

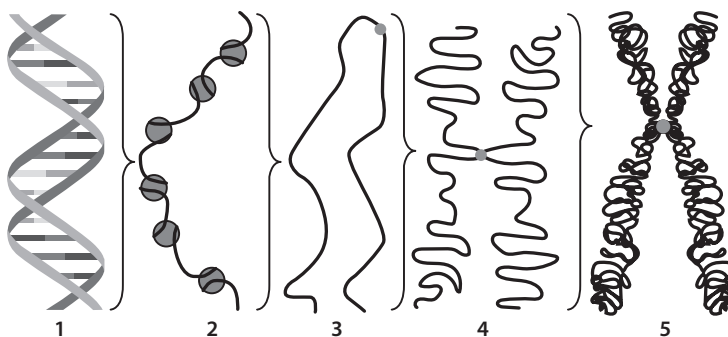
3

ΑΚΤΙΝΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

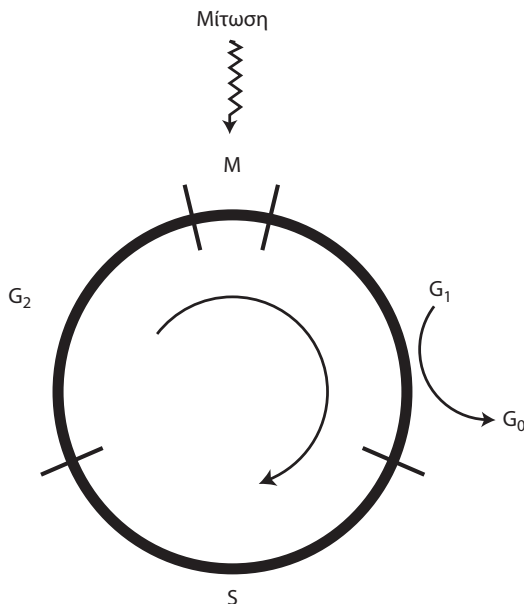
3.1 Ο ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Ο κυτταρικός κύκλος είναι το διάστημα της ζωής του κυττάρου από τη στιγμή που προκύπτει από το μητρικό μέχρι να διαιρεθεί το ίδιο και, αποτελείται από πέντε κυρίως φάσεις. Η μίτωση (M), είναι συνήθως η βραχύτερης διάρκειας φάση, στην οποία το κύτταρο έχοντας αναπαράγει το DNA, διαιρείται σε δύο θυγατρικά κύτταρα. Αυτά περνούν στη φάση G₁, (Gap) στην οποία, ή προετοιμάζονται για νέα διαίρεση, ή διαφοροποιούνται για να επιτελέσουν κάποια λειτουργία, ή μένουν καθηλωμένα και αδρανή. Στην τελευταία περίπτωση, λέμε ότι βρίσκονται σε φάση G₀. Από τη φάση G₀, μπορούν (για διάφορους λόγους) να επανενεργοποιηθούν και να ξαναμπούν στη διαδικασία της αναπαραγωγής, δηλαδή στον κυτταρικό κύκλο. Κατά τη φάση G₁ τα κύτταρα αυξάνονται σε μέγεθος, συνθέτουν RNA και πρωτεΐνες και προετοιμάζονται για την αναπαραγωγή του DNA. Αυτή λαμβάνει χώρα κατά την επόμενη φάση, τη φάση S (Synthesis).

Σήμερα είναι δυνατή η αναγνώριση των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση αυτή, με την αυτοραδιογραφία.



Εικόνα 3.1 Σχέση μεταξύ DNA και χρωμοσωμάτων. 1. DNA. 2 DNA και πρωτεΐνη. 3 Χρωματίνη. 4 Χρωματίδες. 5 Χρωμόσωμα.



Εικόνα 3.2 Ο κυτταρικός κύκλος.

Τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση *S*, ενσωματώνουν ραδιενεργή θυμιδίνη (δηλαδή θυμιδίνη που περιέχει το ραδιενεργό ισότοπο του υδρογόνου, το τρίτιο H^3), και καθίστανται έτσι, σεσημασμένα και ως εκ τούτου αναγνωρίσιμα και μετρήσιμα. Το ποσοστό των κυττάρων που έχει ενσωματώσει τη ραδιενεργή θυμιδίνη, λέγεται δείκτης σημάσεως (Labeling Index). Μία άλλη μέθοδος μελέτης του κυτταρικού κύκλου και γενικά της κινητικής των κυτταρικών πληθυσμών, είναι η κυταρομετρία ροής (Flow Cytometry). Με τη μέθοδο αυτή, τα κύτταρα προσλαμβάνουν μία ειδική για το DNA χρωστική. Στη συνέχεια περνούν από μία δέσμη Laser, που διεγείρει τη χρωστική σε φθορισμό. Μετρώντας την ακτινοβολία που εκπέμπεται μ' αυτόν τον τρόπο από τα κύτταρα, έχουμε και το περιεχόμενό τους σε DNA.

Μετά από τη φάση *S*, ακολουθεί ένα διάστημα που λέγεται φάση *G₂*, και στο οποίο το κύτταρο προετοιμάζεται για την επόμενη μίτωση (Εικ. 3.2). Το διάστημα μεταξύ δύο διαδοχικών μιτώσεων, ονομάζεται μεσόφαση.

3.2 Η ΑΚΤΙΝΙΚΗ ΒΛΑΒΗ ΤΟΥ DNA

Η δομή του DNA

Η διπλή έλικα του μορίου του DNA αποτελείται από δύο αλυσίδες, οι δομικοί λίθοι των οποίων είναι τα νουκλεοτίδια. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από μία πεντόζη, τη δεσοξυριβόζη, που το κυκλικό μόριό της αποτελείται από 4 άτομα άνθρακα και ένα άτομο οξυγόνου. Η πεντόζη αυτή συνδέεται με ένα μόριο φωσφορικού οξέως και μία αζωτούχα βάση. Υπάρχουν τεσσάρων ειδών βάσεις: θυμίνη (T), κυτοσίνη

(C) (πυριμιδίνες) και αδενίνη (A), γουανίνη (G) (πουρίνες).

