Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής:

Έκθεση σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες και χημικούς γενοτοξικούς παράγοντες στο εργασιακό περιβάλλον: Επιπτώσεις σε κυτταρογενετικό επίπεδο και μηχανισμοί δράσης

Βασιλική Χατζή

Υπ. Διδάκτορας, Υπότροφος ΙΠΤΑ

ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Ινστιτούτο Πυρηνικής Τεχνολογίας & Ακτινοπροστασίας

Εργαστήριο Υγειοφυσικής & Περιβαλλοντικής Υγείας

Υπ. Διδάκτορας από τον Απρίλιο του 2004
Ιατρική Σχολή

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εργαστήριο Τοξικολογίας & Ιατροδικαστικής

Επίβλεψη

Δρ. Γεωργία Τερζούδη

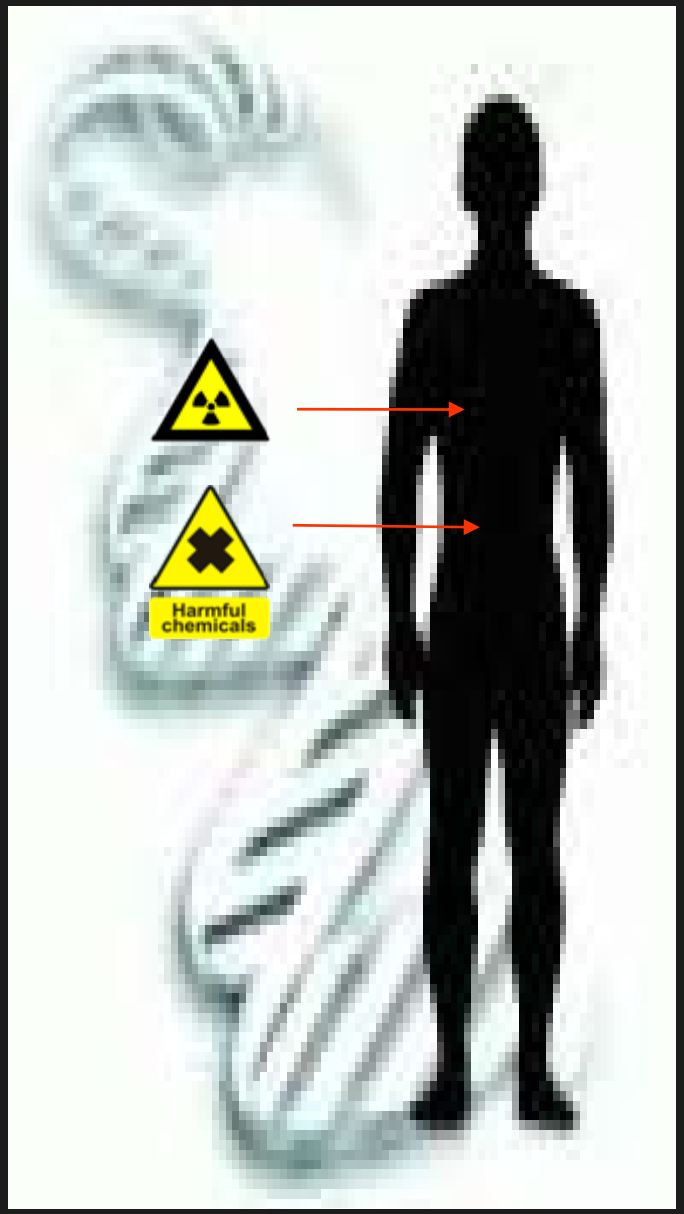
Δρ. Γαβριήλ Παντελιάς

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Χαρά Σπηλιοπούλου, Αν. Καθηγήτρια
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστημίου Αθηνών

Κωσταντίνος Μαραβέλιας, Αν. Καθηγητής
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστημίου Αθηνών

Δημήτριος Ματθόπουλος, Αν. Καθηγητής
Πανεπιστημιακής Σχολής Αγρινίου, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



