

ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΓΕΝΟΤΟΞΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ: ΝΕΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΕΓΚΥΡΕΣ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΙΣΤΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΔΟΣΕΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

ΓΑΒΡΙΗΛ ΠΑΝΤΕΛΙΑΣ και ΓΕΩΡΓΙΑ ΤΕΡΖΟΥΔΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΕΙΟΦΥΣΙΚΗΣ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΥΓΙΕΙΝΗΣ
ΙΠΤ-Α, ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ», 153 10 ΑΓΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΤΤΙΚΗΣ
gabriel@ipta.demokritos.gr

1. Εισαγωγή

Υπάρχει σήμερα διαρκώς αυξανόμενη ανησυχία για την πιθανή μεταλλαξιγόνο και καρκινογόνο δράση ενός ευρέως φάσματος γενotoξικών παραγόντων στους οποίους εκτίθενται οι σύγχρονες κοινωνίες λόγω του τρόπου διαβίωσής τους και της απελευθέρωσης των παραγόντων αυτών στους εργασιακούς χώρους και στο περιβάλλον γενικότερα. Δυστυχώς όμως υπάρχουν πολύ λίγες μεθοδολογίες με τις οποίες μπορούν να μετρηθούν άμεσα οι μεταλλάξεις και γενικότερα οι βλάβες που επάγονται στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Ορισμένες άμεσες τεχνικές βασίζονται στην παρατήρηση αλλαγών που επάγονται στα χρωμοσώματα με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου. Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν αφενός εμφανείς θραύσεις και αναδιατάξεις τμημάτων σε ένα χρωμόσωμα ή και μεταξύ δύο ή και τριών χρωμοσωμάτων. Αφετέρου περιλαμβάνουν σταθερές χρωμοσωματικές αντιμεταθέσεις ή και αλλαγές που χαρακτηρίζονται ως ανταλλαγές των αδελφών χρωματιδίων (Sister Chromatid Exchanges, SCEs). Οι ανταλλαγές των αδελφών χρωματιδίων είναι αμοιβαίες, συμμετρικές ανταλλαγές αλληλουχιών DNA, σε ομόλογες θέσεις ανάμεσα στα αδελφά χρωματίδια, στο στάδιο των τεσσάρων κλώνων κατά την αντιγραφή του DNA. Οι χρωμοσωματικές αλλοιώσεις και οι ανταλλαγές των αδελφών χρωματιδίων θεωρούνται ως δείκτης τόσο της βλάβης του DNA όσο και της αποτελεσματικότητας των επιδιορθωτικών μηχανισμών του κυττάρου που εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα με την ανάπτυξη κυτταρικών δυσλειτουργιών ή ακόμη και διαδικασιών καρκινογένεσης. Για τον λόγο αυτό, η συχνότητα τους σε μεταφάσεις λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα τόσο για τον έλεγχο της έκθεσης σε φυσικούς και χημικούς γενotoξικούς μεταλλαξιγόνους και καρκινογόνους παράγοντες, που είναι δυνατόν να απελευθερώνονται σε εργασιακούς χώρους και στο περιβάλλον γενικότερα, όσο και για την εκτίμηση της επικινδυνότητάς τους. Η δυνατότητα επομένως παροχής επιστημονικά έγκυρων και τεχνικά αξιόπιστων υπηρεσιών μέτρησης χρωμοσωματικών αλλοιώσεων, με κριτήρια ανάλυσης που αναφέρονται στο πρότυπο ISO 19238, είναι θεμελιώδους σημασίας.

Η μέτρηση της απορροφουμένης δόσης, μέσω φυσικών (Φυσική Δοσιμετρία) ή χρωμοσωματικών μεθόδων (Βιολογική Δοσιμετρία), επιβεβαιώνει αφενός την έκθεση σε γενotoξικούς παράγοντες και αφετέρου συμβάλλει στην εκτίμηση της επικινδυνότητας της. Γνωρίζοντας τη δόση, η εκτίμηση της επικινδυνότητας αναφέρεται στην αναμενόμενη αύξηση της συχνότητας εμφάνισης συμπτωμάτων ή και νεοπλασματικών νοσημάτων που ενδεχομένως να προκύπτουν βάσει επιδημιολογικών μελετών. Η μεθοδολογία αυτή προϋποθέτει ότι μια συγκεκριμένη δόση είναι εξίσου επικίνδυνη για όλα τα μέλη του πληθυσμού αδιακρίτως και ότι όλα τα μέλη του πληθυσμού εμφανίζουν την ίδια ευαισθησία στον υπό εξέταση γενotoξικό παράγοντα. Υπάρχουν εντούτοις άτομα μεταξύ των μελών του πληθυσμού που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα και έχουν περιγραφεί γενετικά σύνδρομα ή φορείς μεταλλαγμένων γονιδίων που χαρακτηρίζονται από αυξημένη χρωμοσωματική ακτινοευαισθησία, ενώ ταυτόχρονα εκφράζουν και γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση. Κατά την τελευταία δεκαετία οι ερευνητικές δραστηριότητες μετρολογίας στον τομέα της βιοδοσιμετρίας έχουν επομένως επικεντρωθεί στην εξατομίκευση της επικινδυνότητας μιας υπερέκθεσης με βάση την ενδογενή ακτινοευαισθησία και γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση των εκτιθεμένων ατόμων. Η κατανόηση των γενετικών παραγόντων που καθορίζουν αυξημένη ευαισθησία είναι δυνατόν να αποτελέσει το απαραίτητο βιολογικό υπόβαθρο για την ανάπτυξη επιστημονικά έγκυρων και τεχνικά αξιόπιστων υπηρεσιών μέτρησης χρωμοσωματικών αλλοιώσεων. Οι μετρήσεις αυτές θα συμβάλουν στην εκτίμηση απορροφουμένων δόσεων και ανίχνευση μελών του

πληθυσμού υψηλής επικινδυνότητας με υπερευαισθησία σε γενοτοξικούς παράγοντες και ενδεχομένως με γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση.

Στα πλαίσια αυτά, η παρούσα εργασία αναφέρεται στις κυτταρογενετικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα για βιοδοσιμετρία και αξιολόγηση υπερεκθέσεων μετρώντας τα δικεντρικά χρωμοσώματα σύμφωνα με κριτήρια ανάλυσης που αναφέρονται στο πρότυπο ISO 19238. Κυρίως όμως επικεντρώνεται στις προσπάθειες της ερευνητικής μας ομάδας για την ανάπτυξη νέων και πιο αξιόπιστων μεθόδων ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού χρωμοσωματικών αλλοιώσεων σε λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος, η προτυποποίηση των οποίων κατά ISO είναι επιτακτική ανάγκη. Το νέο πρότυπο θα παρέχει οδηγίες στα εργαστήρια αναφοράς που θα εφαρμόζουν κυτταρογενετικές τεχνικές για αξιόπιστες εκτιμήσεις δόσεων και επιπτώσεων στην υγεία ατόμων του πληθυσμού με μεθόδους βιοδοσιμετρίας. Τα διαπιστευμένα εργαστήρια θα πρέπει να έχουν την απαραίτητη οργάνωση, εξειδικευμένο προσωπικό και υποδομή ώστε να είναι σε θέση να χειριστούν ακόμη και έκτακτες καταστάσεις ατυχημάτων και υπερεκθέσεων σε γενοτοξικούς παράγοντες.