Η αλληλουχία αυτών των βάσεων καθορίζει το γενετικό κώδικα. Οι δύο αλυσίδες της διπλής έλικας συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις, πάντοτε όμως η θυμίνη συνδέεται με την αδενίνη (A-T) και η κυτοσίνη με τη γουανίνη (C-G). Κατά τη διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου, γίνεται η σύνθεση του DNA και το κύτταρο διπλασιάζει το γενετικό του υλικό. Οι κυτταρικές λειτουργίες επιτελούνται με τις πρωτεΐνες που συνθέτει το κύτταρο με βάση το γενετικό κώδικα. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη μεταγραφή του DNA σε RNA (ριβοζονουκλεϊνικό οξύ), ένα μόριο με δομή παρόμοια με αυτή του DNA. Η διαφορά τους είναι ότι το RNA έχει ριβόζη αντί για δεσοξυριβόζη και ουρακίλη (U) (μία αζωτούχα βάση που περιέχεται μόνο στο RNA) στη θέση της θυμίνης. Η αποκωδικοποίηση του DNA βασίζεται στην αντιστοιχία A → U, C → G. Το είδος αυτό του RNA που αντιγράφει και μεταφέρει το γενετικό κώδικα ονομάζεται messenger-RNA (mRNA).

Η πρωτεϊνοσύνθεση λαμβάνει χώρα στα ριβοσώματα, όπου ένα άλλο μόριο RNA, που ονομάζεται transfer-RNA (μεταφορέας), φέρει εκείνο το αμινοξύ (δομική μονάδα των πρωτεϊνών) που αντιστοιχεί στη συγκεκριμένη αλληλουχία τριών βάσεων που το t-RNA αναγνωρίζει στο m-RNA. Τα μεταφερόμενα με αυτό τον τρόπο αμινοξέα, συνδέονται μεταξύ τους και σχηματίζουν την πρωτεΐνη.

Μέσα στον πυρήνα του κυττάρου το DNA είναι συνδεδεμένο με ειδικές πυρηνικές πρωτεΐνες, τις νουκλεοπρωτεΐνες, βρίσκεται εξαιρετικά συμπυκνωμένο και σε ελίκωση και σχηματίζει τα χρωμοσώματα (βλ. παρακάτω).

Η βλάβη του DNA

Το DNA είναι το σημαντικότερο κυτταρικό συστατικό που μπορεί να πληγεί, αφού μεταφέρει το γενετικό κώδικα. Ως το πιο ευαίσθητο τμήμα του θεωρούνται οι βάσεις της πυριμιδίνης. Άλλα σημαντικά μόρια του κυττάρου που είναι δυνατό να πληγούν από την ακτινοβολία είναι τα ένζυμα και οι πρωτεΐνες των κυτταρικών μεμβρανών. Στις πρωτεΐνες, ευαίσθητος στην ακτινοβολία είναι ο πεπτιδικός δεσμός.

Η ακτινοβολία επιφέρει πολλών ειδών βλάβες στο μόριο του DNA, πολλές από τις οποίες το κύτταρο τις επιδιορθώνει, άλλες τις μεταβιβάζει στους απογόνους του (εφόσον είναι βιώσιμο μετά την ακτινοβόληση) ενώ μικρό, σχετικά, ποσοστό βλαβών, οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Οι κυριότερες ακτινικές βλάβες του DNA και η αντιστοιχία ανά Gy δόσης ακτινοβολίας, αναφέρονται στον πίνακα 3.1.

Εκτός από τα λεμφοκύτταρα, τα ωκύτταρα και τα ορώδη κύτταρα της παρωτίδας, τα οποία μετά από ακτινοβόληση καταστρέφονται κατά τη μεσόφαση, (βλ. παράγραφο 3.5) όλα τα άλλα είδη των κυττάρων των θηλαστικών, υφίστανται αυτό που ονομάζεται "μιτωτικός θάνατος". Τα κύτταρα δεν πεθαίνουν αμέσως, αλλά μόλις επιχειρήσουν την επόμενη ή τις λίγες επόμενες μιτώσεις. Μάλιστα κατά σύμβαση, το κριτήριο της ακεραιότητας ενός κυττάρου, είναι να δώσει 50 νέα κύτταρα, δηλαδή

Πίνακας 3.1 Ο αριθμός και ο τύπος των ακτινικών βλαβών του DNA.

Τύπος της βλάβης	Αριθμός ανά Gy
Ρήξη διπλής αλυσίδας (Double strand break, DSB)	50
Ρήξη μονής αλυσίδας (Single strand break, SSB)	500-100
Καταστροφή βάσης	1.000-2.000
Καταστροφή σακχάρου	800-1.600
Διασταυρούμενη σύνδεση D.N.A.-D.N.A.	30
Διασταυρούμενη σύνδεση D.N.A.- πρωτεΐνες	150

να ολοκληρώσει 5-6 μιτώσεις ($2^5=32$, $2^6=64$). Αυτό γιατί, αν και η σύνθεση του RNA επηρεάζεται (από τις βλάβες του DNA), ωστόσο υπάρχουν ποσότητες RNA, που έχουν απομείνει και, οι οποίες μπορούν να συνθέσουν ακόμη, φυσιολογική πρωτεΐνη, συνεχίζοντας για λίγο τις κυτταρικές λειτουργίες.