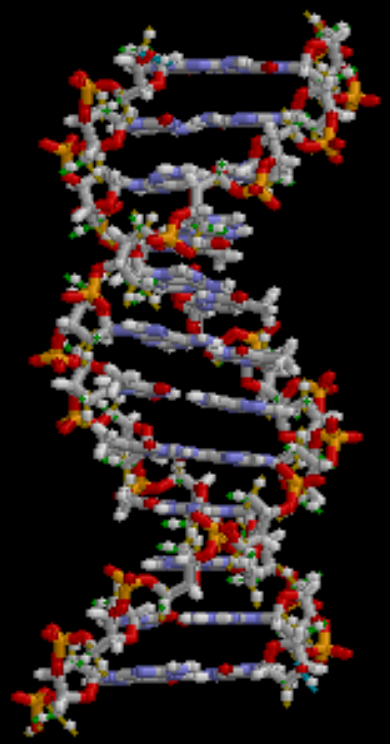
Προβληματισμός :

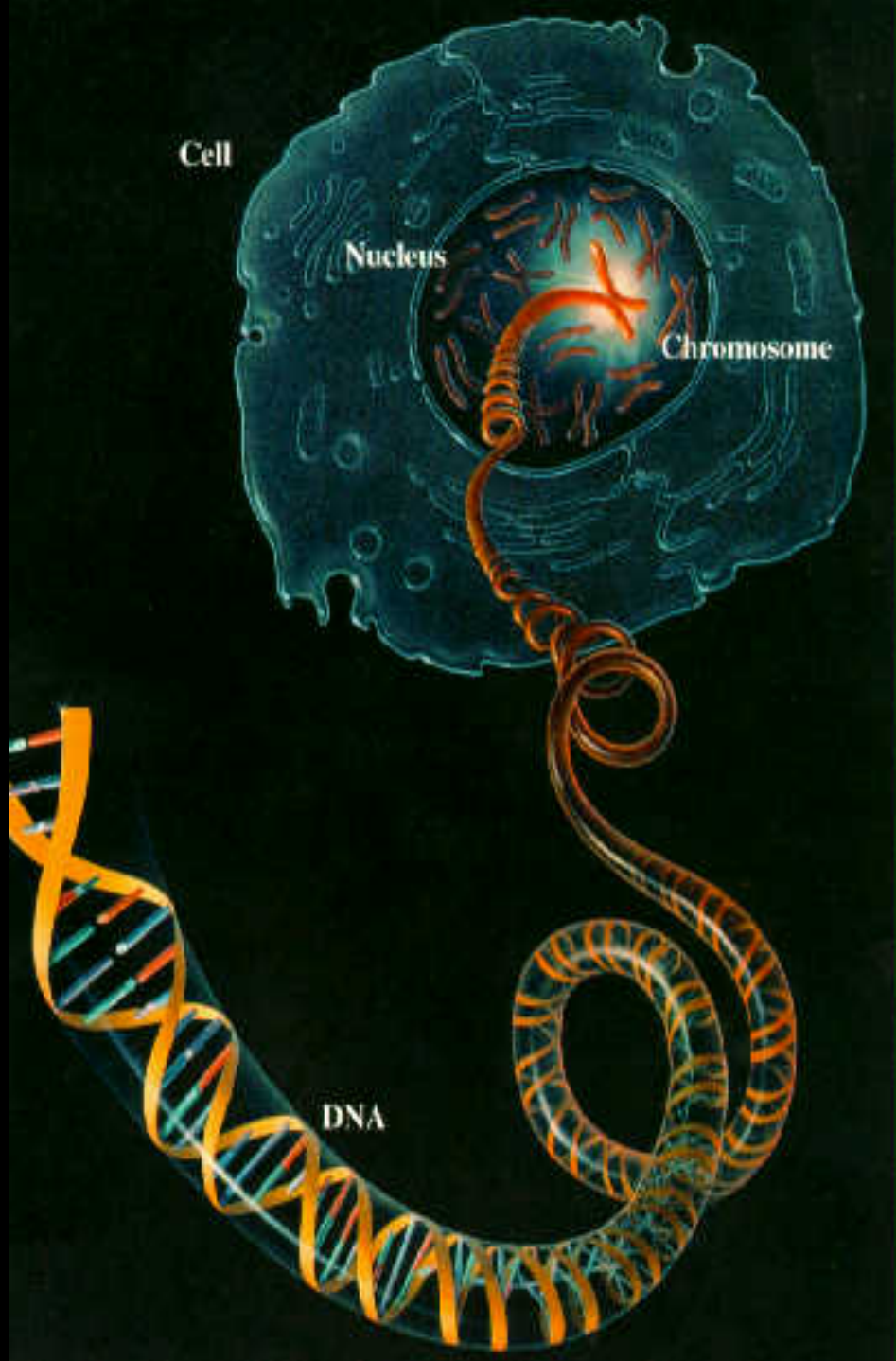
- Διαρκώς αυξανόμενη ανησυχία για τη μεταλλαξιγόνο και καρκινογόνο δράση γενοτοξικών παραγόντων στους οποίους ο άνθρωπος εκτίθεται καθημερινά κυρίως στο επαγγελματικό περιβάλλον.
- Τέτοιοι επιβλαβείς παράγοντες, είναι οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες (IR) και οι χημικοί γενοτοξικοί παράγοντες, των οποίων η επικινδυνότητα δεν είναι πάντα πλήρως διευκρινισμένη.
- Απαιτείται εμπεριστατωμένη έρευνα για τη διευκρίνιση των μηχανισμών δράσης των γενοτοξικών παραγόντων.
- Για την εκτίμηση επικινδυνότητας γενοτοξικών παραγόντων είναι αναγκαία η ανάπτυξη νέων ευαίσθητων μεθόδων ανίχνευσης και δοσιμέτρησης των παραγόντων αυτών.

