.* 1977., 2:221-226.
6. **Nagao, M., M. Honda, Y. Seino, T. Yahagi, T. Kawachi, and T. Sugimura.** Mutagenicities of protein pyrolysates. . *Cancer Lett.* . 1977., 2:335-340.
7. **National Research Council (US)** . Committee on Diet, Nutrition, and Cancer. *National Academies Press (US)*; . Washington (DC): , 1982.
8. **ΑδαμόπουλοςΠ, Ν.** . *Εισαγωγή στην προληπτική ιατρική*. s.l. : Επιστημονικές εκδόσεις Γρ. Κ. Παρισιανός, (1988). σελ. 22, 92- 96, 116, 221, 246-266..
9. **Wang XQ, Terry PD, Yan H.** Review of salt consumption and stomach cancer risk:epidemiological and biological evidence. *World J Gastroenterol.* . 2009, May 14;15(18):2204-13.
10. **Strnad M.** Salt and cancer. *Acta Med Croatica.* 2010, May;64(2):159-61.
11. **Willet WC.** Diet and cancer. *The Oncol.* 2000, 5:394-404.
12. **Γεωργούλιας Β.** *Διατροφή. Οικογενειακή Ιατρική εγκυκλοπαίδεια*. s.l. : Εκδόσεις Όμιλος Μανιατέα., 2006. σελ. 27- 39.
13. **Cantor KP.** Drinking water and cancer. *Cancer Causes Control.* 1997, 8:292- 308.
14. **Chung, King-Thom.** Occurrence, uses, and carcinogenicity of arylamines. *Front Biosci (Elite Ed)*. 1 Jan 2015, σσ. 322-45.

15. **International Agency for Research on Cancer.** Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, . 2004, vol 83. FR, pp 53–119.
16. **Hoffmann D, Hecht SS.** Advances in tobacco carcinogenesis. . *Handbook of experimental pharmacology*. 1990, Vol 94. 63–102.
17. **Thun MJ, Day-Lally CA, Calle EE and Flanders WS:.** Excess mortality among cigarette smokers: changes in a 20-year interval. *J Pub Health*. 1995; 85(9): 1223-1230.
18. **Alberg A.** The influence of cigarette smoking on circulating concentrations of antioxidant micronutrients. *Toxicology*. 2002, 180:121-37.
19. **Research., World Cancer Research Fund and American institute for Cancer.** *Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective*. . Washington DC: : AICR, 2007.
20. **Gronbaek M, Becker U, Johansen D, et al.** Population based cohort study of the association between alcohol intake and cancer of the upper digestive tract. *BMJ*. 1998, 317:844-7.
21. **Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, et al.** Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med*. 2004, 140:603-13.
22. *Indoor air pollution in developing countries. In: Samet JM (Ed.). Epidemiology of Lung Cancer. Lung Biology in Health and Disease. Smith KR, Liu Y.* New York : Marcel Dekker, 1994, Τόμ. Vol. 74. pp. 151- 84.
23. **Turusov V, Ratisky V, Tomatis L:.** "Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence and risks". *Environ Health Perspect*. 2002, 110, 125-128.
24. **Fedeli U., Girardi P., Mastrangelo G.** Occupational exposure to vinyl chloride and liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2019, Sep 7;25(33):4885-4891.
25. **Golding BT, Bleasdale C, MacGregor JO, Nieschalk J, Pearce K, Watson WP:.** "Chemistry of muconaldehydes of possible relevance to the toxicology of benzene". *Environmental Health Perspectives*. 1996, 104:1201-1209.