2. Βιοδοσιμετρία με μεθόδους κυτταρογενετικής και μοριακής γενετικής νέας τεχνολογίας για την εκτίμηση της επικινδυνότητας υπερεκθέσεων παρελθόντων ετών

Η κλασική κυτταρογενετική μεθοδολογία δοσιμετρίας προϋποθέτει καλλιέργεια λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος παρουσία μιτογόνων παραγόντων ώστε τα κύτταρα να προχωρήσουν στον κυτταρικό τους κύκλο και να γίνει δυνατή η ανάλυση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων στη μετάφαση, όπως δακτυλίων και δικεντρικών χρωμοσωμάτων (Εικόνα 1). Η συχνότητα εμφάνισης των αλλοιώσεων αυτών ανά κύτταρο είναι συνάρτηση της απορροφουμένης δόσης. Χρησιμοποιώντας αυτές ως δείκτη της έκθεσης η απορροφούμενη δόση προσδιορίζεται μέσω προτύπων καμπυλών αναφοράς οι οποίες έχουν κατασκευαστεί στο Εργαστήριο μας μετά από *in vitro* ακτινοβόληση περιφερικού αίματος. Οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς έχουν γενικά μορφή γραμμική-δευτεροβάθμια (Εικόνα 2):

$$Y = c + \alpha D + \beta D^2$$



Εικόνα 1: Μετάφαση λεμφοκυττάρου περιφερικού αίματος μετά από έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία (6Gy) και χρώση Giemsa. Στην εικόνα φαίνονται ένα τρικεντρικό χρωμόσωμα, δύο δικεντρικά, καθώς και άκεντροι δακτύλιοι και θραύσματα χρωμοσωμάτων

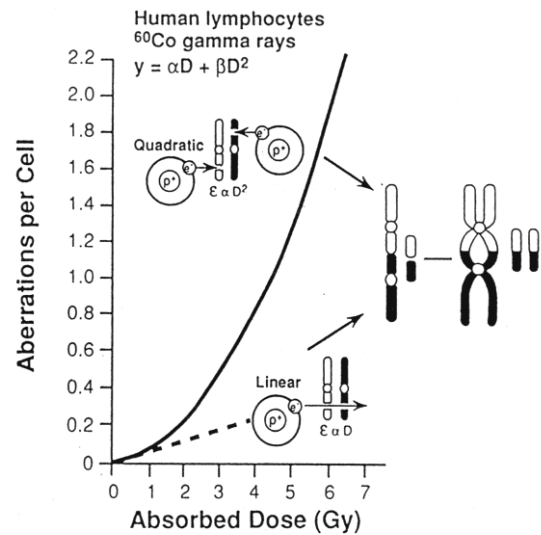
όπου Y ο αριθμός δικεντρικών χρωμοσωμάτων ανά κύτταρο, D η απορροφούμενη δόση ακτινοβολίας σε grays και α , β , συντελεστές που εξαρτώνται από παράγοντες όπως το είδος της ακτινοβολίας. Για υψηλού LET ακτινοβολίες ή παρατεταμένες εκθέσεις (με διάρκεια μεγαλύτερη της μιας ημέρας) ο συντελεστής β δε διαφέρει από το μηδέν. Όσον αφορά ολόσωμες οξείες εκθέσεις μεγαλύτερες από 0.05Gy, η μελέτη των επαγόμενων δικεντρικών χρωμοσωμάτων προσδιορίζει την απορροφούμενη δόση ακτινοβολίας με ικανοποιητική ακρίβεια (σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%) βάσει στατιστικής Poisson. Τα επαγόμενα από την ακτινοβολία δικεντρικά χρωμοσώματα στα οποία βασίζεται η κλασική αυτή μεθοδολογία βιοδοσιμετρίας είναι εντούτοις από τη φύση τους ασταθή. Αυτό οφείλεται στον πεπερασμένο χρόνο ζωής των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος και στην αντικατάστασή τους μετά από πολλαπλασιασμό αρχέγονων κυττάρων κυρίως του μυελού των οστών. Η αντικατάσταση των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος πραγματοποιείται από νέα φυσιολογικά ή από

λεμφοκύτταρα με αλλοιώσεις που είναι όμως συμβατές με την κυτταρική τους διαίρεση. Η αξιοπιστία επομένως της κλασικής μεθοδολογίας βιοδοσιμετρίας ελαττώνεται όσο αυξάνεται το χρονικό

διάστημα από την ημέρα της υπερέκθεσης και ως εκ τούτου δεν προσφέρεται για την εκτίμηση δόσεων σε περιπτώσεις που έχει παρέλθει μεγάλο χρονικό διάστημα από το ατύχημα.

Δεδομένου ότι υπάρχουν οι αβεβαιότητες που προαναφέρθηκαν με τη χρήση της συμβατικής μεθοδολογίας βιοδοσιμετρίας, θεωρήθηκε αναγκαία η ανάπτυξη μιας περισσότερο αξιόπιστης μεθόδου ιδιαίτερα για την αξιολόγηση ατυχημάτων παρελθόντων ετών. Θεωρείται απαραίτητο σήμερα, να εκτιμηθούν αναδρομικά οι απορροφούμενες δόσεις (retrospective dosimetry) εκτιθεμένων ατόμων με μεθόδους βιοδοσιμετρίας ώστε να χρησιμοποιηθούν στις επιδημιολογικές μελέτες που διεξάγονται σχετικά με τα απώτερα αποτελέσματα των ακτινοβολιών στην υγεία των ατόμων αυτών. Οι έρευνες επομένως για την ανάπτυξη μεθόδων βιοδοσιμετρίας και ιδιαίτερα για την αξιολόγηση ατυχημάτων παρελθόντων ετών στράφηκαν στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση σταθερών χρωμοσωματικών μετατοπίσεων που επίσης επάγονται μετά από έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία. Οι αλλοιώσεις αυτές είναι ανακατατάξεις και μετατοπίσεις του χρωμοσωματικού υλικού, τέτοιες ώστε το γονιδίωμα στο σύνολό του να παραμένει σταθερό. Είναι δηλαδή γονιδιακά ισορροπημένες και είναι δυνατόν να ανιχνευτούν στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος συμβάλλοντας στην εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης και μετά την πάροδο μεγάλου χρονικού διαστήματος από ένα ατύχημα. Οι σταθερές χρωμοσωματικές μετατοπίσεις ή αντιμεταθέσεις είναι επιπλέον σημαντικές διότι ο σχηματισμός τους συνδέεται πιθανά με τους μηχανισμούς καρκινογένεσης και η μελέτη τους θα μπορούσε να συνεισφέρει στη διελεύκανση της καρκινογόνου δράσης των ιοντίζουσών ακτινοβολιών.