Στόχοι Διατριβής

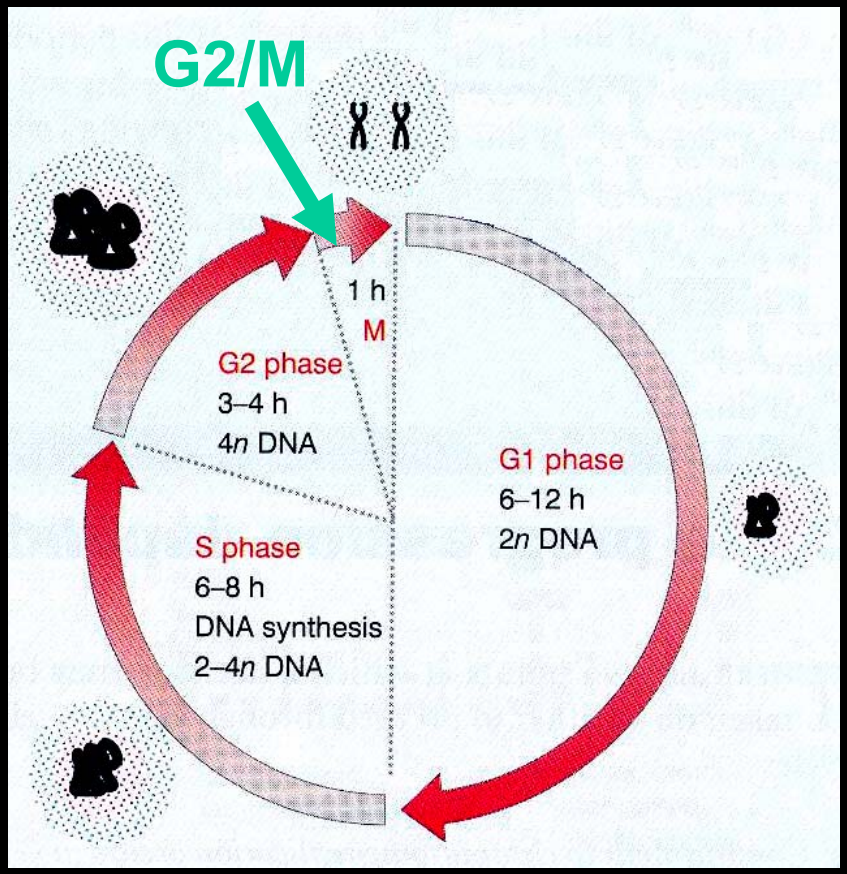
- Μελέτη των επιπτώσεων IR και χημικών γενοτοξικών παραγόντων του επαγγελματικού περιβάλλοντος σε κυτταρογενετικό επίπεδο.
- Κατανόηση των μηχανισμών συνδυασμένης δράσης IR και χημικών γενοτοξικών παραγόντων.
- Ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών δοσιμέτρησης και βιοπαρακολούθησης εργαζομένων με IR και γενοτοξικούς παράγοντες.

