

Εξατομίκευση ευαισθησίας στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες και εκτίμηση απορροφουμένης δόσης και κινδύνου καρκινογένεσης σε εκτιθέμενους εργαζόμενους

Γεωργία Τερζούδη¹, Ελένη Τσόγκα², Βασιλική Χατζή¹, Λουκάς Μαργαρίτης², Βασίλειος Μακρόπουλος³ και Γαβριήλ Παντελιάς¹

¹Εργαστήριο Ραδιοβιολογίας & Βιοδοσιμετρίας, IPP-Π, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

²Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

³Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, Τομέας Βιομηχανικής και Επαγγελματικής Υγείας, Αθήνα

Περίληψη

Τις τελευταίες δεκαετίες η χρήση των ιοντίζουσών ακτινοβολιών στην ιατρική, στη βιομηχανία και σε άλλους εργασιακούς χώρους έχει αυξηθεί. Το γεγονός αυτό έχει αναπόφευκτα οδηγήσει σε αύξηση του κινδύνου υπερέκθεσης στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες στο χώρο εργασίας καθιστώντας απαραίτητη την κατά το δυνατόν βελτίωση των μέτρων προστασίας των εκτιθέμενων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται διάφορα μέσα βιοπαρακολούθησης εργαζομένων όπως προσωπικά δοσίμετρα και όργανα μέτρησης ρυθμού έκθεσης ακτινοβολίας. Παράλληλα έχουν αναπτυχθεί βιολογικές μέθοδοι που κυρίως βασίζονται στην ανάλυση των επαγομένων από την ακτινοβολία χρωμοσωματικών αλλοιώσεων στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος του εκτιθέμενου. Η εκτίμηση της απορροφουμένης δόσης γίνεται με τη βοήθεια πρότυπων καμπυλών συσχετισμού δόσης και επαγωγής χρωμοσωματικών αλλοιώσεων και είναι σημαντική για την επιβεβαίωση της έκθεσης και εκτίμηση της επικινδυνότητας της ακτινοβολίας. Η μεθοδολογία αυτή προϋποθέτει ότι για συγκεκριμένη δόση επάγεται ο ίδιος αριθμός αλλοιώσεων σε κάθε άτομο, ανεξάρτητα της γενετικά προκαθορισμένης ακτινοευαισθησίας του. Αντικείμενο της εργασίας αυτής αποτέλεσε αφενός η διερεύνηση της διαφορετικής ενδογενούς ακτινοευαισθησίας μεταξύ εργαζομένων και αφετέρου εάν μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση υπερέκθεσης τόσο ακτινοευαίσθητων όσο και ακτινοάντοχων ατόμων. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι: α) υπάρχει διακύμανση στην ενδογενή ακτινοευαισθησία εργαζομένων και ανιχνεύεται με τη μέθοδο της G₂-χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας, β) η πρότυπη καμπύλη αναφοράς δόσης-χρωμοσωματικών αλλοιώσεων δύναται να χρησιμοποιηθεί για εκτίμηση δόσης τόσο ακτινοευαίσθητων όσο και ακτινοάντοχων ατόμων και γ) η ανίχνευση αυξημένης ευαισθησίας στις ακτινοβολίες είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αξιολόγηση της επικινδυνότητας μιας υπερέκθεσης, την πρόληψη καρκινογένεσης ως επαγγελματική ασθένεια και την αποτελεσματικότερη ιατρική διαχείριση εργατικών ατυχημάτων με ακτινοβολίες.

1. Εισαγωγή

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι ένας από τους περισσότερο μελετημένους και διαδεδομένους παράγοντες στους οποίους ο άνθρωπος μπορεί να εκτεθεί στην καρκινογόνο τους δράση στο εργασιακό περιβάλλον. Η επιστημονική βάση για την υιοθέτηση οδηγιών προστασίας από τις ιοντίζουσες ακτινοβολίες είναι κυρίως τα δεδομένα από την μελέτη των ατόμων που επιβίωσαν της ατομικής βόμβας στην Ιαπωνία, πληθυσμός που εκτέθηκε στην πλειοψηφία του σε υψηλούς ρυθμούς δόσεων (Beir 1990, OCRP 1991, UNSCEAR 2000). Εντούτοις, το μεγάλο ενδιαφέρον για τη Δημόσια Υγεία, επικεντρώνεται πρωτίστως στην προστασία των ατόμων του πληθυσμού που εκτίθενται σε σχετικά χαμηλές δόσεις - χαμηλού LET (Linear Energy Transfer) ακτινοβολίας, οι οποίες όμως είναι ενεργειακά ικανές να προκαλέσουν θραύση βιομοριακών δεσμών, DNA και χρωμοσωμάτων, ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς καρκινογένεσης. Σε παρατεταμένες ή τμηματικές χαμηλές δόσεις ιοντίζουσών ακτινοβολιών είναι δυνατόν να εκτίθενται άτομα του γενικού πληθυσμού καθώς επίσης και εργαζόμενοι που χρησιμοποιούν τεχνητές πηγές ακτινοβολίας στο εργασιακό τους περιβάλλον. Επίσης, στον τομέα της Υγείας υπάρχει ευρεία χρήση των ιοντίζουσών ακτινοβολιών από ιατρούς και τεχνολόγους υγείας. Οι επαναλαμβανόμενες διαγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές των ακτινοβολιών εκθέτουν σε χαμηλές δόσεις τους ασθενείς και ενδεχομένως το ιατρικό και τεχνικό προσωπικό (Berrington et al. 2001).