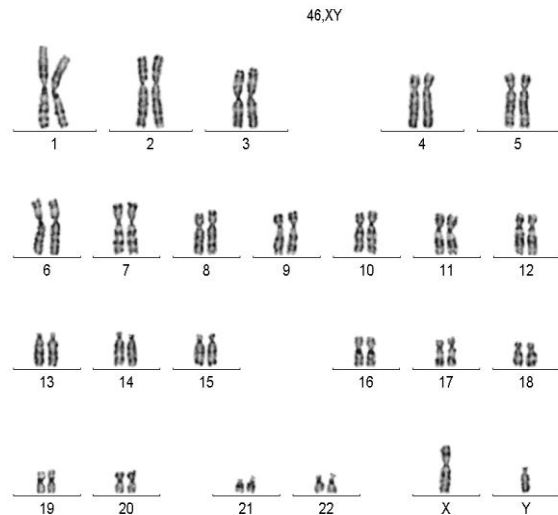
Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την ανίχνευση των σταθερών χρωμοσωματικών αντιμεταθέσεων είναι η GTG-ζώνωση χρωμοσωμάτων με Trypsin και Giemsa (Εικόνα 3,4), η οποία



Εικόνα 2



Εικόνα 3: Απεικόνιση χρωμοσωμάτων στη μετάφαση με τη μέθοδο GTG-ζώνωσης μετά από καλλιέργεια λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος



Εικόνα 4: Φυσιολογικός συστατικός καρυότυπος άρρενος με τη μέθοδο GTG-ζώνωσης χρωμοσωμάτων

επιτρέπει τον αδιαμφισβήτητο καθορισμό κάθε χρωμοσώματος. Δομικές επομένως ατυπίες που αφορούν δύο ή περισσότερα χρωμοσώματα και εμφανίζονται συνήθως σαν μετατοπίσεις ή ανταλλαγές χρωμοσωματικού υλικού μπορούν να εντοπιστούν (Εικόνα 5). Η ανάλυση όμως με την

μέθοδο αυτή, αν και αναφέρεται σε σταθερές χρωμοσωματικές αλλοιώσεις που αφορούν το συνολικό γονιδίωμα ενός κυττάρου, είναι επίπονη και χρονοβόρα ιδιαίτερα όταν θα πρέπει να αναλυθούν εκατοντάδες κύτταρα χωρίς τη χρήση αυτόματου αναλυτή καρυοτύπου.

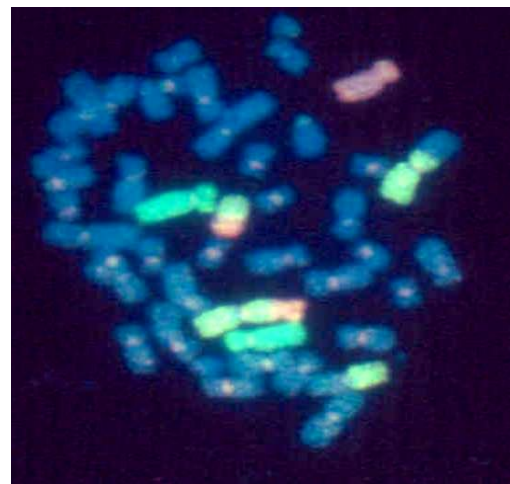


Για την ταχεία ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των σταθερών χρωμοσωματικών αλλοιώσεων σε δείγματα περιφερικού αίματος μετά από μια υπερέκθεση, ως εναλλακτικές της μεθόδου GTG-ζώνωσης χρωμοσωμάτων, χρησιμοποιήθηκαν κυτταρογενετικές μέθοδοι σε συνδυασμό με τεχνικές μοριακής γενετικής νέας τεχνολογίας όπως η τεχνική FISH (Fluorescence in Situ Hybridization). Η μεθοδολογία αυτή επιτρέπει την ομοιόμορφη χρώση προεπιλεγμένων χρωμοσωμάτων με τη χρήση μοριακών ανιχνευτών (DNA probes) σημασμένων με φθορισμοφόρες ουσίες (fluorophores). Χρησιμοποιώντας διαφορετικές φθορισμοφόρες ουσίες για τη χρώση των μη υβριδισμένων χρωμοσωματικών περιοχών, γίνεται εύκολη η ανίχνευση μετατοπίσεων τμημάτων των επιλεγμένων χρωμοσωμάτων από τη διχρωμία που παρουσιάζουν (Εικόνα 6,7).

Εικόνα 5: Απεικόνιση χρωμοσωμάτων στη μετάφαση με τη μέθοδο GTG-ζώνωσης μετά τη δράση γενοτοξικών παραγόντων και την καλλιέργεια λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος.



Εικόνα 6,



Εικόνα 7

Χρησιμοποιώντας ως βιολογικό δείκτη της έκθεσης τις χρωμοσωματικές μετατοπίσεις που ανιχνεύονται με τη μεθοδολογία FISH, η απορροφούμενη δόση μπορεί να προσδιορισθεί μέσω των προτύπων καμπυλών αναφοράς των οποίων η κατασκευή έγινε με βάση την επισήμανση των χρωμοσωμάτων #1, 4 και 8 καθώς και των κεντρομεριδίων όλων των χρωμοσωμάτων με ειδικούς DNA-ανιχνευτές. Με τη μεθοδολογία αυτή κατέστη δυνατή η διάκριση των σταθερών χρωμοσωματικών αλλοιώσεων από τις ασταθείς αλλοιώσεις, όπως τα δικεντρικά χρωμοσώματα, στις οποίες εμπλέκονται τα προεπιλεγμένα χρωμοσώματα. Η καμπύλη των σταθερών μετατοπίσεων για τα χρωμοσώματα #1, 4 και 8 συναρτήσε της δόσης που προέκυψε από *in vitro* πειράματα γ-ακτινοβολήσε περιφερικού αίματος περιγράφεται ως εξής:

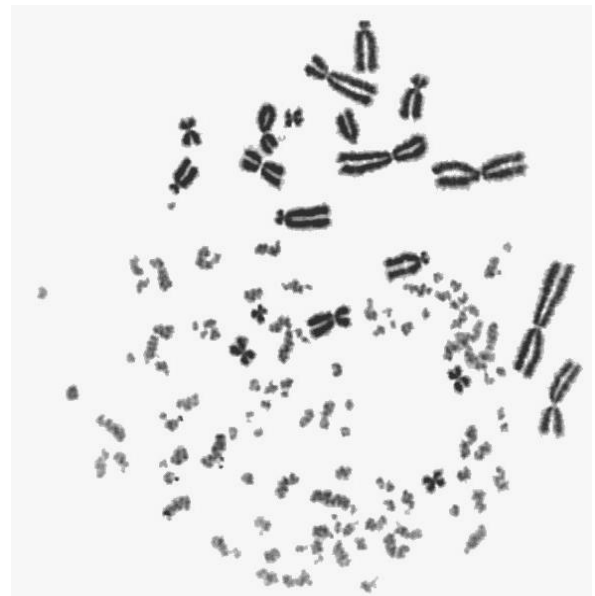
$$Y = 0.43 + 6.64 D + 0.76 D^2$$

Μετά από διεργαστηριακές συγκρίσεις μεταξύ του Εργαστηρίου μας και τριών ακόμη Εργαστηρίων Βιοδοσιμετρίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης κατασκευάστηκε κοινή πρότυπη καμπύλη αναφοράς (Savage et al., 2000) η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό αναδρομικά των απορροφούμενων δόσεων ακτινοβολίας εργαζομένων στο Ρωσικό πυρηνικό εργοστάσιο Mayak (Bauchinger et al., 2001).

Για την αντιμετώπιση όμως ατυχημάτων με ιοντίζουσες ακτινοβολίες όπου υπάρχει επιτακτική ανάγκη άμεσου προσδιορισμού των απορροφούμενων δόσεων των υπερεκτιθέμενων για τη λήψη καταλλήλων μέτρων ακτινοπροστασίας ή ιατρικής περίθαλψης, αναπτύχθηκε από το Εργαστήριό μας η μέθοδος της πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης (PCC) (Εικόνα 8,9) σε συνδυασμό με τη χρώση



Εικόνα 8: Επαγωγή πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης με τη μέθοδο της κυτταρικής σύντηξης λεμφοκυττάρων και μιτωτικών της σειράς CHO. Τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα στο περιφερικό αίμα (φάση Go) έχουν 46 μονοχρωματιδιακά χρωμοσώματα



Εικόνα 9: Επαγωγή πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης με τη μέθοδο της κυτταρικής σύντηξης Go λεμφοκυττάρων και μιτωτικών της σειράς CHO. Τα λεμφοκύτταρα στο περιφερικό αίμα παρουσιάζουν εμφανείς χρωμοσωματικές αλλοιώσεις μετά την έκθεσή τους σε γενετοξικούς παράγοντες.