26. **Αλεπόρου, Β, Αργυροκαστρίτης, Α., Κομητοπούλου, Α., Πιαλόγλου, Π., Σγουρίτσα, Β.** *Βιολογία Ομάδας Προσανατολισμού Θετικών Σπουδών Γ'τάξης Γενικού Λυκείου.* . s.l. : Διόφαντος, 2017.
27. **Hall.** *Radiobiology for the Radiologist.* 4th ed., 9-10..
28. **Bajaj N.S., Joshi R.A.** in *Energy Materials Fundamentals to Applications.* s.l. : Elsevier, 2021. 978-0-12-823710-6. Pages 61-82.
29. **RUTHERFORD, LORD.** Origin of the Gamma Rays. *Nature.* 1932, 129, pages457–458.
30. **Stark, Glenn.** gamma ray. *Britannica.* Mar 19, 2024.
31. **Collum, Bill.** Radiation. *Nuclear Facilities.* 2017.
32. **International Agency for Research on Cancer.** Ionizing Radiation, Part 2: Some Internally Deposited Radionuclides. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.* IARC:Lyon, 2001, Vol. 83.
33. **Goldberg Z, Lehnert BE.** Radiation-induced effects in unirradiated cells: A review and implications in cancer. *Int J Oncol.* 2003, 21:337-349.
34. **Petridou E, Trichopoulos D, Dessypris N, Flytzani V, Haidas S, Kalmanti M, Kolioukas D, Kosmidis H, Piperopoulou F, Tzortzatou F.** Infant leukaemia after in utero exposure to radiation from Chernobyl. *Nature.* 1996, 382:352- 3.
35. **Whiteman DC, Green AC. Int J.** Melanoma and sun exposure: where are we now? *Int J Dermatol.* 1999; , 38:481- 9.
36. **Franceschi S, Levi F, Randimbison L, La Vecchia C.** Site distribution of different types of skin cancer: new etiological clues. *Int J Cancer.* 1996, 67:24- 8.
37. **English DR, Armstrong BK, Kricker A, Winter MG, Heenan PJ, Randell PL.** Case control study of sun exposure and SCC of the skin. *Int J Cancer.* 1998, 77:347- 53.
38. **Green A, MacLennan R, Youl P, Martin N.** Site distribution of cutaneous melanoma in Queensland. *Int J Cancer.* 1993, 53:232- 6.
39. **Poole C., Ozonoff D.** Magnetic fields and childhood cancers. *IEEE Eng. Med. Biol.* 1996, 15:41–49.

40. **IARC.** Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Non-ionizing radiation, Part 1: static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields,. 2002, 429 ISBN 92 832 1280 0.
41. **Simkò M., Mattsson M.O.** Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: possible immune cell activation. *J. Cell. Biochem.* . 2004;, 93:83–92.
42. **Consales C., Merla C., Marino C., Benassi B.** Electromagnetic fields, oxidative stress and neurodegeneration. . *Int J. Cell Biol.* 2012, 2012:683897.
43. **Jia C., Wang Q., Yao X., Yang J.** The Role of DNA Damage Induced by Low/High Dose Ionizing Radiation in Cell Carcinogenesis. *Exploratory Research and Hypothesis in Medicine* . 2021, 6(4):177-184.
44. **Firsanov D., Solovjeva L., Svetlova M.** H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues. *Clinical Epigenetics.* 2011, 2, pages283–297.
45. **Iacovoni JS, et al.** High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J.* . 2010, 29:1446–1457.
46. **Arnould C., Rocher V., Finoux A., Clouaire T., Li K., Zhou F., Caron P., Mangeot P., Ricci E., Mourad R., Haber J., Noordermeer D., Legube G.** Loop extrusion as a mechanism for DNA damage repair foci formation. *Nature.* 2021, 590(7847): 660–665.
47. **Chang L-H, Ghosh S, Noordermeer D.** Tads and their borders: free movement or building a wall? . *J Mol Biol.* . 2020, 432:643–652.
48. **Meisenberg C, et al.** Repression of Transcription at DNA Breaks Requires Cohesin throughout Interphase and Prevents Genome Instability. . *Mol Cell.* 2019, 73:212–223.e7.
49. **Wutz G, et al.** Topologically associating domains and chromatin loops depend on cohesin and are regulated by CTCF, WAPL, and PDS5 proteins. . *EMBO J.* . 2017, 36:3573–3599.
50. **Kim S-T, Xu B, Kastan MB.** Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. . *Genes Dev.* . 2002, 16:560–570.