Η εκτίμηση της δόσης και του κινδύνου που εγκυμονούν οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες πραγματοποιείται μέσω της χρήσης κυτταρογενετικών μεθοδολογιών και κατάλληλων καμπυλών αναφοράς δόσης-απόκρισης. Ωστόσο, η εκτίμηση αυτή βασίζεται στην υπόθεση πως όλα τα άτομα του πληθυσμού ανταποκρίνονται με τον ίδιο τρόπο στην ακτινοβολία. Προϋποθέτει δηλαδή ότι ο ίδιος αριθμός χρωμοσωματικών αλλοιώσεων επάγεται από τη δόση αυτή σε κάθε άτομο, καθώς επίσης και ότι όλα τα μέλη του πληθυσμού εμφανίζουν την ίδια ευαισθησία στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Όμως έχει παρατηρηθεί από επιστημονικές μελέτες διακύμανση όσον αφορά τη χρωμοσωματική ακτινοευαισθησία μεταξύ των υγιών μελών ενός πληθυσμού (Terzoudi, 2000; Cheng, 1993; Scott, 1999; Distel, 2006; Smart, 2003). Υπάρχουν άτομα ιδιαίτερα ευαίσθητα στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες, που χαρακτηρίζονται από αυξημένη χρωμοσωματική ακτινοευαισθησία, καθώς και άτομα με ιδιαίτερη ακτινοαντοχή. Το γεγονός αυτό διαπιστώνεται συχνά και στην καθημερινή πρακτική της ακτινοθεραπείας όπου οι επιπτώσεις της ακτινοβολίας μπορούν να διαφέρουν, ακόμα και αν οι συνθήκες ακτινοβολίας και τα πρωτόκολλα θεραπείας είναι ίδια. Συγκεκριμένα, είναι δυνατό να προκληθούν οξείες ακτινικές αντιδράσεις όπως έντονο ερύθημα, απολέπιση του δέρματος και οίδημα είτε και απώτερες επιπτώσεις όπως ίνωση ή/και τηλεαγγειεκτασία (Turesson, 1989). Επιπλέον, ασθενείς με γενετικά σύνδρομα όπως τηλεαγγειεκτασική αταξία, μελαχρωματική ξηροδερμία και σύνδρομο Nijmegen χαρακτηρίζονται από αυξημένη χρωμοσωματική ακτινοευαισθησία ενώ παράλληλα εμφανίζουν και γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση (Terzoudi, 2005; Shiloh, 1997; Sanford, 1989; Scott, 1996).

Δεδομένου, ότι αυξημένα επίπεδα ακτινοευαισθησίας σχετίζονται με γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση, το ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται σήμερα στην εξατομικευμένη εκτίμηση του κινδύνου από έκθεση σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Προς την κατεύθυνση αυτή, διερευνώνται οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί αλλοιώσεων στο DNA, οι μηχανισμοί απόπτωσης, καθώς και αναγνώρισης αλλοιώσεων στο DNA μέσω ενεργοποίησης των σημείων ελέγχου στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου με στόχο τη διατήρηση της γενετικής ακεραιότητας. Πρόσφατες έρευνες στην κυτταρογενετική του καρκίνου και στις επιπτώσεις της ακτινοβολίας σε χρωμοσωματικό επίπεδο μέσω αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση από την επίδραση παραγόντων όπως η καφεΐνη και η αμιφοστίνη, επαναπροσδιόρισαν τόσο τη σπουδαιότητα του G2-σημείου ελέγχου (G2-checkpoint) του κυτταρικού κύκλου στην εκτίμηση της ακτινοευαισθησίας όσο και τη σημασία της ενεργότητας του συμπλέγματος cdk1/cyclin-B στην μετατροπή της βλάβης από το επίπεδο του DNA στα χρωμοσώματα. Αναμφισβήτητα, η διερεύνηση της χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου και

η κατανόηση των εμπλεκόμενων μηχανισμών είναι δυνατόν να αποτελέσουν τη βάση για την ανάπτυξη και προτυποποίηση εξειδικευμένων μεθόδων βιοδοσιμετρίας και μέτρησης επιπέδων ενδογενούς ακτινοευαισθησίας (Terzoudi et al. 2005, Hatzi et al. 2007).