Ο στόχος των γενοτοξικών παραγόντων είναι το DNA το οποίο οργανώνεται σε χρωμοσώματα
στον πυρήνα του κυττάρου





Σχηματική αναπαράσταση του κυτταρικού κύκλου



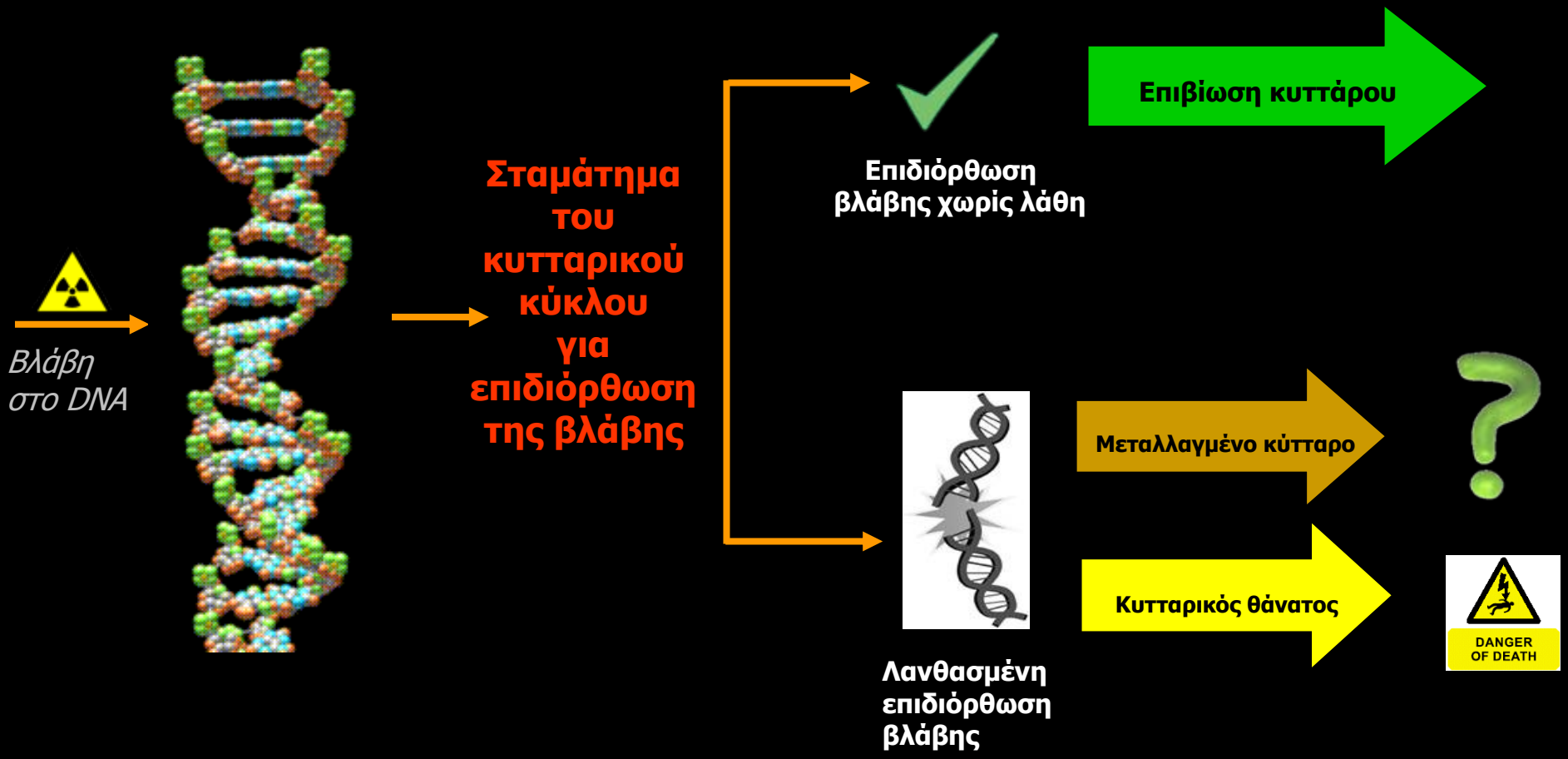
Για την προστασία του κυττάρου και την επιδιόρθωση των βλαβών στο γενετικό υλικό, υπάρχουν μεταξύ των φάσεων του κυτταρικού κύκλου «σημεία ελέγχου» (checkpoints).