51. **Kim Y, Shi Z, Zhang H, Finkelstein IJ, Yu H.** Human cohesin compacts DNA by loop extrusion. *Science*. 2019, 366:1345–1349.
52. **Li K, Bronk G, Kondev J, Haber JE.** Yeast ATM and ATR kinases use different mechanisms to spread histone H2A phosphorylation around a DNA double-strand break. . *Proc Natl Acad Sci USA*. . 2020 .
53. **Wright WD, Shah SS, Heyer WD.** Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*. 2018, 293(27):10524–10535.
54. **Guirouilh-Barbat J, Lambert S, Bertrand P, Lopez BS.** Is homologous recombination really an error-free process? . *Front Genet*. . 2014., 5:175. .
55. **Makharashvili N, Paull TT.** CtIP: A DNA damage response protein at the intersection of DNA metabolism. . *DNA Repair*. . 2015. , 32:75–81.
56. **Moynahan ME, Jasin M.** Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. . 2010, 11(3):196–207. eng.
57. **Bhargava R, Onyango DO, Stark JM.** Regulation of single-strand annealing and its role in genome maintenance. *Trends Genet*. . 2016. , 32(9):566–575.
58. **Elliott B, Richardson C, Jasin M.** Chromosomal translocation mechanisms at intronic alu elements in mammalian cells. . *Mol Cell*. . 2005. , 17(6):885–894. eng. .
59. **Argueso JL, Westmoreland J, Mieczkowski PA, Gawel M, Petes TD, Resnick MA.** Double-strand breaks associated with repetitive DNA can reshape the genome. . *Proc Natl Acad Sci USA*. . 2008. , 105(33):11845–11850.
60. **Nickoloff J., Sharma N., Allen Ch., Taylor L., Allen S., Jaiswal A., Robert Hromas R.** Roles of Homologous Recombination in Response to Ionizing Radiation-Induced DNA Damage. *Int J Radiat Biol*. . 2023; , 99(6): 903–914.
61. **Nickoloff JA.** Paths from DNA damage and signaling to genome rearrangements via homologous recombination. *Mutat Res*. 2017., 806:64–74.
62. **Zhao F, Kim W, Kloeber JA, Lou Z.** DNA end resection and its role in DNA replication and DSB repair choice in mammalian cells. *Exp Mol Med*. 2020, 52(10):1705–1714. .
63. **Tutt A, Bertwistle D, Valentine J, Gabriel A, Swift S, Ross G, Griffin C, Thacker J, Ashworth A.** Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA

double-strand breaks occurring between repeated sequences. . *EMBO J.* . 2001. , 20:4704–4716.

64. **Chandramouly G, Kwok A, Huang B, Willis NA, Xie A, Scully R.** BRCA1 and CtIP suppress long-tract gene conversion between sister chromatids. . *Nat Commun.* . 2013. , 4:2404. .

65. **Shrivastav M, Miller CA, De Haro LP, Durant ST, Chen BP, Chen DJ, Nickoloff JA.** 2009. DNA-PKcs and ATM co-regulate DNA double-strand break repair. . *DNA Repair.* 8(8):920–929. eng.

66. **Amangyeld T, Shin YK, Lee M, Kwon B, Seo YS.** Human MUS81-EME2 can cleave a variety of DNA structures including intact Holliday junction and nicked duplex. . *Nucleic Acids Res.* . 2014., 42(9):5846–5862.

67. **Ward JF.** Complexity of damage produced by ionizing radiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2000., 65:377–382. eng.

68. **Lee SE, Moore JK, Holmes A, Umez K, Kolodner RD, Haber JE.** Saccharomyces Ku70, Mre11/Rad50, and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. . *Cell.* 1998, 94(#3):399–409.

69. **Malacaria E, Honda M, Franchitto A, Spies M, Pichierri P.** Physiological and pathological roles of RAD52 at DNA replication forks. . *Cancers.* . 2020. , 12(2).

70. **Appanah R, Jones D, Falquet B, Rass U.** Limiting homologous recombination at stalled replication forks is essential for cell viability: DNA2 to the rescue. . *Curr Genet.* 2020., 66(6):1085–1092.