Με την τεχνική της εξομοίωσης, στον Η/Υ και χρησιμοποιώντας τις γνωστές ιδιότητες κάποιων τύπων ακτινοβολίας μέσα σε υδρατμό, επιτυγχάνεται η μέτρηση και πρόβλεψη των σχέσεων, των ιοντισμών και των διεγέρσεων, στο χώρο (Monte-Carlo track-structure simulations). Με αυτόν τον τρόπο, αποδεικνύεται ότι η εναπόθεση ενέργειας δεν είναι ομοιογενής. Μερικοί ιοντισμοί εμφανίζονται αραιά στο χώρο, ενώ άλλοι σε πυκνές συναθροίσεις διαφόρων μεγεθών.

Από τις παραπάνω βλάβες, αυτές που έχουν συσχετισθεί περισσότερο με τον κυτταρικό θάνατο, είναι οι DSB (Πίν. 3.1). Δεν είναι, όμως, όλες οι DSB θανατηφόρες, αφού μερικές μπορεί να επιδιορθώνονται από το κύτταρο. Θανατηφόρες είναι οι DSB που ευρίσκονται σε στενή γειτονία με άλλες DSB, αλλά και με SSB. Αυτές τις μαζικές βλάβες ονομάζονται, θέσεις πολλαπλών τοπικά βλαβών (Local Mutiply Damaged Sites, LMDS).

Οι βλάβες αυτού του τύπου αυξάνονται όσο αυξάνεται η LET της ακτινοβολίας, και πολύ δύσκολα επιδιορθώνονται από το κύτταρο.

Οι βιολογικές επιπτώσεις της ακτινοβολίας και ο κυτταρικός θάνατος εξ αυτής επηρεάζονται πολύ από βιοχημικές οδούς που επάγονται μέσα στο σύστημα *DNA-damage-response (DRR)*¹. Αυτό πολύπλοκο σύστημα επηρεάζει όχι μόνο την ευαισθησία των κυττάρων στην ακτινοβολία, αλλά και το είδος και τον χρόνο που θα συμβεί ο κυτταρικός θάνατος. Ο λεγόμενος κυτταρικός θάνατος περιλαμβάνει διάφορων τύπων απαντήσεις στην ακτινοβολία, οι οποίοι εξαρτώνται πολύ από το είδος του εκάστοτε κυττάρου. Γενικά ορίζεται όπως αναφέρθηκε παραπάνω από την απώλεια παραγωγής απογόνων κυττάρων (loss of clonogenic capacity). Αυτός ο τύπος κυτταρικής βλάβης/θανάτου προφανώς δεν ισχύει για κύτταρα που είναι πλήρως διαφοροποιημένα και δεν πολλαπλασιάζονται περαιτέρω, όπως τα νευρικά ή τα μυϊκά κύτταρα.

Σε μερικές περιπτώσεις η μιτωτική καταστροφή, που θα δούμε παρακάτω, είναι τόσο βαρεία που δεν θα επιτρέψει την ολοκλήρωση της μίτωσης, και ως εκ τούτου ταυτίζεται με την έννοια του «μιτωτικού θανάτου», ενώ σε άλλες μπορεί να ενεργοποιήσει και να προκαλέσει ένα από τα υπόλοιπα είδη «προγραμματισμένου» κυτταρικού θανάτου.

3.3 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ

Το μόριο του DNA συνδυάζεται με ιστόνες για να σχηματίζει νουκλεοσώματα (σαν χάντρες σε κομπολόι). Κάθε νουκλεόσωμα αποτελείται από 8 ιστόνες γύρω από τις οποίες τον DNA περιελίσσεται 1,65 φορές. Τα νουκλεοσώματα αναδιπλώνονται και περιελίσσονται για να σχηματίσουν μια ίνα πάχους 30 nm. Σφιχτή περιέλιξη της ίνας αυτής παράγει μια παχύτερη ίνα 250 nm η οποία αναδιπλωμένη παράγει την χρωματίδα του χρωμοσώματος πλάτους 700 nm. Η χρωματίνη (3 στην εικόνα) βρίσκεται ως τέτοια στον πυρήνα του κυττάρου πριν αυτό εισέλθει στη φάση της μίτωσης και αρχίσει ο διπλασιασμός (4 στην εικόνα).

Η συμπαγής χρωματίνη είναι πιο ακτινευαίσθητη από τη μη συμπαγή. Τα μιτωτικά κύτταρα είναι 2,8 φορές πιο ευαίσθητα στις θραύσεις του DNA από τα κύτταρα της μεσοφάσεως έχουν χαμηλότερο OER (π.χ. 2,0 σε σύγκριση με 2,8) δεν έχουν μεγάλο «ώμο» στην καμπύλη επιβίωσής τους γιατί δεν υπάρχει αρκετή επιδιόρθωση. Η Μίτωση και το τέλος της G2 είναι οι περισσότερο «ακτινευαίσθητες φάσεις» (μέχρι 4 φορές πιο ακτινευαίσθητες) του κυτταρικού κύκλου, επειδή σαυτές η χρωματίνη είναι πιο πυκνή (συμπαγής). Η πιο «ακτινοάντοχη» φάση είναι η S (Synthesis) γιατί σαυτήν συντίθενται και είναι διαθέσιμα σε μεγαλύτερες ποσότητες τα ένζυμα για την επιδιόρθωση του DNA. Στη φάση S επίσης διπλασιάζονται οι χρωματίδες.