των κεντρομεριδίων (C-banded PCCs) (Pantelias et al., 1993). Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η απευθείας ανάλυση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων σε μεσοφασικά χρωμοσώματα λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος, αποφεύγοντας έτσι την καθυστέρηση των 48 ωρών και τις επιπλοκές από την καλλιέργεια του περιφερικού αίματος. Εντούτοις και η τεχνική αυτή βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση δακτυλίων και δικεντρικών χρωμοσωμάτων που είναι ασταθείς αλλοιώσεις και μειώνονται με την πάροδο του χρόνου. Η ευαισθησία και αξιοπιστία της μεθόδου αυτής ελαττώνεται επίσης όσο αυξάνεται το χρονικό διάστημα από την ημέρα που συνέβη το ατύχημα

Η συνδυασμένη όμως μεθοδολογία PCC-FISH που χρησιμοποιήθηκε στο Εργαστήριό μας αποδείχθηκε περισσότερο κατάλληλη για την εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης σε περιπτώσεις έκτακτης ανάγκης αυξάνοντας το εύρος ευαισθησίας της μεθόδου. Οι σταθερές χρωμοσωματικές μετατοπίσεις στα PCC αποδείχθηκαν ευκολότερα ανιχνεύσιμες με FISH εξαιτίας της χρωματικής επισήμανσης των επιλεγμένων χρωμοσωμάτων. Ιδιαίτερα σε μεγάλες δόσεις ολόσωμης ακτινοβολίας, όπου τα λεμφοκύτταρα είναι αδύνατον να επιτελέσουν κυτταρικό κύκλο για να φθάσουν και να αναλυθούν στη μετάφραση, η μεθοδολογία PCC-FISH προσφέρει τη μοναδική, γρήγορη, ευαίσθητη και αξιόπιστη εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης ακτινοβολίας. Στην περίπτωση έκθεσης μέρους μόνο του σώματος σε μεγάλη δόση ακτινοβολίας, η μεθοδολογία αυτή προσφέρει τη μόνη αξιόπιστη εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης αφού δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης και ανάλυσης των λίγων αλλά σοβαρά αλλοιωμένων κυττάρων. Σε αντίθεση, καλλιέργεια δείγματος περιφερικού αίματος και ανάλυση των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων στη μετάφραση δεν είναι δυνατόν να οδηγήσει σε αξιόπιστα

συμπεράσματα. Τα σοβαρά αλλοιωμένα κύτταρα θα παρουσιάσουν καθυστέρηση στον κυτταρικό τους κύκλο με αποτέλεσμα τα λεμφοκύτταρα που θα αναλυθούν στη μετάφαση μετά από 48 ώρες καλλιέργειας θα είναι στην πλειοψηφία τους μη ακτινοβολημένα.

Συμπερασματικά, η μέθοδος FISH τόσο σε μεταφασικά όσο και σε μεσοφασικά χρωμοσώματα περιφερικού αίματος, σε συνδυασμό με ζώνωση χρωμοσωμάτων, συμβάλλει στην αξιολόγηση υπερεκθέσεων και την εκτίμηση δόσεων και κινδύνου καρκινογένεσης. Η ανίχνευση σταθερών χρωμοσωματικών αλλοιώσεων, η ταυτοποίηση στη συνέχεια των αλλοιώσεων αυτών με ζώνωση χρωμοσωμάτων και η δυνατότητα εντοπισμού κλώνου κυττάρων, που να σχετίζεται άμεσα ή έμμεσα με συγκεκριμένο νεοπλασματικό νόσημα, θα συμβάλλουν ουσιαστικά στην εκτίμηση της επικινδυνότητας μιας υπερέκθεσης. Η προσέγγιση αυτή, αποτελεί την πλέον ευαίσθητη και αξιόπιστη μεθοδολογία βιοδοσιμετρίας σήμερα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε καθημερινή βάση για σκοπούς ακτινοπροστασίας (IAEA, 2001).

3. Μηχανισμοί ακτινοευαισθησίας στο μοριακό και κυτταρογενετικό επίπεδο

Η γνώση των παραγόντων που καθορίζουν την ακτινοευαισθησία και ιδιαίτερα τη χρωμοσωματική, είναι δυνατόν να αποτελέσει το απαραίτητο βιολογικό υπόβαθρο για την ανάπτυξη μεθοδολογιών ώστε να εντοπίζονται μέλη του πληθυσμού που εμφανίζουν υπερευαισθησία στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Ειδικότερα σε περιπτώσεις ατυχημάτων με ιοντίζουσες ακτινοβολίες η μέτρηση της χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας του εκτιθέμενου θα συμβάλλει με μοναδικό τρόπο στην κατάταξή του ή όχι σε ομάδα του πληθυσμού υψηλής επικινδυνότητας. Για την κατανόηση των παραγόντων αυτών που καθορίζουν τη διακύμανση της ακτινοευαισθησίας μεταξύ ατόμων του πληθυσμού, θεωρήθηκε κατ' αρχήν απαραίτητη η μελέτη των μηχανισμών που διέπουν τη διακύμανση της ακτινοευαισθησίας στο κυτταρογενετικό επίπεδο και ιδιαίτερα στις διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, στο πλαίσιο των ερευνητικών δραστηριοτήτων του Εργαστηρίου Υγειοφυσικής στον τομέα αυτό εξετάστηκε η εξής υπόθεση: Παράγοντες του κυτταρικού κύκλου όπως συμπλέγματα κυκλινών p34cdc2 και η ενεργότητα των H1 και H3 κινασών που ρυθμίζουν τη βιοχημική διαδικασία της φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης της χρωματίνης, επηρεάζουν τη μετατροπή των DNA αλλοιώσεων σε χρωμοσωματικές αλλοιώσεις και καθορίζουν την ενδογενή ακτινοευαισθησία στο κυτταρικό επίπεδο. Τα αποτελέσματα της έρευνας ενισχύουν την υπόθεση ότι μετά από έκθεση σε ακτινοβολία η έναρξη και η αποτελεσματικότητα της συμπύκνωσης και αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης παίζουν καθοριστικό ρόλο στη μετατροπή των DNA αλλοιώσεων σε χρωμοσωματικές αλλοιώσεις. Η μετατροπή αυτή ρυθμίζεται από παράγοντες του κυτταρικού κύκλου και ίσως αποτελεί την εξήγηση της διακύμανσης της ακτινοευαισθησίας τόσο μεταξύ των διαφόρων φάσεων του κυτταρικού κύκλου όσο και μεταξύ διαφορετικού είδους κυττάρων (Pantelias 1993, Terzoudi and Pantelias, 1997). Η προτεινόμενη διαδικασία μετατροπής των μοριακών αλλοιώσεων σε χρωμοσωματικές από παράγοντες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο είναι γενετικά καθορισμένη και συνεπώς μετά από γενετική τροποποίηση ή έκθεση σε μεταλλαξιγόνους παράγοντες είναι δυνατόν να διαφοροποιηθεί. Τα δεδομένα αυτά συμβάλλουν στην κατανόηση όχι μόνο των μηχανισμών σχηματισμού χρωμοσωματικών αλλοιώσεων αλλά και της διακύμανσης της ακτινοευαισθησίας μεταξύ των διαφόρων φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον ενδεχομένως να συμβάλλουν και στη διευκρίνιση της φύσης της διαφορετικής ακτινοευαισθησίας μεταξύ των μελών του πληθυσμού. (Terzoudi et al., 2005).