71. **Pepe A, West SC.** MUS81-EME2 promotes replication fork restart. . *Cell Rep.* . 2014, 7(4):1048–1055.

72. **Malacaria E, Franchitto A, Pichierri P.** SLX4 prevents GEN1-dependent DSBs during DNA replication arrest under pathological conditions in human cells. . *Sci Rep.* . 2017, 7:44464. .

73. **Pannunzio N., Watanabe G., Lieber M.** Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2018, Jul 6; 293(27): 10512–10523.

74. **Han W., Yu K. N.** *Ionizing Radiation, DNA Double Strand Break and Mutation*. Hong Kong : Nova Science Publishers, Inc, 2010. ISBN 978-1-61728-764-0.
75. **Beucher A., Birraux J., Tchouandong L., Barton O., Shibata A., Conrad S., Goodarzi A. A., Krempler A., Jeggo P. A., and Löbrich M.** ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. . *EMBO J.* . 2009, 28, 341.
76. **R., Lieber M.** The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* . 2010, 79, 181–211.
77. **Chang H. H. Y., Pannunzio N. R., Adachi N., and Lieber M. R.** Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. . *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* . 2017, 18, 495–506.
78. **Arnoult N., Correia A., Ma J., Merlo A., Garcia-Gomez S., Maric M., Tognetti M., Benner C. W., Boulton S. J., Saghatelian A., and Karlseder J.** Regulation of DNA repair pathway choice in S and G2 phases by the NHEJ inhibitor CYREN. *Nature* . 2017, 549, 548–5.
79. **I. P. Κούβαρης.** *Συνοπτική Ακτινοθεραπευτική ογκολογία*. Αθήνα : s.n., 2010.
80. *The Local Effect Model-Principles and Applications.* . **T. Friedrich, M. Durante & M. Scholz.**, Germany : s.n., 2013.
81. *The Physical and Radiobiological Basis of the Local Effect Model (LEM): A Response to the Commentary by R. Katz.* **M. Scholz & G. Kraft,** . Germany. : s.n., 2004.
82. **R. B. Hawkins.** A microdosimetric-kinetic model of cell death from exposure to ionizing radiation of any LET, with experimental and clinical applications. *Int. J. Radiat. Biol.* 1996, Vol. 69, No. 6, 739 – 755.
83. **Y. Chen et al.** A modified microdosimetric kinetic model for relative biological effectiveness calculation. *Phys. Med. Biol.* . 2018, 63 015008.
84. **Mavragani I., Nikitaki Z., Kalospyros S., Georgakilas A.** Ionizing Radiation and Complex DNA Damage: From Prediction to Detection Challenges and Biological Significance. *Cancers*. 2019, 11(11), 1789.

85. **Bouzy B., Helmstetter B.** Advances in Computer Games 10: Many Games, Many Challenges. al, H.v.d.H.e. *Kluwer; Boston, MA, USA:* . 2003, pp. 159–174. .
86. **El Naqa I., Pater P., Seuntjens J.** Monte Carlo role in radiobiological modelling of radiotherapy outcomes. . *Phys. Med. Biol.* . 2012, 57:R75–R97.
87. **Sutherland B., Bennet P. V., Sidorkina O., Laval J.** DNA damage clusters induced by ionizing radiation in isolated DNA and in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000, 97: 103-108.
88. **Hada M., Georgakilas A.** Formation of clustered DNA damage after high -LET irradiation: A Review. *J. Radiat. Res.* 2008, 49, 203-210.
89. *Health Effects of Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation: Beir V. National Research Council (US) Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiation (BEIR V).* Washington (DC) : s.n., 1990, Τόμ. National Academies Press (US).
90. *Recommendations: ICRP Publication No. 60. International Commission on Radiological Protection.* s.l. : quoted in Hall, Radiobiology for the Radiologist. 4th ed., 455.
91. *Radiation-induced mutations pass down through generations.* **Yang, Benjamin.** May 13, 2009, Τόμ. Discovery Medicine.
92. **United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation.** *Periodic reports on sources and effects of ionizing radiation.*
93. **Lehnert, S.** Biomolecular Action of Ionizing Radiation. *Taylor and Francis Group.* LLC, 2007.
94. *Nature of lesions formed by ionizing radiation. In DNA damage and Repair.* **Ward, J.E.** Totowa NJ : Human Press, 1998, Τόμ. Vol. 2.
95. **Dahm-Daphi, J., Sass, C., Albert, W.** *Int. J. Radiat. Biol.* 2000, Τόμ. 76, 67–75.
96. **Collis, S.J., DeWeese, T.L., Jeggo, P.A., Parker, A.R.** *Oncogene.* 2005, Τόμ. 24, 949–61. .
97. **Dubrova Y., Plumb M., Gutierrez B., Boulton E., Jeffreys A.** Transgenerational mutation by radiation. *Nature.* 2000, 405, page37.