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί, με τους τρόπους που αναφέρονται παραπάνω, να προξενήσει τις εξής μεταβολές στα χρωμοσώματα:

- α) Γονιδιακές ή σημειακές (εστιακές) μεταλλάξεις. Είναι μεταβολές του γενετικού κώδικα που ή επιφέρουν κυτταρικό θάνατο, ή μεταβιβάζονται στους απογόνους. Η ανίχνευσή τους δεν είναι εύκολη και διαπιστώνονται από τις μεταβολές του φαινότυπου των απογόνων.
- β) Ποσοτικές μεταβολές του DNA των κυττάρων και δημιουργία πολυπλοειδικών γιγαντοκυττάρων.
- γ) Χρωμοσωμικές μορφολογικές μεταβολές. Οι μορφολογικές αλλοιώσεις των χρωμοσωμάτων στα ακτινοβολημένα κύτταρα γίνονται ορατές κατά τη μίτωση του κυττάρου. Η ακτινοβολία προξενεί θραύσεις σε διάφορα τμήματα των χρωμοσωμάτων. Τα άκρα των κομματιών που προκύπτουν, έχουν την τάση να προσκολλώνται σε άλλα κομμάτια, όχι όμως και σε ακέραια χρωμοσώματα. Ειδικές τεχνικές χρώσεως με Giemsa έχουν βοηθήσει σημαντικά στην ανίχνευση ακόμη και πολύ μικρών αλλοιώσεων στα χρωμοσώματα.

ΤΥΠΟΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΒΛΑΒΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ						
Σε ένα χρωμόσωμα	Φυσιολογικό	Τελικό τμήμα	Ενδιάμεσο τμήμα	Δακτύλιος με κεντρόμερο	Χωρίς κεντρόμερο	Ανάστροφη επικόλληση
Μεταξύ χρωμοσωμάτων	Φυσιολογικό		Δικεντρικό χρωμ. + τμήμα		Συμμετρική ανταλλαγή	

Εικόνα 3.3 Οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις από την ιοντίζουσα ακτινοβολία.

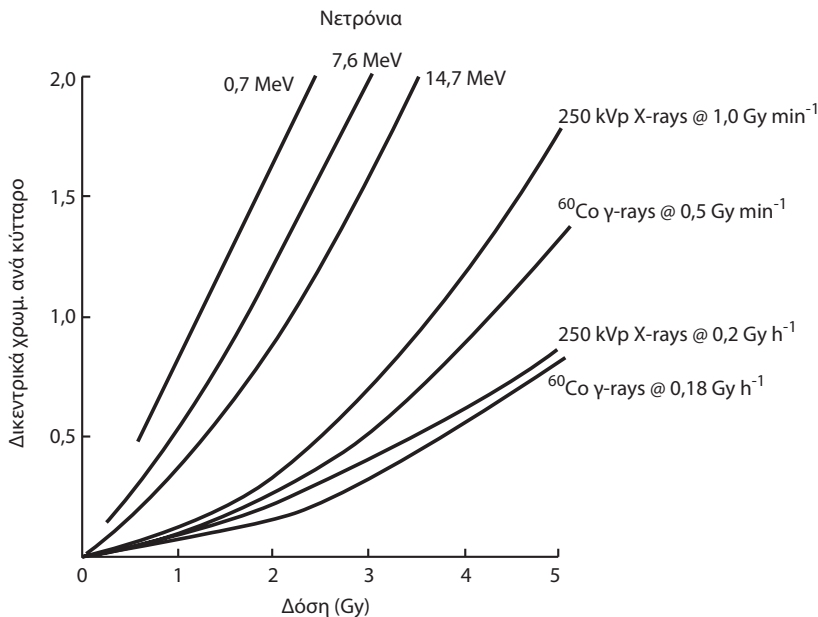
Γενικά, είναι δυνατό να συμβούν τα εξής:

- Να μη γίνει κανενός είδους επανένωση και απλά να εξαλειφθεί ένα τμήμα του χρωμοσώματος και φυσικά, του γενετικού υλικού.
- Τα τμήματα που αποκόπηκαν, να ξαναενωθούν, αποκαθιστώντας τη βλάβη και,
- Τα τμήματα των χρωμοσωμάτων να ενωθούν με διάφορους συνδυασμούς και να προκύψουν "χρωμοσώματα" με παράδοξη μορφολογία. Στην εικόνα 3.3 βλέπουμε ότι μπορεί να συμβούν διασπάσεις, απώλειες τμημάτων και επανασυνδέσεις.

Οι επανασυνδέσεις μπορεί να αφορούν στα τμήματα που προέρχονται από ένα μόνο χρωμόσωμα ή να συνδέονται και να συνδυάζονται κομμάτια από διάφορα χρωμοσώματα. Έτσι, δυνατόν να προκύψουν δακτυλιοειδείς σχηματισμοί με ή χωρίς κεντρόμερο, ασύμμετρα χρωμοσώματα με ένα ή δύο κεντρόμερα, αναστροφές τμημάτων, συμμετρικές εναλλαγές μεταξύ δύο χρωμοσωμάτων, κ.λπ.

Οι βλάβες αυτές επιφέρουν, συνήθως, κυτταρικό θάνατο, κατά την επόμενη, ή τις λίγες επόμενες μιτώσεις και έχουν ονομαστεί "ασταθείς" αλλοιώσεις. Αντίθετα άλλες που αφορούν ελάχιστονες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, ονομάζονται "σταθερές" γιατί δεν προξενούν κυτταρικό θάνατο, αλλά είναι, ίσως, πιο επικίνδυνες αφού μεταβιβάζονται στους απογόνους. Η μελέτη και ανίχνευσή τους, πάντως δεν είναι εύκολη, σε αντίθεση με τις "ασταθείς" που αναγνωρίζονται εύκολα, όπως π.χ., οι δικεντρικές μορφές, οι δακτυλιοειδείς σχηματισμοί, οι ακεντρικές μορφές (μικροπυρήνες κ.λπ.)