4. Ανίχνευση ατόμων του πληθυσμού με αυξημένη ευαισθησία στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες

Η αυξημένη ευαισθησία στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες πιθανά σχετίζεται με την παρουσία μεταλλαγμένων γονιδίων και αυξάνονται καθημερινά οι ενδείξεις για κληρονομική μεταβίβαση των γονιδίων αυτών. Η άμεση ανίχνευση των γονιδίων αυτών σε μέλη του πληθυσμού θα συνέβαλλε σημαντικά στην προσπάθεια ανάπτυξης μιας μεθόδου ανίχνευσης ατόμων του πληθυσμού με αυξημένη ευαισθησία στην ακτινοβολία. Αυτό προϋποθέτει όμως ότι τα συγκεκριμένα γονίδια έχουν καθοριστεί και κλωνοποιηθεί. Επιπλέον, η εκδήλωση αυξημένης ακτινοευαισθησίας ενδεχομένως να μην είναι

αποτέλεσμα μετάλλαξης ενός μόνο γονιδίου αλλά συνεργίας πολλών. Η προσέγγιση επομένως του προβλήματος με άμεση ανίχνευση γονιδίων που προδιαθέτουν σε αυξημένη ακτινοευαισθησία γίνεται ακόμη πιο δύσκολη.

Εναλλακτικές λύσεις αποτελούν οι επιγονιακές εκφράσεις και συνεπαγόμενα φαινόμενα στο μοριακό, χρωμοσωματικό, ή κυτταρικό επίπεδο μετά από έκθεση σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Μία από τις ενδείξεις αυτές αποτελεί η αποτελεσματικότητα επεξεργασίας και μετατροπής των βλαβών που επάγονται στο DNA που αξιολογείται π.χ. με βάση τις εναπομένουσες χρωμοσωματικές αλλοιώσεις μετά από ακτινοβολία στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα φαινόμενα φωσφοριλίωσης και συμπύκνωσης της χρωματίνης καθώς το κύτταρο προετοιμάζεται για τη μιτωτική του διαίρεση, λαμβάνουν χώρα ως επί το πλείστον κατά τη διάρκεια της G2 φάσης του κυτταρικού κύκλου και πιθανότατα εξηγούν την αυξημένη ενδογενή ακτινοευαισθησία της φάσης αυτής. Μία από τις ενδείξεις επομένως της εν γένει ακτινοευαισθησίας του ατόμου αποτελεί η μη αποτελεσματική επεξεργασία των βλαβών που επάγονται στο DNA μετά από ακτινοβολία στη G2 φάση που αξιολογείται με τις εναπομένουσες χρωματιδικές αλλοιώσεις στη μετάφαση (Εικόνα 10,11). Η αυξημένη ακτινοευαισθησία ενός εκτιθέμενου σε περίπτωση ατυχήματος με ιοντίζουσες ακτινοβολίες προφανώς οδηγεί σε διαφορετική συχνότητα θραυσμάτων χρωματίδης μετά από έκθεση των κυττάρων του ατόμου στη φάση αυτή.

Με στόχο την ανάπτυξη μιας ευαίσθητης μεθοδολογίας για την ανίχνευση αυξημένης ευαισθησίας ατόμων του πληθυσμού στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες, μελετήθηκε η ενδογενής ακτινοευαισθησία της G2 φάσης του κυτταρικού κύκλου λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος.



Εικόνα 10: Απεικόνιση φυσιολογικών χρωμοσωμάτων στη μετάφαση μετά από χρήση της χρώσης Giemsa



Εικόνα 11: Απεικόνιση χρωματιδικών θραυσμάτων στη μετάφαση μετά από ακτινοβολία στη G2 φάση για έλεγχο ακτινοευαισθησίας

Με τα αποτελέσματα του G2-ελέγχου ακτινοευαισθησίας των λεμφοκυττάρων φυσιολογικών δοτών-μαρτύρων, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει διακύμανση μεταξύ των μελών του πληθυσμού όσον αφορά τη χρωμοσωματική ακτινοευαισθησία τους. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε είχε ικανοποιητική ευαισθησία ώστε να διακρίνει διαφορές μεταξύ φυσιολογικών ατόμων ως προς τη μετατροπή των DNA-αλλοιώσεων στη G2 φάση των λεμφοκυττάρων τους σε ορατές χρωμοσωματικές αλλοιώσεις στη μετάφαση. Εκφράζει όμως η μέτρηση της G2-ακτινοευαισθησίας μελών του πληθυσμού και την εν γένει ακτινοευαισθησία τους; Για να απαντηθεί το ερώτημα αυτό πραγματοποιήθηκε έλεγχος της G2-ακτινοευαισθησίας λεμφοκυττάρων ασθενών με νεοπλασματικά νοσήματα οι οποίοι εμφάνισαν οξείες ακτινικές αντιδράσεις κατά την ακτινοθεραπεία τους, ώστε να διαπιστωθεί ο συσχετισμός της *in vitro* G2-ακτινοευαισθησίας τους με την αποδεδειγμένα αυξημένη

τους ευαισθησία στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Στα διαφορετικά δείγματα περιφερικού αίματος που αναλύθηκαν, οι χρωματιδικές αλλοιώσεις σαν αποτέλεσμα της G2-ακτινοβόλησης των λεμφοκυττάρων των ασθενών ήταν σημαντικά αυξημένες (σε επίπεδο σημαντικότητας 99%) σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα υγιών δοτών. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την προτεινόμενη υπόθεση ότι η υπερευαισθησία ενός ατόμου στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες εκφράζεται με αυξημένη G2-ακτινοευαισθησία των λεμφοκυττάρων του. Υποδεικνύουν επιπλέον ότι σε περιπτώσεις ατυχημάτων με ιοντίζουσες ακτινοβολίες η μέτρηση αυξημένης χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας του εκτιθέμενου θα συνέβαλε αποφασιστικά στην εξατομίκευση της επικινδυνότητας του ατυχήματος για τον συγκεκριμένο εκτιθέμενο.