98. **Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi MB and Sinha RP.** Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids*. 2010 Dec , 16;2010:592980.
99. **Ravanat JL, Douki T and Cadet J.** Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B*. 2001, Oct;63(1-3):88-102.
100. *Comparing DNA damage induced by mobile telephony and other types of man-made electromagnetic fields.* **Panagopoulos DJ.** *Mutat Res Rev Mutat Res* : s.n., 2019. 781:53–62..
101. *Human-made electromagnetic fields: Ion forced-oscillation and voltage-gated ion channel dysfunction, oxidative stress and DNA damage (Review).* **Panagopoulos D, Karabarounis A., Yakymenko I, Chrousos G.** *Int J Oncol* : s.n., 2021 Nov;. 59(5): 92..
102. *Melanoma incidence and frequency modulation (FM) broadcasting.* **Hallberg O, Johansson O.** *Arch Environ Health*. : s.n., 2002. 57:32–40.
103. **Irigaray P, Caccamo D, Belpomme D.** Oxidative stress in electrosensitivity self-reporting patients: Results of a prospective in vivo investigation with comprehensive molecular analysis. *Int J Mol Med*. 2018, 42:1885–1898.
104. **Yakymenko I, Tsybulin O, Sidorik E, Henshel D, Kyrylenko O, Kyrylenko S.** Oxidative mechanisms of biological activity of low-intensity radiofrequency radiation. . *Electromagn Biol Med*. . 2016, 35:186–202.
105. **Falcioni L, Bua L, Tibaldi E, Lauriola M, De Angelis L, Gnudi F, Mandrioli D, Manservigi M, Manservigi F, Manzoli I, et al.** Report of final results regarding brain and heart tumors in Sprague-Dawley rats exposed from prenatal life until natural death to mobile phone radiofrequency field representative of a 1.8 GHz GSM base station environmental emission. *Environ Res*. 2018, 165:496–503.
106. **International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection .** Guidelines for limiting exposure to electromagnetic fields (100 kHz to 300 GHz) . *Health Phys*. 2020, 118:483–524.
107. **Panagopoulos DJ.** Comments on Pall's 'Millimeter (MM) wave and microwave frequency radiation produce deeply penetrating effects: The biology and the physics'. *Rev Environ Health*. Jul 12, 2021.
108. **Thacker, J.** *Mutat. Res*. 1986, Τόμ. 160, 267-75. .