Ένα τέτοιο σημείο ελέγχου υπάρχει μεταξύ της φάσης της προετοιμασίας του κυττάρου για τη Μίτωση (G2) και της φάσης της Μίτωσης (G2/M checkpoint)

Ανεπαρκής λειτουργία του σημείου ελέγχου έχει συσχετιστεί με γενετικές ασθένειες όπως και με διάφορες μορφές καρκίνου.

Βιβλιογραφία: Terzoudi GI, Manola KN, Pantelias GE and Iliakis G: Checkpoint abrogation in G2 compromises repair of chromosomal breaks in ataxia telangiectasia cells. Cancer Res 65: 11292-11296, 2005.

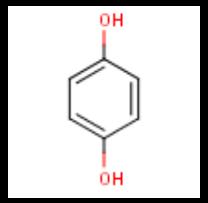
Αποτελέσματα Επίδρασης Ακτινοβολιών και Χημικών Γενοτοξικών Παραγόντων στο Γενετικό Υλικό



Συνδυασμένη δράση ιοντιζουσών ακτινοβολιών και χημικών ουσιών στο εργασιακό περιβάλλον

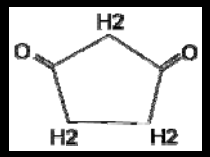
Υδροκινόνη (HQ)
Γλουταραλδεΰδη (Glut)

Χρήσεις Υδροκινόνης



- Εμπεριέχεται στη σύσταση υγρών εμφάνισης film
- Ακτινολογικά εργαστήρια
- Βιομηχανία πλαστικών, πολυμερών
- Βιομηχανία παρασκευής φυτοφαρμάκων
- Ιατρική (θεραπεία μελάσματος)
- Αισθητική (λευκαντικές κρέμες προσώπου για φακίδες και δυσχρωμίες)
- Κομμωτική (βαφές μαλλιών)
- Καπνός τσιγάρου (110-300 mgr/τσιγάρο)

Χρήσεις Γλουταραλδεΰδης



- **Ακτινολογικά εργαστήρια (υγρά εμφάνισης film)**
- **Αποστείρωση Ιατρικού και Οδοντιατρικού εξοπλισμού σε νοσοκομεία και ιατρεία (βακτηριοκτόνο, μυκητοκτόνο)**
- **Βιομηχανία χαρτιού (Αντιβακτηριδιακός παράγοντας στην επεξεργασία χαρτοπολτού)**
- **Ηλεκτρονική Μικροσκοπία (Μονιμοποιητικό διάλυμα ιστών)**
- **Βυρσοδεψία**

Αναγκαιότητα διερεύνησης δράσης γενοτοξικών παραγόντων

- Δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη η γενοτοξική τους δράση
- Κατατάσσονται ως πιθανά καρκινογόνα για τον άνθρωπο και ως καρκινογόνα σε πειραματόζωα
- Δεν υπάρχουν μελέτες σχετικά με τη συνεπίδρασή τους με IR