Η αναγκαιότητα ανίχνευσης αυξημένης ακτινοευαισθησίας εμφανίζεται όμως όχι μόνο σε περιπτώσεις έκθεσης ατόμων σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες λόγω ατυχήματος ή επαγγελματικής έκθεσης, αλλά και στην καθημερινή πρακτική της Ακτινοθεραπείας. Έχουν αναφερθεί περιστατικά ασθενών που υπεβλήθησαν σε ακτινοθεραπεία με το συνήθες θεραπευτικό πρωτόκολλο, δεδομένου ότι ο θεράπων ιατρός δεν είχε ενδείξεις ότι ο ασθενής ανήκε σε κάποιο σύνδρομο γνωστό για την ακτινοευαισθησία που εκφράζει. Για παράδειγμα, ασθενής με οξεία λεμφογενή λευχαιμία απεβίωσε μετά από ακτινοθεραπεία και εκ' των υστέρων οι δραματικές επιπτώσεις της ακτινοβόλησης αποδόθηκαν στην ανικανότητα των επιδιορθωτικών μηχανισμών των κυττάρων του να αντιμετωπίσουν αλλοιώσεις επαγόμενες από ακτινοβολία στο DNA (Badie et al., 1995 και 1996). Καθοριστικό παράγοντα της αντίδρασης του φυσιολογικού ιστού των εκτιθεμένων ατόμων αποτελεί η ενδογενής ακτινοευαισθησία των κυττάρων του (Tucker et al., 1992). Είναι γνωστό ότι κατά την ακτινοθεραπεία ασθενών με νεοπλασίες, η πιθανότητα ελέγχου του κακοήθους νεοπλάσματος αυξάνεται συναρτήσει της δόσης. Η ολική δόση που είναι δυνατόν να δοθεί σ' ένα συγκεκριμένο όγκο περιορίζεται από την ακτινοευαισθησία του υγιούς ιστού που περιβάλλει τον όγκο. Επιπλέον, ο βαθμός ακτινικής αντίδρασης του υγιούς ιστού έχει παρατηρηθεί να διαφέρει σημαντικά ακόμη και μεταξύ ασθενών στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν πρωτόκολλα ακτινοθεραπείας με πανομοιότυπες φυσικογεωμετρικές παραμέτρους. Οι αντιδράσεις του υγιούς ιστού των ασθενών που περιβάλλει τον όγκο εκτείνονται γενικά από ήπιες έως εξαιρετικά σοβαρές και όπως έχει αναφερθεί κατά περίπτωση θανατηφόρες. Εκτός των ακραίων περιστατικών που αναφέρθηκαν παραπάνω, ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με νεοπλασίες που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία εμφανίζει είτε οξείες ακτινικές αντιδράσεις, όπως έντονο ερύθημα, απολέπιση του δέρματος και οίδημα, είτε απώτερες όπως ίνωση και τελαγγειεκτασία. Το ποσοστό αυτό εκτιμάται στο 5% του συνολικού αριθμού των ασθενών που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία και μεταφράζεται σε 8.000 περίπου ασθενείς ανά έτος στις Ευρωπαϊκές χώρες. Είναι φανερό πως η γνώση του βαθμού ευαισθησίας των ασθενών στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες θα δώσει τη δυνατότητα αύξησης του ελέγχου του κακοήθους νεοπλάσματος και μείωσης των σοβαρών επιπλοκών που πολλές φορές ακολουθούν την ακτινοθεραπεία.

Η προτεινόμενη μεθοδολογία επομένως η οποία καθιστά δυνατή την μέτρηση ενδεχόμενης in vitro κυτταρικής υπερευαισθησίας του ατόμου, είναι δυνατόν να αποτελέσει ένα πολύ σημαντικό βήμα στην προσπάθεια εξατομίκευσης των πρωτοκόλλων ακτινοθεραπείας και να συμβάλλει στην ελαχιστοποίηση των ακτινικών αντιδράσεων στα ακτινοευαίσθητα άτομα μειώνοντας τη δόση ακτινοβολίας, αλλά και στον καλύτερο έλεγχο και αντιμετώπιση του κακοήθους νεοπλάσματος στα ακτινοάντοχα άτομα αυξάνοντας τη δόση.

5. Ανίχνευση αυξημένης ακτινοευαισθησίας ατόμων του πληθυσμού και γενετικής προδιάθεσης στην καρκινογένεση

Η προτεινόμενη μεθοδολογία μέτρησης αυξημένης ακτινοευαισθησίας χρησιμοποιώντας τη χρωμοσωματική ακτινοευαισθησία της G2-φάσης λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος, αποκτά μεγαλύτερο ενδιαφέρον επιπλέον καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι άτομα του πληθυσμού με αυξημένη G2 ακτινοευαισθησία εκδηλώνουν και γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση (Sanford et al. 1989, Scott et al. 1994 και 2000, Baria et al., 2001). Συγκεκριμένα, οι ερευνητικές δραστηριότητες του ερευνητικού μας ομίλου αποσκοπούσαν στον έλεγχο της υπόθεσης ότι κύτταρα με προδιάθεση στην καρκινογένεση, σε σχέση με υγιή κύτταρα, εμφανίζουν στη G2 αυξημένη χρωμοσωματική ακτινοευαισθησία.

Για τον έλεγχο της ανωτέρω υπόθεσης εφαρμόστηκε η μεθοδολογία ανίχνευσης της G2-ακτινοευαισθησίας σε δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών με νεοπλασματικά νοσήματα. Για όλες

τις ομάδες ασθενών με νεοπλασματικά νοσήματα παρατηρήθηκε αύξηση στο μέσο όρο των θραυσμάτων χρωματίδης ανά κύτταρο από 50% έως 100%. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα δείγματα που παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές G2-χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας προήλθαν από ασθενείς που, όπως ήδη έχει αναφερθεί, είχαν εκδηλώσει αυξημένη ακτινοευαισθησία με άμεσες ή απώτερες επιπτώσεις της ακτινοθεραπείας στην οποία υποβλήθηκαν. Γενικά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι ασθενείς με νεοπλασίες εκφράζουν κατά μέσο όρο αυξημένη G2-ακτινοευαισθησία σε σχέση με τους υγιείς δότες (Terzoudi et al., 2000). Η αυξημένη G2 ακτινοευαισθησία που παρατηρείται σε καρκινικά ή με προδιάθεση στην καρκινογένεση κύτταρα έχει αποδοθεί σε μεταλλαγμένα γονίδια που επιδρούν ανασταλτικά στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων (Sanford et al. 1989, Parshad et al. 1993). Παρέχουν με τον τρόπο αυτό την απαιτούμενη χρωμοσωματική αστάθεια η οποία, με την παρουσία επιπλέον μεταλλάξεων σε γονίδια που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, δύναται να είναι προάγγελος νεοπλασίας. Γενικά όμως η αυξημένη ακτινοευαισθησία των κυττάρων αυτών είναι δυνατόν να προέρχεται από: α) αυξημένο αρχικό χρωμοσωματικό θρυμματισμό, β) αυξημένη χρωμοσωματική αστάθεια, γ) μειωμένη καθυστέρηση στη G2 φάση μετά από ακτινοβολήση, η οποία επιτρέπει λιγότερο χρόνο για επιδιόρθωση του DNA δ) ενδογενή ανικανότητα επιδιόρθωσης αλλοιώσεων στο DNA και ε) διαφορές στη μετατροπή των DNA αλλοιώσεων σε χρωμοσωματικές υπό την επίδραση των MPF παραγόντων της G2 φάσης.

Τα αποτελέσματα της έρευνας στον τομέα αυτό υποστηρίζουν ότι μετά από έκθεση σε ακτινοβολία, καθοριστικό ρόλο στη μετατροπή των DNA αλλοιώσεων σε χρωμοσωματικές αλλοιώσεις παίζουν η αποτελεσματικότητα της συμπύκνωσης και αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης (Terzoudi and Pantelias, 1997). Ο μηχανισμός είναι ανταγωνιστικός της επιδιόρθωσης των αλλοιώσεων και στηρίζεται στους MPF παράγοντες της G2 φάσης του κυτταρικού κύκλου. Η προτεινόμενη διαδικασία μετατροπής των μοριακών αλλοιώσεων σε χρωμοσωματικές από παράγοντες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο είναι γενετικά καθορισμένη και συνεπώς μετά από γενετική τροποποίηση ή έκθεση σε μεταλλαξιγόνους παράγοντες είναι δυνατόν να διαφοροποιηθεί. Τα δεδομένα αυτά συμβάλλουν στη διευκρίνιση της φύσης της διαφορετικής G2-ακτινοευαισθησίας μεταξύ των μελών του πληθυσμού και προσφέρουν τη βάση μεθοδολογίας η οποία δύναται να εντοπίσει άτομα ευαίσθητα στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες που επιπλέον ενδεχομένως βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο λόγω γενετικής προδιάθεσης στην καρκινογένεση (Terzoudi et al., 2000).