109. **Basu AK.** DNA damage, mutagenesis and cancer. *Int J Mol Sci.* 2018, 19:970.
110. **Iyama T., Wilson D.** DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst).* 2013 Aug, 12(8): 620–636.
111. **AR., Lehmann.** DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie.* 2003, 85:1101–1111.
112. **Goswami M., VanDenBerg K., Han S., Wang L., Singh B., Weiss T., Barlow M., Kamberov S., Wilder-Romans K., Rhodes D., Feng F., Tomlins S.** Identification of TP53RK-Binding Protein (TPRKB) Dependency in TP53-Deficient Cancers. *Mol Cancer Res.* 2019, Aug;17(8):1652-1664.
113. **Amirifar P., Ranjouri M., Yazdani R., Abolhassani H., Aghamohammadi A.** Ataxia-telangiectasia: A review of clinical features and molecular pathology. *Pediatr Allergy Immunol.* 2019, May;30(3):277-288.
114. **Yoshida K., Miki Y.** Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 2004, Nov;95(11):866-71.
115. **Wang Z., , Jia R, Wang L., Yang Q., X H., Fu Q, Zhang X., Li W., Ren Y.** The Emerging Roles of Rad51 in Cancer and Its Potential as a Therapeutic Target. *Front Oncol.* 2022 , Jul 7:12:935593.
116. **Zhao S., Chen L., Zang Y., Liu W., Liu S., Teng F., Xue F., Wang Y.** Endometrial cancer in Lynch syndrome. *Int J Cancer.* 2022 , Jan 1;150(1):7-17.
117. **Kracker S., Bergmann Y., Demuth I., Frappart P., Hildebrand G., Christine R., Wang Z., Sperling K., Digweed M., Radbruch A.** Nibrin functions in Ig class-switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 , Feb 1;102(5):1584-9.
118. **Kuo CY, Li X, Stark JM, Shih HM, Ann DK.** RNF4 regulates DNA double-strand break repair in a cell cycle-dependent manner. *Cell Cycle.* 2016, 15(6):787-798.
119. **Bong JJ, Kang YM, Shin SC, Choi SJ, Lee KM, Kim HS.** Differential expression of thymic DNA repair genes in low-dose-rate irradiated AKR/J mice. . *J Vet Sci .* 2013, 14(3):271-279.

120. **A., Möller A. P. & Mousseau T.** Biological consequences of Chernobyl: 20 years after the disaster. *Trends Ecol. Evol.* 2006, 21, 200–207 .
121. **Møllera A., Mousseau T.** Strong effects of ionizing radiation from Chernobyl on mutation rates. *Sci Rep.* 2015, 5: 8363.
122. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977, Dec;74(12):5463-7.
123. **Georget M., Pisan E.** Next Generation Sequencing (NGS) for beginners. *Epub.* 2023, Τόμ. Apr;40(4):345-358.
124. **Slatko B., Gardner A., Ausubel F.** Overview of Next Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018 , Τόμ. Apr; 122(1):, e59.
125. **Rhoads A, Au KF.** PacBio Sequencing and Its Applications. . *Genomics Proteomics Bioinformatics.* . 2015;, 13(5):278–289.
126. **Flusberg BA, Webster DR, Lee JH, Travers KJ, Olivares EC, Clark TA, Turner SW.** Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. . *Nat Methods.* 2010, 7(6):461–465.
127. **Fang G, Munera D, Friedman DI, Mandlik A, Chao MC, Banerjee O, Schadt EE.** Genome-wide mapping of methylated adenine residues in pathogenic Escherichia coli using single-molecule real-time sequencing. . *Nat Biotechnol.* . 2012, 30(12):1232–1239.
128. **Cherf GM, Lieberman KR, Rashid H, Lam CE, Karplus K, Akeson M.** Automated forward and reverse ratcheting of DNA in a nanopore at 5-A precision. *Nat Biotechnol.* . 2012, 30(4):344–348. .
129. **Greninger AL, Naccache SN, Federman S, Yu G, Mbala P, Bres V, Chiu CY.** Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis. . *Genome Med.* . 2015, 7:99.
130. **Ammar R, Paton TA, Torti D, Shlien A, Bader GD.** Long read nanopore sequencing for detection of HLA and CYP2D6 variants and haplotypes. *F1000Res.* . 2015, 4:17. .
131. **Cao MD, Ganesamoorthy D, Elliott AG, Zhang H, Cooper MA, Coin LJ.** Streaming algorithms for identification of pathogens and antibiotic resistance potential from real-time MinION(TM) sequencing. *Gigascience.* 2016, 5(1):32.