Τίθενται, επομένως, τα εξής ερωτήματα: Αναμένονται δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία από τις χαμηλές δόσεις που προκύπτουν από τις διάφορες ειρηνικές εφαρμογές των ιοντιζουσών ακτινοβολιών; Αν ναι, πώς είναι δυνατόν να ληφθούν υπόψη στην ακτινοπροστασία και ποιες αναμένεται να είναι οι συνέπειες; Είναι δυνατόν να εκτιμηθεί η δόση σε άτομα του πληθυσμού με βιολογικές μετρήσεις χρησιμοποιώντας πρότυπες καμπύλες βιοδοσιμετρίας; Υπάρχουν ενδογενείς διαφορές μεταξύ ατόμων του πληθυσμού στην ακτινοευαισθησία και προδιάθεση στην καρκινογένεση; Αν ναι, είναι δυνατόν να αναπτυχθούν προγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση τους ώστε για λόγους ακτινοπροστασίας να λαμβάνονται υπόψη στην εκτίμηση δόσεων και επιπτώσεων στην υγεία και γενικά στην εξατομίκευση του κινδύνου καρκινογένεσης; Απαιτείται για την προτυποποίηση των μεθοδολογιών βιοδοσιμετρίας κατασκευή διαφορετικής πρότυπης καμπύλης βαθμολογίας για ακτινοευαίσθητα άτομα και διαφορετική για ακτινοάντοχα άτομα; Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας διερευνώνται τα ερωτήματα αυτά και ιδιαίτερα εξετάζεται κατά πόσο μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς δόσης-απόκρισης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί τόσο σε περιπτώσεις υπερέκθεσης ακτινοευαίσθητων ατόμων όσο και σε περιπτώσεις έκθεσης ακτινοάντοχων ατόμων.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Καλλιέργειες Λεμφοκυττάρων και Συνθήκες Ακτινοβόλησης. Δείγματα περιφερικού αίματος, απομονώθηκαν από υγιείς δότες με αποστειρωμένη σύριγγα και μεταφέρθηκαν σε σωλήνες με ηπαρίνη. Σε κάθε καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκαν 0.5 ml ολικού αίματος, 5 ml θρεπτικού υλικού McCoy's 5A εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός, 1% γλουταμίνη, 1% αντιβιοτικά (πενικιλίνη (100 U/ml)-στρεπτομυκίνη (100 µg/ml) (Biochrom AG), 2% φυτοαιμαγλουτίνη (PHA, Gibco). Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 37°C σε επωαστικό κλίβανο με παροχή διοξειδίου του άνθρακα 5% και 95% αέρα. Η ακτινοβόληση των δειγμάτων έγινε με ακτινοβολητή κοβαλτίου σε θερμοκρασία δωματίου (60Co) GammaCell 220 Irradiator (Atomic Energy of Canada Ltd, Ottawa, Canada) και με ρυθμό δόσης 1Gy/min.

2.2 Μονιμοποίηση Κυττάρων και Λήψη Χρωμοσωματικών Παρασκευασμάτων. Πριν το τέλος της επώασης πραγματοποιήθηκε προσθήκη κολχικίνης (0.2 µg/ml, Sigma-Aldrich). Παρουσία κολχικίνης, τα κύτταρα σταματούν στη φάση της μίτωσης. Η συλλογή των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με φυγοκέντριση των καλλιεργιών (1450 rpm) για 10 λεπτά. Ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκείμενου και κατεργασία με υποτονικό διάλυμα KCl (0.075 M). Η μονιμοποίηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με διάλυμα μεθανόλης-οξικού οξέος 3:1 (v/v) (Sigma-Aldrich). Η επίστρωση, έγινε με πιπέτα Gilson, αφήνοντας 20-40 µl εναιωρήματος σε βρεγμένη αντικειμενοφόρο πλάκα. Ακολούθησε στέγνωμα των παρασκευασμάτων σε θερμοκρασία δωματίου και χρώση με διάλυμα Giemsa 2% (διαλύτης Sorensen) για 15 λεπτά.

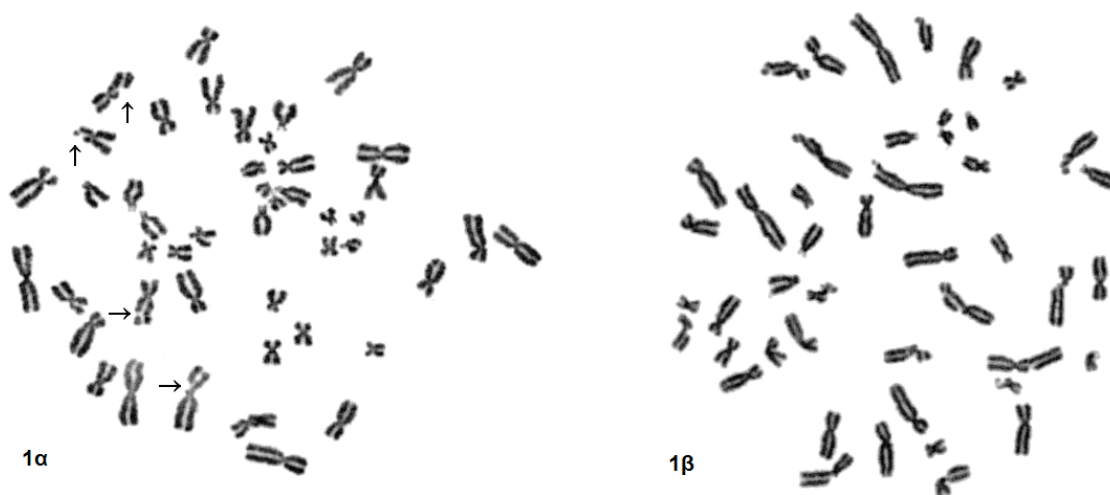
2.3 Έλεγχος G₂-Χρωμοσωματικής Ακτινοευαισθησίας. Καλλιέργειες ολικού αίματος 72 ωρών εκτέθηκαν σε ιοντίζουσα ακτινοβολία (Gammacell-Irradiator-220, Atomic Energy of Canada Limited Ltd, Ottawa) δόσης 1Gy σε θερμοκρασία δωματίου. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν για 30 λεπτά στους 37°C και ακολούθησε προσθήκη κολχικίνης (0.2 µg/ml) για 1 ώρα. Χρησιμοποιήθηκαν και καλλιέργειες μάρτυρες που δεν ακτινοβολήθηκαν. Η μονιμοποίηση και η χρώση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω. Ακολούθησε παρατήρηση των χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων σε οπτικό μικροσκόπιο (ZEISS Axioscope) και καταμέτρηση των χρωματιδικών αλλοιώσεων με τη βοήθεια λογισμικού και υπολογιστικού συστήματος επεξεργασίας εικόνας IKAROS (Metasystems).