Η κατανόηση των παραγόντων που καθορίζουν τη διαφορετική ακτινοευαισθησία των κυττάρων και κατ' επέκταση των ατόμων του πληθυσμού, συνεισφέρει ουσιαστικά στην επιβεβαίωση και αξιολόγηση ενός ατυχήματος, στην έγκαιρη λήψη μέτρων για την αντιμετώπιση των άμεσων βιολογικών επιπτώσεων καθώς και στο συσχετισμό της απορροφούμενης δόσης με την εμφάνιση των απώτερων αποτελεσμάτων που κατά κοινή παραδοχή το σημαντικότερο είναι η καρκινογένεση. Η προτεινόμενη μεθοδολογία G2-χρωμοσωματικού ελέγχου για την μέτρηση αυξημένης ακτινοευαισθησίας στο πλαίσιο αξιολόγησης μιας υπερέκθεσης, είναι δυνατόν να συμβάλλει ουσιαστικά όχι μόνο στην εξατομίκευση της επικινδυνότητας της υπερέκθεσης αλλά και στην ακτινοπροστασία γενικά του πληθυσμού (Manola et al., 2003).

6. *Νέα μέθοδος μέτρησης γενοτοξικής δράσης χημικών παραγόντων που προκαλούν κυτταρική καθυστέρηση στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου*

Η κλασική μέθοδος μέτρησης της γενοτοξικής δράσης χημικών παραγόντων με ανάλυση ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων *in vitro* διεξάγεται αποκλειστικά σε κύτταρα που βρίσκονται στη μετάφαση της δεύτερης μιτωτικής διαίρεσης (Εικόνα 12). Επομένως, στην ανάλυση δεν συμπεριλαμβάνονται κύτταρα που έχουν καθυστερήσει π.χ. στην G2 φάση του κυτταρικού τους κύκλου λόγω της έκθεσής τους σε γενοτοξικούς παράγοντες. Είναι γνωστό εντούτοις ότι μετά από έκθεση σε υψηλές δόσεις ενός γενοτοξικού παράγοντα τα περισσότερα κύτταρα καθυστερούν στην G2 φάση του κυτταρικού τους κύκλου. Αυτό είναι ένα πολύ σημαντικό μειονέκτημα της κλασικής μεθοδολογίας και επειδή κατά κανόνα τα κύτταρα που εισέρχονται στη μετάφαση χωρίς καθυστέρηση είναι εκείνα με τις λιγότερες αλλοιώσεις, η εκτίμηση της συχνότητας των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων μετά από έκθεση σε υψηλές δόσεις είναι πρακτικά αδύνατο να πραγματοποιηθεί. Επομένως, η γενοτοξική δράση χημικών και φυσικών παραγόντων, που βασίζεται μέχρι σήμερα στην κλασική κυτταρογενετική μεθοδολογία και τη

συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων σε μεταφασικά κύτταρα, ενδεχομένως να υποεκτιμάται σημαντικά. Επιπλέον, σημαντικό μειονέκτημα της κλασικής ανάλυσης ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων αποκλειστικά σε κύτταρα που ευρίσκονται στη μετάφαση είναι και το γεγονός ότι, ακόμα και κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες πειραματικές συνθήκες, η συχνότητα των αυθόρμητων ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων είναι διαφορετική σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων του ανθρώπου, όπως και άλλων οργανισμών, καθώς επίσης και μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού.

Στο Εργαστήριό μας το ενδιαφέρον εστιάζεται στην προσπάθεια ανάλυσης των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων στη μεσόφαση και συγκεκριμένα στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 12: Απεικόνιση ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος στη μετάφαση με τη μέθοδο FPG. Η σύσφιξη των χρωματιδίων στο κεντρομερίδιο είναι χαρακτηριστικό των μεταφασικών χρωμοσωμάτων.

Η ανάλυση στη μεσόφαση θα συμβάλει ουσιαστικά αφενός στο να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει η κλασική μέθοδος ανάλυσης στη μετάφαση και αφετέρου στο να διευκρινιστούν οι μοριακοί μηχανισμοί επαγωγής ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων και χρωμοσωματικών αλλοιώσεων εν γένει. Για τον σκοπό αυτό, έγινε χρήση της χημικής ουσίας καλικουλίνης-A (calyculin A), ενός ισχυρού αναστολέα των φωσφατασών τύπου 1 και 2A, για την επαγωγή πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (Εικόνα 13, 14). Κατ' αρχήν έγινε προτυποποίηση της μεθοδολογίας και εξετάστηκε κατά πόσον η κλασική μέθοδος μέτρησης στη μετάφαση υποεκτιμά την γενετοξική δράση διαφόρων χημικών περιβαλλοντικών παραγόντων (Terzoudi et al., 2003). Με την εφαρμογή της νέας μεθοδολογίας ξεπεράστηκαν οι αδυναμίες που εμφανίζει η κλασική μέθοδος με στόχο: α) την εμπειριστατωμένη μελέτη παραγόντων καθώς και συνδυασμών τους που

χαρακτηρίζονται ως πιθανά μεταλλαξιγόνοι και καρκινογόνοι β) τη διερεύνηση και κατανόηση των μηχανισμών δράσης τους γ) την κατανόηση των αποκλίσεων των αποτελεσμάτων από διαφορετικά εργαστήρια που αναφέρονται στον χαρακτηρισμό της γενετοξικής δράσης παραγόντων με κυτταρογενετικές μεθόδους, που ενδεχομένως οφείλονται σε μεθοδολογικούς και βιολογικούς παράγοντες, δ) την μελέτη της γενετοξικής δράσης ορισμένων φυτοφαρμάκων, συνδυασμών τους καθώς και της χημικής ουσίας της υδροκινόνης και ε) τη διερεύνηση της σχέσης πολυμορφισμού του γονιδίου GSTT1, που εμπλέκεται στην αποτοξικοποίηση ενεργών μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων ουσιών, με τη συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων που παρατηρείται στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Συγκεκριμένα, με τη νέα μέθοδο που αναπτύχθηκε στο Εργαστήριό μας ελέγχθηκε και αξιολογήθηκε η γενετοξική δράση ευρέως διαδεδομένων εντομοκτόνων και ζιζανιοκτόνων όπως της Ατραζίνης, του Παρακουάτ, του Μανέμπ, της Δελταμετρίνης, του Κουζαλοφόπ, του Λινουρόν καθώς και συνδυασμού τους. Επιπλέον, με τη μέθοδο ανάλυσης ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων στην G2 φάση αξιολογήθηκε και η γενετοξική δράση της Υδροκινόνης με στόχο την κατανόηση του μηχανισμού δράσης της καρκινογόνου αυτής χημικής ουσίας. Εξετάστηκε επίσης εάν οι αποκλίσεις στη μέτρηση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων, που παρατηρούνται από άτομο σε άτομο, οφείλονται σε ενδογενείς διαφορές στην επεξεργασία των αλλοιώσεων που επάγονται στο DNA ή σε διαφορετική καθυστέρηση των αλλοιωμένων κυττάρων στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου και γενικά στη διαφορετική κινητική των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος που παρουσιάζουν διαφορετικά άτομα του πληθυσμού.



Εικόνα 13: SCEs σε G2-φάσης φυσιολογικό λεμφοκύτταρο

Εικόνα 14: SCEs σε G2-φάσης λεμφοκύτταρο μετά από έκθεση σε 50 µg/ml ατραζίνης

Καθώς όλα τα χημικά που μελετήθηκαν έχουν ενοχοποιηθεί για τη μεταλλαξιγόνο και πιθανή καρκινογόνο τους δράση, εξετάστηκε τέλος σε ανθρώπινο γενωμικό DNA από κύτταρα του περιφερικού αίματος, η σχέση πολυμορφισμού του γονιδίου GSTT1 με τη μέτρηση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων που παρατηρείται στα λεμφοκύτταρα των υπό εξέταση ατόμων. Οι μεταφορές της γλουταθειόνης S (GSTs) είναι μια οικογένεια κυτταροπλασματικών ενζύμων που εμπλέκονται στην αποτοξικοποίηση ενεργών καρκινογόνων. Συγκεκριμένα, με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) εξετάστηκε αν τα άτομα με ελλειμματικό GSTT1 γονίδιο είναι επιρρεπή ή όχι στην αύξηση της συχνότητας των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων που μετρούνται τόσο σε κύτταρα στη μετάφαση όσο και σε κύτταρα στην G2 φάση του κυτταρικού τους κύκλου.