Η ακτινοβόληση αίματος *in vitro* επιφέρει τέτοιου είδους μορφολογικές αλλοιώσεις στα μικρά λεμφοκύτταρα. Μετά από την παρατήρηση ότι η ολόσωμη ακτι-



Εικόνα 3.4 Ο αριθμός των άτυπων δικεντρικών χρωμοσωμάτων ανά κύτταρο για διάφορα είδη ακτινοβολίας και ρυθμού δόσης, σε συνάρτηση με τη δόση.

νοβόληση προκαλεί ίδιες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, έχει επιχειρηθεί βαθμονόμηση των βλαβών και σχεδιασμός των σχετικών καμπυλών (Εικ. 3.4), έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν για τη βιολογική δοσιμέτρηση σε πυρηνικά ατυχήματα κ.λπ.²

Εάν το κύτταρο ακτινοβληθεί νωρίς στον κυτταρικό κύκλο, πριν δηλαδή από τη φάση σύνθεσης του DNA, οι βλάβες αφορούν σε ολόκληρα χρωμοσώματα, επειδή αυτά δεν έχουν ακόμη διπλασιαστεί. Αντίθετα, εάν το κύτταρο ακτινοβληθεί αργότερα στον κυτταρικό κύκλο, τα χρωμοσώματα διαιρούνται σε δύο χρωματίδες, που αν και συνδέονται μεταξύ τους στο κεντρόμερο απέχουν αρκετά, ώστε να προκύπτουν βλάβες στη μία από τις δύο χρωματίδες.

3.4 ΤΥΠΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ

Στη βιβλιογραφία της ραδιοβιολογίας, η επιβίωση κυττάρου μετά από ακτινοβόληση, είναι συνώνυμη με τη διατήρηση της αναπαραγωγικής ικανότητας του κυττάρου^{4,5}. Με την εφάπαξ χορήγηση δόσης της τάξεως των εκατοντάδων Grays, ο κυτταρικός θάνατος επέρχεται γρήγορα πριν από τη μίτωση, κατά τη μεσόφαση. Αυτό ονομάζεται μεσοφασικός θάνατος και μπορεί να συμβεί και με οποιαδήποτε άλλη φυσική αιτία, όπως θέρμανση, μηχανική επίδραση κ.λπ.

Στις δόσεις που χορηγούνται στην ακτινοθεραπεία, οι συνηθέστεροι τύποι κυτταρικού θανάτου είναι η μιτωτική καταστροφή, η απόπτωση, η αδράνεια/γήρανση (senescence), η νέκρωση και η αυτοφαγία. Η μιτωτική καταστροφή εκφράζεται αργότερα όταν το κύτταρο επιχειρήσει να αναπαραχθεί να τελέσει δηλαδή

την επόμενη ή τις επόμενες 3-4 μιτώσεις. Οι υπόλοιποι τύποι κυτταρικού θανάτου μπορεί να συμβούν πολύ ενωρίς μετά την ακτινοβόληση ή και αργότερα. Στην τελευταία περίπτωση (που οι υπόλοιποι τύποι κυτταρικού θανάτου εμφανίζονται αργότερα) αυτό συμβαίνει ως αποτέλεσμα μιτωτικής καταστροφής που οδηγεί σε τύπο κυτταρικού θανάτου με απόπτωση, αδράνεια (senescence), νέκρωση και αυτοφαγία. Εάν τα κύτταρα έχουν ακέραιους τους μηχανισμούς της απόπτωσης αποθνήσκουν νωρίς μετά την ακτινοβόληση (ο όγκος μειώνεται γρήγορα σε μέγεθος μετά τις πρώτες συνεδρίες της ΑΚΘ) αλλά αυτό δεν σημαίνει ότι είναι ακτινοιάσιμος. Εάν τα κύτταρα π.χ. ενός όγκου κατορθώνουν να επιδιορθώσουν τις ακτινικές βλάβες δηλαδή να έχουν ελαττωμένη «μιτωτική καταστροφή» τότε ο όγκος δεν είναι ακτινοιάσιμος.

Έτσι δημιουργείται το ερώτημα για το ποιοι είναι οι μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου που καθορίζουν την ακτινευσαιθησία του κυττάρου.

Για την απώλεια της αναπαραγωγικής ικανότητας των κυττάρων των θηλαστικών, η μέση θανατηφόρα δόση είναι περίπου 150 cGy, ενώ το 50% των μικρών λεμφοκυττάρων θανατώνονται κυρίως κατά τη μεσόφαση, 24 ώρες από χορήγηση 100 cGy.

Μιτωτική καταστροφή

Στη μιτωτική καταστροφή η ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει θραύση και των δύο αλυσίδων της διπλής έλικας και ως εκ τούτου να διαταράξει τη διαδικασία της μίτωσης. Είναι μάλλον ο πρωτεύων τρόπος κυτταρικού θανάτου σε κύτταρα όχιοαιμοποιητικού ιστού. Πολλοί όγκοι έχουν ελαττωματικό p53 και συνεπώς πλημμελή έλεγχο των βλαβών του DNA με το σύστημα DDR, με αποτέλεσμα αυτό να προχωρεί στον κυτταρικό κύκλο παρά τις σοβαρές βλάβες της διπλής έλικας του DNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ορατές και θανατηφόρες χρωμοσωμικές βλάβες, όπως δικεντρικά χρωμοσώματα, δακτυλίους και αναφασικές γέφυρες.

Σε ένα κύτταρο που πεθαίνει, παρατηρείται αρχικά πυκνοκύττωση, δηλαδή, πύκνωση της χρωματίνης. Ακολουθεί η καρυόλυση κατά την οποία ο πυρήνας δεν χρωματίζεται και το κύτταρο φαίνεται σαν "απύρρηνο κυτταρόπλασμα". Πριν από την κυτταρική λύση, είναι συχνή η εμφάνιση γιγαντοκυττάρων γιατί, ενώ η μιτωτική διαδικασία έχει ανασταλεί, οι υπόλοιπες λειτουργίες του κυττάρου συνεχίζονται, με αποτέλεσμα να αυξάνεται σε μέγεθος.