2.4. Βιοδοσιμετρία με την Κλασική Κυτταρογενετική Μέθοδο. Δείγματα περιφερικού αίματος από 20 υγιείς δότες εκτέθηκαν σε ακτινοβολία 1,2,3,4 και 6 Gy στη G₀ φάση του κυτταρικού κύκλου και καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες συνολικά. Με τον ίδιο τρόπο

καλλιεργήθηκαν και τα δείγματα-μάρτυρες. Τρεις ώρες πριν το τέλος της επώασης προστέθηκε κολχικίνη (0.2 $\mu\text{g/ml}$) και πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση και χρώση των κυττάρων. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων (δικεντρικά χρωμοσώματα και δακτύλιοι με κεντρομερίδιο) στη μετάφαση με τη βοήθεια μικροσκοπίου και υπολογιστικού συστήματος.

3. Αποτελέσματα

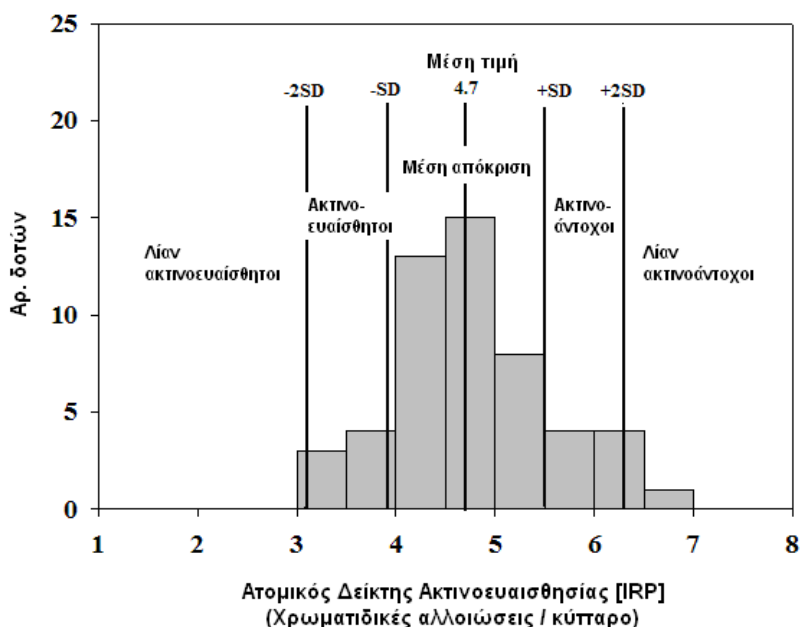
3.1 Διακύμανση της χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας μέσω εφαρμογής μιας νέας μεθόδου G2-χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας. Λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ακτινοβολήθηκαν *in vitro* στη G2-φάση του κυτταρικού τους κύκλου και ακολούθησε καλλιέργεια παρουσία και απουσία καφεΐνης. Με τον τρόπο αυτό, εξήχθησαν δύο διαφορετικές τιμές μετά από ανάλυση των χρωματιδικών αλλοιώσεων στην επόμενη μετάφαση. Στο Σχήμα 1α φαίνονται χρωματιδικές αλλοιώσεις μετά από επίδραση 1 Gy ιοντίζουσας ακτινοβολίας μετά την εφαρμογή της κλασσικής μεθόδου εκτίμησης της G2-χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας. Αντίστοιχα, στην εικόνα του Σχήματος 1β απεικονίζονται χρωματιδικές αλλοιώσεις όπως προέκυψαν μετά από απενεργοποίηση του G2-σημείου ελέγχου μέσω 4 mM καφεΐνης, και παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των χρωματιδικών αλλοιώσεων σε επίπεδο όμοιο με αυτό που εμφανίζεται σε ασθενείς με *ataxia telangiectasia* (AT).



Σχήμα 1: Χρωματιδικές αλλοιώσεις μεταφασικών λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος υγιούς δότη μετά από επίδραση 1 Gy ακτινοβολίας- γ όπως φαίνονται στο οπτικό μικροσκόπιο, (1α) με εφαρμογή της συμβατικής μεθόδου G2-χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας, όπου παρατηρούνται τρία χρωματιδικά θραύσματα και ένα χρωματιδικό χάσμα, (1β) μετά από κατάργηση της ενεργότητας του G2-σημείου ελέγχου μέσω επίδρασης με καφεΐνη που παρατηρείται σημαντική αύξηση των χρωματιδικών αλλοιώσεων σε 13 θραύσματα.

Με την εφαρμογή της νέας μεθόδου εκτίμησης ακτινοευαισθησίας, η τιμή των χρωματιδικών αλλοιώσεων με καφεΐνη για κάθε άτομο που προκύπτει αντιπροσωπεύει τη μέγιστη τιμή της G2-χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας. Η διαφορά μεταξύ αυτής της τιμής και της τιμής των χρωματιδικών αλλοιώσεων που προκύπτει απουσία καφεΐνης, αντικατοπτρίζει διαφορές σε μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς γονιδίων που ελέγχουν την επιδιόρθωση της ακτινοπροκληθείσας βλάβης στο DNA, την ενεργότητα των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και τη μετάβαση του κυττάρου από τη G2-φάση στη μετάφαση. Η διαφορά αυτή μεταξύ των δύο τιμών ορίζεται ως *Ατομικός Δείκτης Ακτινοευαισθησίας* (Individual Radiosensitivity Parameter, IRP). Στο Σχήμα 3, φαίνεται η διακύμανση της χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας 52 υγιών δοτών μετά