Τα αποτελέσματα επιγραμματικά υποστηρίζουν ότι: α) Η μέθοδος μέτρησης ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων στην G2 φάση, που αναπτύχθηκε και προτυποποιήθηκε στο Εργαστήριό μας είναι πιο ευαίσθητη από την κλασική μέθοδο μέτρησης στη μετάφαση και πιο κατάλληλη για τη μελέτη καρκινογόνων ουσιών ιδιαίτερα εκείνων που λόγω της γενετοξικής τους δράσης καθυστερούν τα κύτταρα στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου β) Ένα σημαντικό μέρος των αποκλίσεων στη συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων, που παρατηρούνται από δότη σε δότη και μεταξύ εργαστηρίων ενδεχομένως, οφείλεται σε διαφορές της κινητικής των λεμφοκυττάρων *in vitro* γ) Υψηλές συγκεντρώσεις ατραζίνης δε δείχνουν δόσοεξαρτώμενη αύξηση στην G2 φάση της συχνότητας των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων και επισκευής αλλοιωμένου DNA με τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού. Συνεπώς τα πειραματικά δεδομένα δεν υποστηρίζουν τυχόν γενετοξική δράση της ατραζίνης (Malik et al., 2004) και δ) Ο αριθμός των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων ανά κύτταρο που παρατηρήθηκε σε δότες περιφερικού αίματος με GSTT1(-) δε διαφέρει από εκείνες που παρατηρήθηκαν σε δότες GSTT1(+). Ενδεχομένως λοιπόν η παρουσία ή όχι του γονιδίου GSTT1 να μην παίζει σημαντικό ρόλο στον μοριακό μηχανισμό ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Badie C., G. Iliakis, N. Foray, G. Alsbeih, G. E. Pantelias, R. Okayasu, N. Cheong, N. S. Russell, A. C. Begg, C.F. Arlett and E.P. Malaise (1995) Defective Repair of DNA Double-Strand Breaks and Chromosome Damage in Fibroblasts from a Radiosensitive Leukemia Patient. *Cancer Research*, 55, 1232-1234.

2. Badie C., G. Iliakis, N. Foray, G. Alsbeih, G.E. Pantelias, B. Cedervall, N. Chavaudra, C. Arlett and E. Malaise (1995). Induction and rejoining of DNA dsb and interphase chromosome breaks in two hypersensitive and one normal human fibroblast cell line after exposure to X - rays. *Radiation Res.*, 144, 26-35.
3. Baria K, Warren C, Roberts SA, West CM, Scott D. (2001). Chromosomal radiosensitivity as a marker of predisposition to common cancers? *Br J Cancer*, 6;84(7):892-896.
4. Bauchinger, M., Braselmann, H., Savage, J.R.K., Natarajan, A.T., Terzoudi, G.I., Pantelias, G.E., Darroudi, F., Figgitt, M., Griffin, C.S., Knehr, S., Okladnikova, N.D., Santos, S., and Snigiryova, G. (2001). A collaborative exercise on the use of FISH chromosome painting for retrospective biodosimetry of Mayak nuclear-industrial personnel. *International Journal of Radiation Biology*, 77(3), 259-267.
5. Malik, S.I., Terzoudi, G.I., and Pantelias, G.E. SCE analysis in G2-lymphocyte prematurely condensed chromosomes after exposure to atrazine: the non-dose-dependent increase in homologous recombinational events does not support its genotoxic mode of action. *Cytogenet Genome Res.*, **104**, 315-319, 2004.
6. Manola, K.N., Terzoudi, G.I., Dardoufas, K., S.I. Malik, and G.E. Pantelias. Radioprotective effect of amifostine on cells from cancer prone patients and healthy individuals studied by the G2 and PCC assays. *International Journal of Radiation Biology*, 831-838, 2003.
7. Pantelias G.E. (1993) Factors determining the yields of radiation-induced chromosome aberrations as visualised by means of premature chromosome condensation in interphase cells. In Obe,G. and Natarajan,A.T. (eds.), *Chromosome Alterations: Origin and Significance*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 140-149.
8. Pantelias G.E., G. Iliakis, C. Sambani and G. Politis (1993) Biological dosimetry of absorbed radiation by C-banding of interphase chromosomes in peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 63, 349-354.
9. Plowman P.N., B.A. Bridges, C.F. Arlett, A. Hinney and J.E. Kingston (1990) An instance of clinical radiation morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-telangiectasia. *The British Journal of Radiology*, 63, 624-628.
10. Sanford K.K., R. Parshad, R. Gantt, R.E. Tarone, G.M. Jones and F.M. Price (1989) Factors affecting and significance of G2 chromatin radiosensitivity in predisposition to cancer. *Int. J. Radiation Biology*, 55, 963-981.
11. Savage, J.R.K., D.G. Papworth, M. Bauchinger, A.T. Natarajan, G.E. Pantelias, C.S. Griffin, M. Figgitt, S. Knehr, H. Braselmann, F. Darroudi, S. Santos and G. I. Terzoudi (2000). Constructing a 2B calibration curve for retrospective dose reconstruction. *Radiation Protection Dosimetry*, 88 (1), 69-76.
12. Scott D. (2000). Chromosomal radiosensitivity, cancer predisposition and response to radiotherapy. *Strahlenther Onkol* 176(5):229-34.
13. Scott D., A. Spreadborough, E. Levine and S.A. Roberts (1994) Genetic predisposition in breast cancer. *The Lancet*, 344, 1444.
14. Terzoudi G. and G.E. Pantelias (1997). Conversion of DNA damage in response to cell cycle regulation of chromatin condensation after irradiation. *Mutagenesis*, 12(4), 271-276.
15. Terzoudi, G.I., K. Manola, G.E. Pantelias, and G. Iliakis. Checkpoint abrogation in G2 compromises repair of chromosomal breaks in Ataxia Telangiectasia cells. *Cancer Rresearch*, 65: (24), Dec 15, 2005.
16. Terzoudi, G.I., S.I. Malik, G.E. Pantelias, K. Margaritis, K. Manola and W. Makropoulos. A new cytogenetic approach for the evaluation of mutagenic potential of chemicals that induce cell cycle arrest in the G2 phase. *Mutagenesis*, 539-543, 2003.
17. Terzoudi, G.I., T. Jung, J. Hain, J. Vrouvas, K. Margaritis, C. Donta-Bakoyianni, V. Makropoulos, Ph. Angelakis and G.E. Pantelias. Increased G2 chromosomal Radiosensitivity in cancer patients: The role of cdk1/cyclinB activity level in the mechanisms involved. *International Journal of Radiation Biology*, 76 (5), 607-616, 2000.
18. Tucker S.L., Turesson I. and Thames H.D. (1992) Evidence for individual differences in radiosensitivity of human skin. *European Journal of Cancer*, 11, 1783-1791.
19. IAEA (2001). Cytogenetic analysis for Radiation Dose Assessment. Technical Reports Series No. 405. International Atomic Energy Agency, Vienna.