Πειραματικός Σχεδιασμός

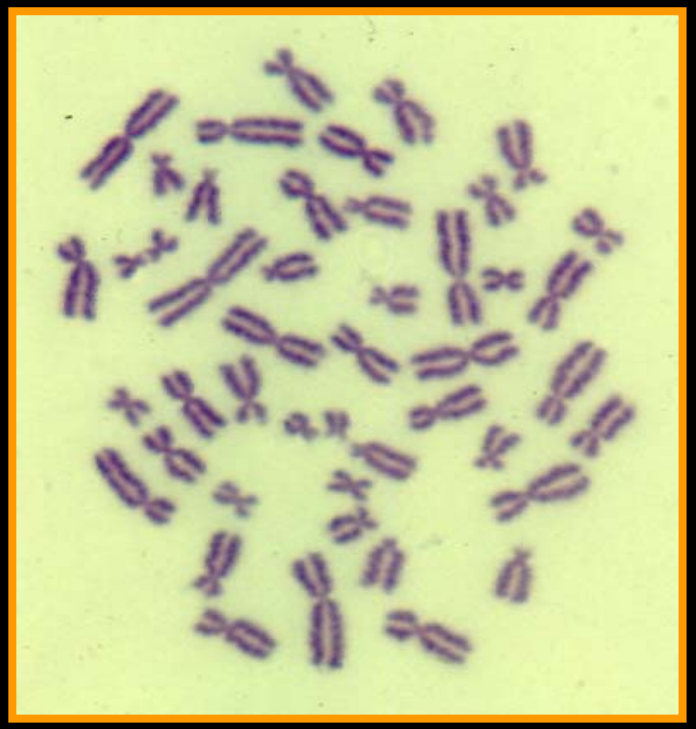
Επικεντρώνεται στην:

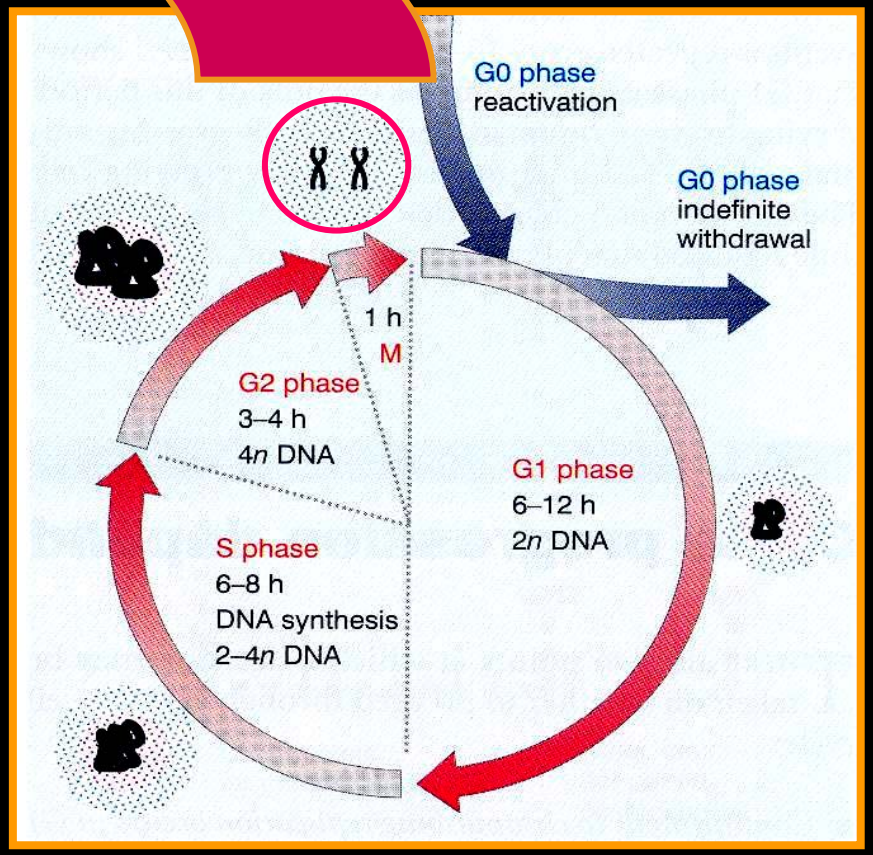
- Ανάπτυξη νέων ευαίσθητων κυτταρογενετικών μεθοδολογιών για το χαρακτηρισμό της γενοτοξικής δράσης χημικών παραγόντων σε επίπεδο χρωμοσωμάτων.
- Μελέτη της συνδυασμένης δράσης IR με HQ, λαμβάνοντας υπόψη και τις διαφορές στην ενδογενή ακτινοευαισθησία μεταξύ των ατόμων.
- Κατανόηση των μηχανισμών της γενοτοξικής τους δράσης.