Απόπτωση

Η απόπτωση ορίζεται ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Είναι μία διαδικασία εξαιρετικής σημασίας για την ανάπτυξη του οργανισμού και για την ομοιοστασία. Παρατηρείται κατά την εμβρυική ανάπτυξη (λ.χ. κατά την εξαφάνιση των μεσοδακτυλίων πτυχών) όταν διαμορφώνονται τα όργανα. Διεθνώς αναφέρεται ως "apoptosis" για να τονιστεί η φυσιολογική ομοιότητα του φαινομένου με τα αποπίπτοντα φύλλα των δένδρων.

Η αξιοπιστία της διαδικασίας αναπαραγωγής του DNA είναι μεγάλη γιατί στο κύτταρο υπάρχουν μηχανισμοί αυστηρής επιτήρησής της. Δύο είναι οι κύριες επιλογές ενός κυττάρου που υφίσταται βλάβη στο γενετικό υλικό του:

- α) σταματά να αναπαράγεται με σκοπό να επιδιορθώσει τη βλάβη
- β) αυτοκαταστρέφεται εάν η γενετική βλάβη είναι τέτοια ώστε η διαιώνισή της μπορεί να θέσει σε κίνδυνο ολόκληρο τον οργανισμό, λόγω του πολλαπλασιασμού των ανωμάτων κυττάρων.

Η απόπτωση είναι ο κυρίως μηχανισμός κυτταρικού θανάτου κυττάρων του αιμοποιητικού ή σπερματοκυττάρων. Ελέγχεται κυρίως από το γονίδιο p53 το οποίο υφίσταται μεταλλάξεις σε διάφορα νεοπλάσματα. Το BCL-2 δρα ενάντια στην έναρξη του αποπτωτικού μηχανισμού.

Η απόπτωση μπορεί να αρχίσει ως αποτέλεσμα εσωτερικού μηχανισμού (όπως βλάβη του DNA, μεταβολικό στρες, υποξία) ή εξωτερικό ερέθισμα δια των οδών FAS-L και TRAIL. Και οι δύο ανωτέρω μηχανισμοί ενεργοποιούν τις κασπάσες που διαταράσσουν τη μεμβράνη των μιτοχονδρίων που με τη σειρά της οδηγεί σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος-C που και αυτό οδηγεί στην πύκνωση της χρωματίνης, κατακερματισμό του DNA και κυτταρικό θάνατο.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν αναλάβει το ρόλο του ποιοτικού ελέγχου του DNA. Το αντιογκογονίδιο p53 έχει μελετηθεί ευρέως και συμμετέχει ενεργά στο φαινόμενο της απόπτωσης. Εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 και η πρωτεΐνη του (αποτελούμενη από 393 αμινοξέα) επιτελεί αρκετές λειτουργίες: α) ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου β) απάντηση σε βλάβη του DNA γ) προαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης και δ) επαγωγή της απόπτωσης. Το φυσικό στέλεχος (wild type) του p53 προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, για να δοθεί χρόνος στο κύτταρο να επιδιορθώσει τη βλάβη. Αν δεν συμβεί αυτό, το κύτταρο οδηγείται σε αποπτωτικό θάνατο. Μεταλλάξεις του γονιδίου p53 ανιχνεύονται συχνά σε νεοπλάσματα του ανθρώπου. Η μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη δε μπορεί να ρυθμίσει τη μεταγραφική διαδικασία, ούτε να σταματήσει τον κυτταρικό κύκλο του νεοπλασματικού κυττάρου. Αρκετές μελέτες συσχετίζουν την πρόγνωση νεοπλασμάτων όπως αυτό του μαστού με μεταλλάξεις του p53⁵.

Άλλα εμπλεκόμενα στην απόπτωση γονίδια αναφέρονται τα myc και bcl2, ενώ κυτοκίνες και αυξητικοί παράγοντες μπορεί να τροποποιήσουν τον αποπτωτικό μηχανισμό. Το γονίδιο bcl2 είναι κατασταλτικό της απόπτωσης και υπάρχουν ενδείξεις ότι το επίπεδο έκφρασής του επηρεάζει την ανάπτυξη του πληθυσμού των νεοπλασματικών κυττάρων μετά από ακτινοβολήση. Το c-myc ενεργοποιεί την απόπτωση.

Η απόπτωση επάγεται από διάφορους παράγοντες όπως τα γλυκοκορτικοειδή, η υπερθερμία, ορισμένοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες και η ακτινοβολία. Αναφέρεται ότι η απόπτωση παίζει κάποιο ρόλο στη διαμόρφωση της ακτινευαισθησίας των ιστών. Είναι γεγονός ότι το μεγαλύτερο ποσοστό κυτταρικού θανάτου σε ακτι-

νοβολούμενα κύτταρα οφείλεται στον αναπαραγωγικό θάνατο που έχουμε περιγράψει, και το μικρότερο, στην απόπτωση. Σε ποιο βαθμό η ακτινοβολία επάγει τον αποπτωτικό θάνατο είναι κάτι που ερευνάται. Πάντως η απόπτωση είναι δυνατό να εμφανιστεί μετά από ακτινοβόληση η οποία την ενεργοποιεί προξενώντας χρωμοσωμικές βλάβες. Ο βαθμός στον οποίο λαμβάνει χώρα η «μεταμιτωτική» απόπτωση είναι επίσης αντικείμενο έρευνας. Το φαινόμενο παρατηρείται μετά από ακτινοβόληση κυττάρων παρωτίδας και σε μη διαιρούμενα λεμφοκύτταρα. Ένα εξαιρετικά μεγάλης κλινικής σημασίας ερώτημα είναι το κατά πόσον κύτταρα που δεν είναι προγραμματισμένα να αποπέσουν, εισέρχονται στο «αποπτωτικό κλάσμα» μετά από κάθε συνεδρία ακτινοβόλησης. Αν συμβαίνει αυτό, ο αποπτωτικός θάνατος υπολογίζεται ότι μπορεί να συνεισφέρει μέχρι και τρεις λογαρίθμους κυτταρικής θανάτωσης μετά από ένα ακτινοθεραπευτικό σχήμα 32 συνεδριών. Στην περίπτωση αυτή οι εξισώσεις των ισοδραστικών μοντέλων θα πρέπει να διαμορφωθούν κατάλληλα⁶.