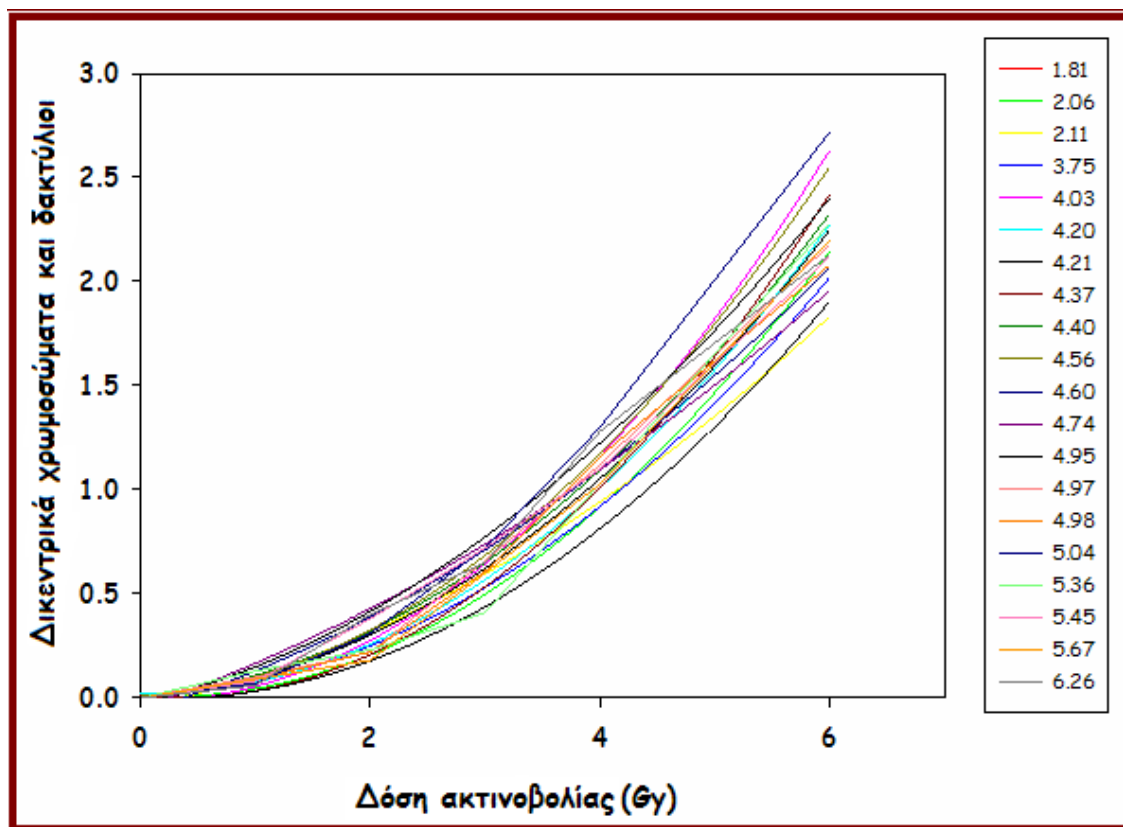
από εφαρμογή της νέας προτεινόμενης μεθόδου. Η μέση τιμή IRP υπολογίστηκε σε 4,7 χρωματιδικές αλλοιώσεις ανά κύτταρο με τυπική απόκλιση (SD, Standard Deviation) 0,8 και συντελεστή μεταβλητότητας [coefficient of variation (Waselenko et al.)] 17%. Μία θεωρητική κατάταξη βασιζόμενη στις μέσες τιμές (mean values, MV) και στις τυπικές αποκλίσεις (standard deviations, SD) εφαρμόστηκε έτσι ώστε: μέσης απόκρισης να χαρακτηρίζονται οι δότες με τιμή IRP εύρους $MV \pm SD$, ως ακτινοευαίσθητοι όταν $MV - 2SD \leq IRP < MV - SD$, ως λίαν ακτινοευαίσθητοι όταν $IRP < MV - 2SD$, ως ακτινοάντοχοι όταν $MV + SD < IRP \leq MV + 2SD$ και ως λίαν ακτινοάντοχοι όταν $IRP > MV + 2SD$.



Σχήμα 2: Διακύμανση της χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας μεταξύ 52 υγιών δοτών μετά από εφαρμογή μεθόδου G2-χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας βασιζόμενης στον υπολογισμό του Ατομικού Δείκτη Ακτινοευαισθησίας IRP. Η μέση τιμή IRP υπολογίστηκε σε 4,7 χρωματιδικές αλλοιώσεις / κύτταρο με τυπική απόκλιση 0,8. Μέσης απόκρισης χαρακτηρίζονται οι δότες με τιμή IRP εύρους 3,9-5,5, ως ακτινοευαίσθητοι όταν $3,1 \leq IRP < 3,9$, ως λίαν ακτινοευαίσθητοι όταν $IRP < 3,1$, ως ακτινοάντοχοι όταν $5,5 < IRP \leq 6,3$ και ως λίαν ακτινοάντοχοι όταν $IRP > 6,3$.