Μέθοδοι

Για τη διερεύνηση χρωμοσωματικών βλαβών μετά από έκθεση σε γενοτοξικούς παράγοντες εφαρμόστηκαν μέθοδοι κλασικής κυτταρογενετικής που περιλαμβάνουν:

Μικροσκοπική ανάλυση των χρωμοσωμάτων στη Μετάφαση





Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο:

(1) Χρωμοσωματικών αλλοιώσεων (CAs)

CAs:
Χρησιμοποιούνται ευρέως ως δείκτης γονοτοξικότητας, καρκινογένεσης και ως δείκτης έκθεσης σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες.

CAs σε Μετάφαση PBL μετά από έκθεση σε IR (6Gy)

(2) Ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων (SCEs)

SCEs:
Χρησιμοποιούνται ευρέως ως δείκτης έκθεσης σε γενοτοξικούς παράγοντες

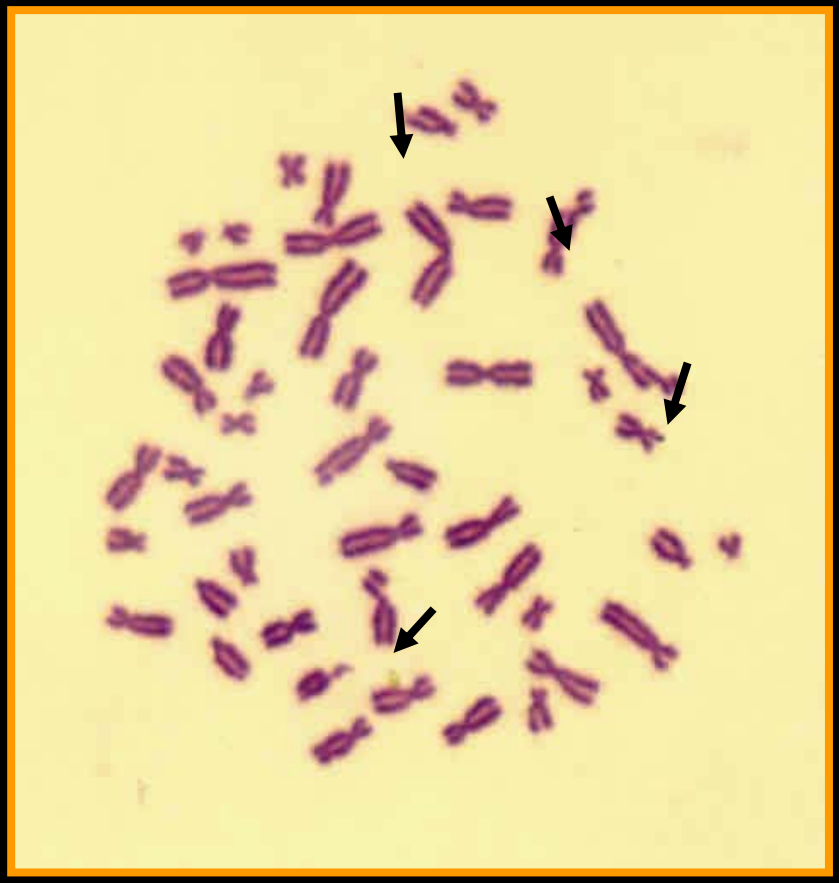
SCEs σε Μετάφαση PBL μετά από επίδραση γενοτοξικού παράγοντα (18-20 SCEs)

Βιβλιογραφία: Terzoudi GI, Malik SI, Pantelias GE, Margaritis K, Manola K and Makropoulos W: A new cytogenetic approach for the evaluation of mutagenic potential of chemicals that induce cell cycle arrest in the G2 phase. Mutagenesis 18: 539-543, 2003.