Η παρουσία του φυσικού στελέχους του p53 σε όγκους, τους καθιστά ευαίσθητους σε κυτταροτοξικές θεραπείες όπως η ακτινοθεραπεία. Κακοήθειες όπως τα λεμφώματα, οι λευχαιμίες, το σεμίνωμα κ.ά. είναι ακτινευαίσθητες (και χημειοευαίσθητες) γιατί διαθέτουν το φυσικό στέλεχος του p53 και παρουσιάζουν απόπτωση, ενώ τα καρκινώματα και τα σαρκώματα είναι σχετικά ακτινοάντοχα, γιατί ανιχνεύονται συχνότερα σε αυτά μεταλλάξεις του p53. Παρόλα αυτά δεν είναι σπάνιοι και οι όγκοι που παρότι διαθέτουν το φυσικό στέλεχος του p53 είναι ακτινοάντοχοι. Επομένως η απόπτωση δεν είναι ο μοναδικός μηχανισμός που υπεισέρχεται στην ακτινευαισθησία. Παράλληλα η απόπτωση φαίνεται ότι έχει έναν ουδό (κατώφλι) για κάθε είδος κυττάρου. Τα σπερματοκύτταρα έχουν χαμηλό “αποπτωτικό ουδό” με αποτέλεσμα να είναι ευαίσθητα ακόμα και σε μικρές βλάβες του DNA. Αποτέλεσμα αυτού είναι η μεγάλη ακτινο- και χημειοευαισθησία των όγκων που προέρχονται από αυτά τα κύτταρα. Τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου αποτελούν ένα ακόμα παράδειγμα κυττάρων με χαμηλό αποπτωτικό κατώφλι. Νεοπλάσματα του λεπτού εντέρου είναι εξαιρετικά σπάνια, ενώ οι κυτταροτοξικές θεραπείες είναι πολύ τοξικές για το λεπτό έντερο.

Στα πλαίσια της θεραπείας των κακοήθων νεοπλασμάτων διενεργείται έρευνα προς την κατεύθυνση της εκλεκτικής ενεργοποίησης (από τους κυτταροτοξικούς παράγοντες) του αποπτωτικού μηχανισμού στα κακοήθη σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Έτσι ελπίζεται ότι θα αυξηθεί ο θεραπευτικός δείκτης. In vitro έχει επιτευχθεί η μεταβολή της αποπτωτικής ικανότητας κυττάρων με τη χρήση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων⁷.

Νέκρωση (και απόπτωση)

Ενώ η απόπτωση έχει περιγραφεί ως “death by suicide”, ο κυτταρικός θάνατος περιγράφεται ως “death by injury”. Η νέκρωση είναι συνήθως αποτέλεσμα ισχυρού

στρες και ακραίων καταστάσεων έλλειψης ενέργειας, μεταβολής του pH, ή σοβαρών ηλεκτρολυτικών διαταραχών ή άλλων διαταραχών βλάβης του κυττάρου όπως είναι η ιοντίζουσα ακτινοβολία. Είναι βλάβη μη ελεγχόμενη και χαοτική και φυσικά μη αναστρέψιμη. Μερικές φορές ωστόσο μπορεί να έχει χαρακτήρα «προγραμματισμένο» που συμβαίνει ως εναλλακτικός της απόπτωσης, και τότε λέγεται, καταχρηστικά ίσως, "Necroptosis"¹. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν σηματοδοτικά μονοπάτια σχετιζόμενα με υποδοχείς (receptor signaling pathways). Για παράδειγμα, σε περίπτωση ελλείψεως ενεργειακών αποθεμάτων όπως τα ATP/NAD ή οξειδωτικού στρες ή ενεργοποίηση του p53 κ.λπ., ενεργοποιείται ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που αυξάνει την διαπερατότητα της μεμβράνης των λυσοσωμάτων με αποτέλεσμα την διοχέτευση πεπτικών ενζύμων στο εσωτερικό του κυττάρου και την έναρξη της νέκρωσης.

Συχνά δεν είναι εύκολη η διαφοροποίηση μεταξύ νέκρωσης και απόπτωσης, ωστόσο υπάρχουν ορισμένες σημαντικές διαφορές μεταξύ τους:

- α) Κατά την απόπτωση παρατηρείται πύκνωση της χρωματίνης και αποδόμηση του DNA αρχικά σε τμήματα των 50-300 χιλιάδων ζευγών βάσεων και κατόπιν μετά από δράση της ενδονουκλεάσης σε θραύσματα των 200 ζευγών βάσεων. Η ηλεκτροφόρηση ανιχνεύει τα τμήματα αυτά του DNA. Αντίθετα κατά τη νέκρωση το αποδομώμενο DNA κατανέμεται τυχαία σε μικρά τμήματα.
- β) Κατά την απόπτωση παρατηρείται συρρίκνωση του κυττάρου με απώλεια της επαφής του με τα γειτονικά κύτταρα, ενώ τα κύτταρα που νεκρώνονται διογκώνονται.
- γ) Τα νεκρωτικά κύτταρα εμφανίζουν απώλεια της ακεραιότητας των κυτταρικών μεμβρανών πριν την αποδόμηση του DNA ενώ τα αποίπτοντα εμφανίζουν απώλεια της ακεραιότητας των κυτταρικών μεμβρανών μετά την αποδόμηση του DNA.
- δ) Η απόπτωση κατά κανόνα εμφανίζεται πριν από τη μίτωση
- ε) Η απόπτωση παρατηρείται σποραδικά μέσα σε έναν κυτταρικό πληθυσμό και συνοδεύεται από φαγοκυττάρωση από γειτονικά κύτταρα ή μακροφάγα. Η νέκρωση παρατηρείται σε αθροίσματα γειτονικών κυττάρων με συνοδά φλεγμονώδη στοιχεία. Φλεγμονώδης αντίδραση δεν παρατηρείται στην απόπτωση.
- στ) Η απόπτωση είναι αποτέλεσμα ενεργοποίησης σειράς συγκεκριμένων γονιδίων, ενώ η νέκρωση όχι πάντοτε (βλ. παραπάνω "necroptosis").

Αυτοφαγία (αυτοφαγοκυττάρωση)

Είναι μια διαδικασία κατά την οποία το κύτταρο «τρώει τον εαυτό του», δηλαδή πέπτει με ελεγχόμενο τρόπο κάποια από τα συστατικά του στο κυτταρόπλασμα με σκοπό να παράγει την ενέργεια που του λείπει σε καταστάσεις στρες, δηλαδή να επιβιώσει. Πιο ειδικά π.χ. έλλειψη ενέργειας λόγω ελλείψεως οξυγόνου ή διατροφικών στοιχείων μετά από ΑΚΘ ή ΧΜΘ ενεργοποιούνται τα AMPK, που ανι-

χνεύει χαμηλά επίπεδα ATP και η mTOR κινάση (mammalian target of rapamycin kinase) τα οποία ενεργοποιούν τη μερική αυτοφαγοκυττάρωση για να παραχθεί η ενέργεια που λείπει. Επομένως θα μπορούσε να θεωρηθεί μηχανισμός επιβίωσης και όχι μηχανισμός κυτταρικού θανάτου. Ωστόσο μια απορρυθμισμό του μηχανισμού αυτοφαγίας μπορεί σε ορισμένα είδη κυττάρων να ενεργοποιήσει έναν ιδιαίτερο τύπο κυτταρικού θανάτου μετά από ακτινοβολήση ή ΧΜΘ. Είναι ενδιαφέρον ότι η αυτοφαγία συμβαίνει σε κύτταρα που έχουν ελαττωματικούς μηχανισμούς απόπτωσης.

Η κυτταρική «γήρανση» και αδράνεια (Radiation-induced senescence)

Η κυτταρική «γήρανση» και αδράνεια (Radiation-induced senescence) είναι μια κατάσταση μη αναστρέψιμης διακοπής της κυτταρικής ανάπτυξης που συμβαίνει όταν τα κύτταρα υφίστανται στρες. Επιπλέον, η αδράνεια μπορεί να διεγείρεται από διάφορους παράγοντες, κυρίως η βράχυνση των τελομερών και οι οξειδωτικές βλάβες, καθώς και η απόκριση κάποιας βλάβης στο DNA που προκαλείται από ιοντίζουσα ακτινοβολία και αρκετά χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Η «γήρανση» θεωρείται ότι σταματά τον πολλαπλασιασμό των προσβεβλημένων κυττάρων και μ' αυτήν την έννοια συμμετέχουν σε αυτό που ορίσαμε παραπάνω ως «μιτωτικό θάνατο» δηλαδή την απώλεια της αναπαραγωγικής ικανότητας των κυττάρων. Συνεπώς αυτά τα κύτταρα δεν μπορούν να συμμετέχουν στην αναγέννηση των ιστών και των κακοήθων όγκων μετά από ακτινοβολήση. Το περισσότερο γνωστό σχήμα ενεργοποίησης της αδράνειας είναι αυτό που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση πρωτεϊνών που ενεργοποιούνται από το σύστημα DDR (βλ. παραπάνω) μετά από ακτινοβολήση και στο οποίο συμμετέχουν πρωτεΐνες που αναστέλλουν την εξέλιξη στον κυτταρικό κύκλο. Η ενεργοποίηση του p53 μπορεί να οδηγήσει (μέσω του p21 cyclin-dependent kinase inhibitor CDKI) σε μόνιμη καθήλωση στη φάση G0.

Ωστόσο, τα αδρανή κύτταρα παραμένουν μεταβολικά ενεργά και υφίστανται μεταβολές στην έκφραση της πρωτεΐνης και στην έκκριση κυτοκινών και άλλων παραγόντων που εμπλέκονται στην αδράνεια (γήρανση). Το φαινόμενο αυτό υπάρχουν ενδείξεις ότι συμβαίνει κατά την ακτινοβολήση όγκων που αναπτύσσονται σχετικά αργά όπως ο καρκίνος του προστάτη.

3.5 ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ

Οι πλείστες των ακτινικών βλαβών στα κύτταρα είναι δυνατόν να επιδιορθωθούν με την ενεργοποίηση του συστήματος DNA damage repair (DDR). Αυτό το σύστημα απαρτίζεται από αισθητήρες, μεταφορείς (σήματος) και τελεστές (sensors, transducers, effectors) είναι πολύπλοκο και συμμετέχουν σ' αυτό διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια (signaling pathways)¹.

Οι αισθητήρες είναι πρωτεΐνες που επιτηρούν και ανιχνεύουν τις βλάβες του