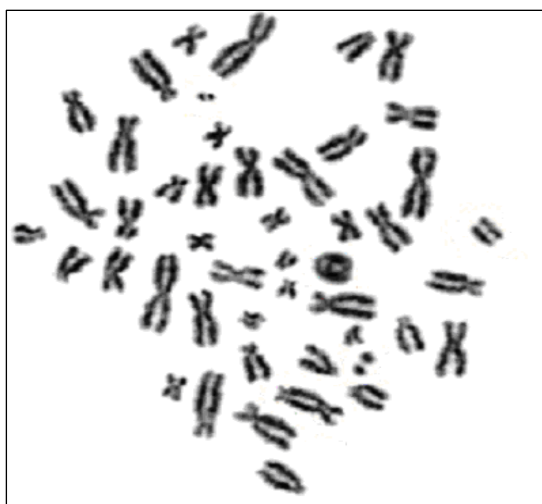
3.2 Κατασκευή πρότυπων καμπυλών αναφοράς δόσης-απόκρισης για ακτινοευαίσθητους και ακτινοάντοχους δότες

Δείγματα λεμφοκυττάρων είκοσι δοτών από διαφορετικές κατηγορίες ακτινοευαισθησίας που περιγράφονται στο Σχήμα 2 χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή πρότυπων καμπυλών αναφοράς δόσης (γ-ακτινοβολίας) - απόκρισης (δακτυλίων και δικεντρικών χρωμοσωμάτων). Οι χρωμοσωματικές αλλοιώσεις, παραδείγματα των οποίων παρουσιάζονται στα Σχήματα 4 και 5, ποσοτικοποιήθηκαν στη μετάφραση και βάση της ανάλυσης, κατασκευάστηκαν οι είκοσι καμπύλες αναφοράς δόσης - απόκρισης που παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3: Καμπύλη δόσης-απόκρισης για τους 20 διαφορετικούς δότες

Τα αποτελέσματα (Σχήμα 3) έδειξαν ότι η απόκριση των δοτών (δικεντρικά, τρικεντρικά χρωμοσώματα και δακτύλιοι με κεντρομερίδιο) διαφορετικού ατομικού δείκτη ακτινοευαισθησίας δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές μετά από ακτινοβολή των λεμφοκυττάρων τους σε γ-ακτινοβολία.



Σχήμα 4. Μετάφαση Τ-λεμφοκυττάρου με δικεντρικό χρωμόσωμα και δακτύλιο με κεντρομερίδιο μετά από έκθεση σε 6Gy ιοντίζουσας ακτινοβολίας (x1000).



Σχήμα 5. Μετάφαση Τ-λεμφοκυττάρου με δικεντρικό και τρικεντρικό χρωμόσωμα μετά από έκθεση σε 6Gy ιοντίζουσας ακτινοβολίας (x1000).

4. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Τις τελευταίες δεκαετίες η χρήση των ιοντίζουσών ακτινοβολιών στην ιατρική, στη βιομηχανία και σε άλλους επιστημονικούς τομείς έχει ιδιαίτερα αυξηθεί. Το γεγονός αυτό έχει αναπόφευκτα οδηγήσει σε αύξηση του αριθμού των ατόμων που εκτίθενται για ιατρικούς σκοπούς, καθώς επίσης και σε αύξηση του κινδύνου υπερέκθεσης στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες εργαζομένων και ατόμων του πληθυσμού γενικότερα. Είναι απαραίτητο επομένως να εξασφαλιστούν κατάλληλα μέτρα προστασίας όσων εκτίθενται σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται σήμερα διάφορα μέσα όπως προσωπικά δοσίμετρα, όργανα μέτρησης ρυθμού έκθεσης στην ακτινοβολία κ.λ.π., για την εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης μετά από έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία. Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται βιολογικές μέθοδοι σε σχετικά μεγάλες δόσεις, που κυρίως βασίζονται στην ανάλυση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων που επάγει η έκθεση σε ακτινοβολία στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος του εκτιθέμενου (Pantelias and Mailie 1984, Pantelias and Terzoudi 2006, Prasana 2007). Σε μία πρόσφατη επιστημονική ανασκόπηση, αναφερθήκαμε στη δυνατότητα εφαρμογής κυτταρογενετικών μεθοδολογιών για την εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης και ενδογενούς ακτινοευαισθησίας μετά από έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία (Terzoudi and Pantelias 2006). Οι κυριότερες κυτταρογενετικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό, παρουσιάζονται στην Σχήμα 6. Η καταμέτρηση δικεντρικών χρωμοσωμάτων ανθρώπινων λεμφοκυττάρων στη μετάφαση έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί. Εντούτοις, δεδομένου ότι ο αριθμός των δικεντρικών χρωμοσωμάτων στα εκτιθέμενα άτομα ελαττώνεται με την πάροδο του χρόνου, η μεθοδολογία του υβριδισμού *in situ* με φθορισμό (FISH), επιτρέπει την καταμέτρηση των χρωμοσωματικών μετατοπίσεων και χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοδοσιμετρία και ακτινοπροστασία. Επιπλέον, η μεθοδολογία της πρόωρης χρωμοσωματικής συμπίκνωσης (PCC, Premature Chromosome Condensation), παρέχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της συμβατικής μεθοδολογίας ανάλυσης των χρωμοσωμάτων στη μετάφαση και αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο στη βιοδοσιμετρία επιτρέποντας την ανάλυση των χρωμοσωμάτων στη μεσόφαση (Hatzi et al. 2006). η εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης γίνεται με τη βοήθεια πρότυπων καμπυλών συσχετισμού δόσης και επαγωγής χρωμοσωματικών αλλοιώσεων (International Atomic Energy Agency, 2001).