132. **Patel A., Belykh E., Miller E., George L., Martirosyan N., Byvaltsev V., Preul M.** MinION rapid sequencing: Review of potential applications in neurosurgery. *Surg Neurol Int.* 2018, Aug 10:9:157.
133. **Lorenz T.** Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp.* 2012, (63): 3998.
134. **Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R.** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. . *Biotechnology (N Y).* . 1993 , Τόμ. Sep;11(9);, 1026-30.
135. **Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J.** Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta.* 2015, Jan 15;439:231-50.
136. **Wilhelm J, Pingoud A.** Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem.* 2003 , Nov 7;4(11):1120-8.
137. **Kalendar R., Shustov A., Akhmetollayev I., Ulykbek Kairov U.** Designing Allele-Specific Competitive-Extension PCR-Based Assays for High-Throughput Genotyping and Gene Characterization. *Front Mol Biosci.* 2022, 9: 773956.
138. **Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M.** Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal.* 2002, 16(1):47-51.
139. **Zhao Ch., Xie S., Wu H., Luan Y., Hu S., Ni J., Lin R., Shuhong Zhao S., Zhang D., Licorresponding X.** Quantification of allelic differential expression using a simple Fluorescence primer PCR-RFLP-based method. *Sci Rep.* 2019, 9: 6334.
140. **Jung EJ, et al.** Genome-wide association study identifies quantitative trait loci affecting hematological traits in an F2 intercross between Landrace and Korean native pigs. *Anim Genet.* 2014, 45:534–541.
141. **Vogelstein B., Kinzler K.W.** Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999, 96:9236–9241.
142. **Dube S., Qin J., Ramakrishnan R.** Mathematical Analysis of Copy Number Variation in a DNA Sample Using Digital PCR on a Nanofluidic Device. *PLoS ONE.* 2008, 3:e2876.

143. **Svec D., Tichopad A., Novosadova V., Pfaffl M.W., Kubista M.** How Good Is a PCR Efficiency Estimate: Recommendations for Precise and Robust qPCR Efficiency Assessments . *Biomol. Detect. Quantif.* 2015, 3:9–16.
144. **Quan Ph., Sauzade M., Brouzes E.** dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel)*. 2018 Apr, 18(4): 1271.
145. **Benedetti I V., Biglia N., Sismondi P., Bortoli M.** DNA chips: the future of biomarkers. *Int J Biol Markers*. 2000 , Jan-Mar;15(1):1-9.
146. **Lobenhofer E., Bushel P, Afshari C, Hamadeh H.** Progress in the application of DNA microarrays. *Environ Health Perspect.* 2001, Sep;109(9):881-91.
147. **Känel T, Huber A.** DNA methylation analysis. *Swiss Med Wkly.* 2013 , May 28:143:w13799.
148. **Casadesús J., Low D.** Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006, 70(3):830–56.
149. **Jin B., Robertson K D.** DNA methyltransferases, DNA damage repair and cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2013, 754:3–29.
150. **Ferguson-Smith A C.** Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. *Nat Rev Genet.* 2011, 12(8):565–75.
151. **Chow J. C., Yen Z., Ziesche S. M., Brown C. J.** Silencing of the mammalian X chromosome. . *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005, 6:69–92.
152. **O'Connor C.** Karyotyping for Chromosomal Abnormalities. *Nature Education.* 2008, 1(1):27.
153. **Volpi E., Bridger J.** FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *BioTechniques.* 16 May 2018, vol 45.
154. **Savic S., Bubendorf L.,.** Common Fluorescence In Situ Hybridization Applications in Cytology. *Arch Pathol Lab Med.* 2016, 140 (12): 1323–1330.
155. **Houldsworth J., Chaganti R. S.** Comparative genomic hybridization: an overview. *Am J Pathol.* 1994 Dec, 145(6):1253-60.
156. **Jun Wang, 1 Min Lin, 1 Andrew Crenshaw, 2,3 Amy Hutchinson, 2,3 Hicks B., Yeager M., Berndt S., Huang W., Hayes R., Chanock S., Robert C Jones R. , Ramesh**

**Ramakrishnan R.** High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping using nanofluidic Dynamic Arrays. *BMC Genomics*. 2009, 10: 561.

157. **Jenkins S., Gibson N.,** High-throughput SNP genotyping. *Comp Funct Genomics*. 2002, 3(1):57-66.

158. **Liu Y, et al.** Very fast CRISPR on demand. . *Science*. 2020, 368:1265–1269.

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.