Η εκτίμηση δόσεων με μεθόδους βιοδοσιμετρίας είναι σημαντική όχι μόνο για την επιβεβαίωση της έκθεσης ή τυχόν ατυχήμαντος με ιοντίζουσες ακτινοβολίες αλλά και για την αξιολόγηση των επιπτώσεων στην υγεία και την εξατομίκευση του κινδύνου καρκινογένεσης που συνεπάγεται μια τυχόν έκθεση σε ακτινοβολία. Πράγματι, αυξημένα επίπεδα ακτινοευαισθησίας έχουν συσχετιστεί με προδιάθεση στην καρκινογένεση, και το ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται στην εξατομικευμένη εκτίμηση του κινδύνου από έκθεση σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Προς την κατεύθυνση αυτή, ερευνώνται οι μηχανισμοί που καθορίζουν την επιδιορθωτική ικανότητα κυτταρικών συστημάτων για αλλοιώσεις στο DNA, την απόπτωση, την αναγνώριση αλλοιώσεων στο DNA μέσω μηχανισμών ενεργοποίησης των σημείων ελέγχου στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου με στόχο τη διατήρηση της γενετικής ακεραιότητας. Πρόσφατες έρευνες στην κυτταρογενετική του καρκίνου και στις επιπτώσεις της ακτινοβολίας σε χρωμοσωματικό επίπεδο μέσω αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση από την επίδραση παραγόντων όπως η καφεΐνη και η αμιφοστίνη, επαναπροσδιόρισαν τόσο τη σπουδαιότητα του G2-σημείου ελέγχου (G2-checkpoint) του κυτταρικού κύκλου στην εκτίμηση της ακτινοευαισθησίας όσο και την σημασία της ενεργότητας του συμπλέγματος cdk1/cyclin-B στην μετατροπή της βλάβης από το DNA στα χρωμοσώματα (Terzoudi et al. 2005, Hatzi et al. 2007, Pantelias and Terzoudi 2010). Αναμφισβήτητα, η μελέτη της G2-χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας και η κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται μπορεί να αποτελέσουν τη βάση για την ανάπτυξη και προτυποποίηση εξειδικευμένων μεθόδων για τον προσδιορισμό της ενδογενούς ακτινοευαισθησίας (Terzoudi et al. 2009).

A



B



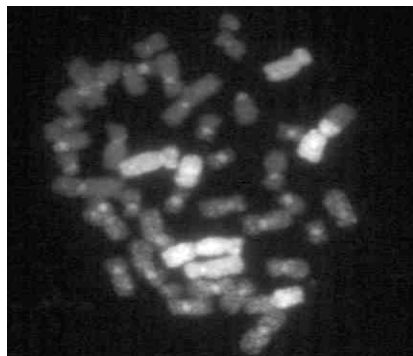
C



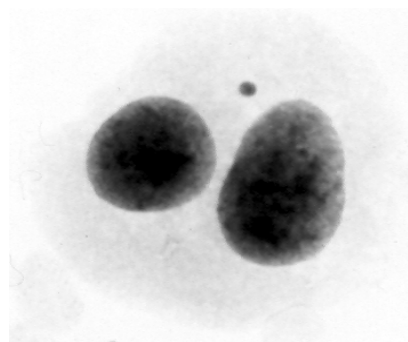
D



E



F



Σχήμα 6. Κυτταρογενετικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση απορροφούμενης δόσης ακτινοβολίας σε εξατομικευμένο επίπεδο: (A) Συμβατική ανάλυση δικεντρικών χρωμοσωμάτων στη μετάφαση. (B) Ανάλυση χρωματιδικών θραυσμάτων στη μετάφαση υποδηλώνουν την εγγενή (Intrinsic) G2-χρωμοσωματική ακτινοευαισθησία. (C) Ανάλυση πρόωρα συμπυκνωμένων χρωμοσωμάτων που επιτρέπει την εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης σε διάστημα δύο ωρών μετά την έκθεση σε ακτινοβολία. (D) GTG-ζωνοποίηση και καρυοτυπική ανάλυση για τον εντοπισμό κλώνων αμοιβαίων χρωμοσωματικών μετατοπίσεων για εξατομικευμένη εκτίμηση επικινδυνότητας. (E) Ανάλυση FISH για την ανίχνευση αμοιβαίων μετατοπίσεων μετά από παρατεταμένη έκθεση σε

ακτινοβολίες. (F) Καταμέτρηση μικροπυρήνων για ταχεία εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης.

Τα αποτελέσματα βιοδοσιμετρίας και η κατασκευή των πρότυπων καμπυλών αναφοράς (Σχήμα 3) έδειξαν ότι η απόκριση (δικεντρικά, τρικεντρικά χρωμοσώματα και δακτύλιοι με κεντρομερίδιο) των είκοσι δοτών είναι ανεξάρτητη των επιπέδων ακτινοευαισθησίας τους όπως εκτιμήθηκε με εφαρμογή της μεθόδου G2-χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στο γεγονός ότι οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς κατασκευάζονται ακτινοβολώντας τα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος στη G0-φάση του κυτταρικού τους κύκλου. Είναι γνωστό ότι στη φάση αυτή δεν είναι ενεργοποιημένοι οι παράγοντες του κυτταρικού κύκλου που καθορίζουν τη διακύμανση της G₂-χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας και επομένως την ακτινοευαισθησία σε ατομικό επίπεδο. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα των επιδιορθωτικών μηχανισμών των αλλοιώσεων του DNA στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος δεν παρουσιάζει διακύμανση από άτομο σε άτομο στη G0-φάση του κυτταρικού τους κύκλου. Η καμπύλη αναφοράς δόσης-απόκρισης δεν επηρεάζεται επομένως από τα διαφορετικά επίπεδα G₂-χρωμοσωματικής ακτινοευαισθησίας δεδομένου ότι οι δακτύλιοι και τα δικεντρικά χρωμοσώματα, που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, επάγονται στην G0-φάση και όχι στη G2-φάση του κυτταρικού κύκλου των λεμφοκυττάρων.

Συμπερασματικά, η πρότυπη καμπύλη αναφοράς δόσης-απόκρισης δύναται να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση απορροφούμενης δόσης τόσο ακτινοευαίσθητων όσο και ακτινοάντοχων ατόμων του πληθυσμού. Επιπλέον, η ανάλυση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων στα πλαίσια εκτίμησης δόσεων με μεθόδους βιοδοσιμετρίας και μέτρησης των επιπέδων ακτινοευαισθησίας ατόμων του πληθυσμού, παρέχει τη δυνατότητα αξιολόγησης μιας υπερέκθεσης σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες και εξατομίκευσης του κινδύνου που η έκθεση αυτή εγκυμονεί.

5. Βιβλιογραφία

- BEIR V. Committee on the Biological Effects of Ionizing radiation., “The effects on population of exposure to low levels of ionizing radiation”, Washington DC, National Academy of Sciences, (1990).
- Berrington de Gonzalez A., Darby S. “Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and other 14 other countries”, *Lancet* 363:345-51 (2001).
- Hatzi V.I., G.I. Terzoudi, G.E. Pantelias, C. Spiliopoulou and V. Makropoulos. “The benzene metabolite hydroquinone enhances G2-chromosomal radiosensitivity by affecting the G2-checkpoint in irradiated lymphocytes”, *International Journal of Oncology*, 35:1223-1230, (2007).
- Hatzi VI, Terzoudi GI, Paraskevopoulou C, Makropoulos V, Matthopoulos DP, Pantelias GE. “The use of premature chromosome condensation to study in interphase cells the influence of environmental factors on human genetic material”, *Scientific World Journal*, 25 (6) 1174-90 (2006).
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY “Cytogenetic Analysis for Radiation Doses Assessment: A Manual”; Technical Reports Series No. 405, (2001) Vienna.
- International Commission on Radiological Protection ICRP. “Recommendations of the international commission on radiological protection”, Oxford: Pergamon Press, 1991 (ICRP publication 60).
- Pantelias G.E. and Mailie H.D “The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry”, *Int. J. Radiat. Biol.*, VOL.99, 140-150 (1984).

- Prasana P. G. S. "Cytogenetic Biodosimetry at the Armed Forces Radiobiology Research Institute"; published in Health Physics News Vol. 35, (2007).
- Sanford, KK, Parshad, R, Gantt, R, Tarone, RE, Jones, GM, Price, FM. "Factors affecting and significance of G2 chromatin radiosensitivity in predisposition to cancer", *Int J Radiat Biol*;55:963-981, (1989).
- Scott, D. "Chromosomal radiosensitivity and low penetrance predisposition to cancer", *Cytogenet Genome Res*;104:365-370, (2004).
- Smart V., G. B. Curwen, C. A. Whitehouse A. Edwards and E. J. Tawn "Chromosomal radiosensitivity: a study of the chromosomal G₂ assay in human blood lymphocytes indicating significant inter-individual variability". *Mutation Research* 528, 105-110, (2003).
- Terzoudi G.I and G.E. Pantelias. "Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualization after exposure to ionizing radiation", *Radiation Protection Dosimetry* doi: 10.1093/rpd/ncl509 (2006).
- Terzoudi G.I., Jung T., Hain J., Vrouvas J., Margaritis K., Donta-Bakoyianni C., Makropoulos V., Angelakis Ph. and Pantelias G.E. "Increased G2 chromosomal radiosensitivity in cancer patients: the role of cdk1/cyclin-B activity in the mechanisms involved", *Int. J. Radiat. Biol.*, VOL.76,NO.5,607-615, (2000).
- Terzoudi G.I., Malik S.I., Margaritis K., Makropoulos V., Manola K. and Pantelias G.E. "A new cytogenetic approach for the evaluation of mutagenic potential of chemicals that induce cell cycle arrest in the G2 phase", *Mutagenesis* VOL.18 ,NO. 6, pp 1-5, (2003)
- Terzoudi G.I., Pantelias G. E. "Cytogenetic Methods for Biodosimetry and Risk Individualisation After Exposure to Ionizing Radiation"; published in *Radiation Protection Dosimetry* Vol. 122, (2006).
- Terzoudi, G. I., K.N. Manola, G.E. Pantelias and G. Iliakis. "Checkpoint abrogation in G2 compromises repair of chromosomal breaks in ataxia telangiectasia cells", *Cancer Research*, 65, 11292-11296 (2005).
- Terzoudi G.I., Hatzi V.I., Barszczewska K., Manola K.N., Stavropoulou C., Angelakis Ph, Pantelias G.E. (2009) G2-checkpoint abrogation in irradiated lymphocytes: A new cytogenetic approach to assess individual radiosensitivity and predisposition to cancer. *Int. J. Oncol*, 35:1223-1230.
- Pantelias G.E., Terzoudi G.I. (2010). Functional cell-cycle chromatin conformation changes in the presence of DNA damage result into chromatid breaks: a new insight in the formation of radiation-induced chromosomal aberrations based on the direct observation of interphase chromatin. *Mutat Res*. Aug 14;701(1):27-37.
- Tureson I., Burnet N. G., Johansen J., Nyman J., Peacock J. H. "Describing Patients' Normal Tissue Reactions: Concerning the Possibility of Individualising Radiotherapy Dose Prescriptions Based on Potential Predictive Assay of Normal Tissue Radiosensitivity"; *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* 79 (1998).
- United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR) Sources and effects of ionizing radiation. New York: United Nations, (2000).