Για τη διερεύνηση της ακτινοευαισθησίας εφαρμόστηκε η μέθοδος της G2-ακτινοευαισθησίας (G2-assay)

G2-assay:

Η Μέθοδος, βασίζεται στην επίδραση IR στη G2-φάση του κυτταρικού κύκλου και στην καταμέτρηση των χρωμοσωματικών βλαβών στη Μετάφαση



Χρωματιδικές αλλοιώσεις μετά από ακτινοβόληση στη G2-φάση

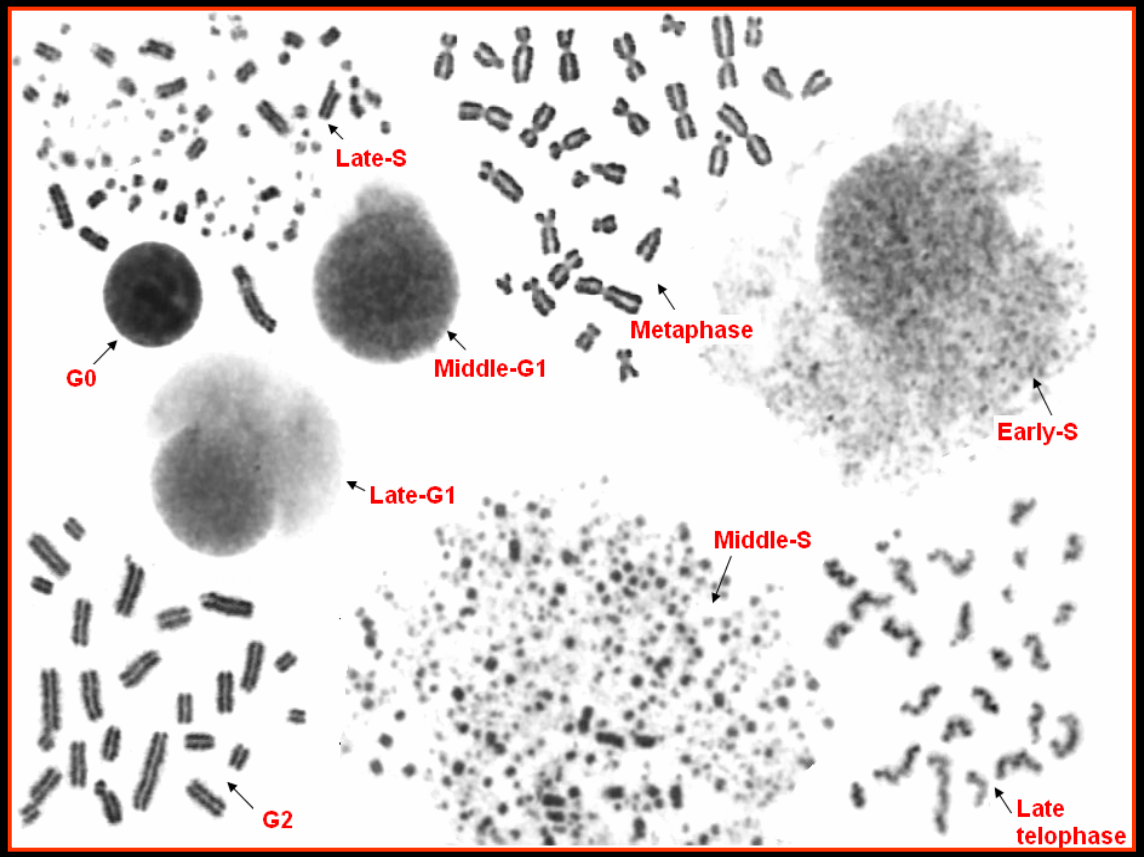
Βιβλιογραφία: Terzoudi GI, Jung T, Hain J, *et al*: Increased G2 chromosomal radiosensitivity in cancer patients: the role of cdk1/cyclin-B activity level in the mechanisms involved. Int J Radiat Biol 76: 607-615, 2000.

Οι συμβατικές μέθοδοι ανάλυσης των χρωμοσωμάτων στη Μετάφαση, εφαρμόστηκαν σε συνδυασμό με άλλες κυτταρογενετικές μεθόδους τελευταίας τεχνολογίας:

Μεθοδολογία
Πρόωρης Χρωμοσωματικής Συμπύκνωσης
(PCC, Premature Chromosome Condensation)

Μεθοδολογία PCC με τη χρήση καλυκουλίνης-Α

Επιτρέπει τη μικροσκοπική ανάλυση και ταξινόμηση των κυττάρων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και όχι μόνο στη Μετάφαση που επιτρέπει η συμβατική μέθοδος

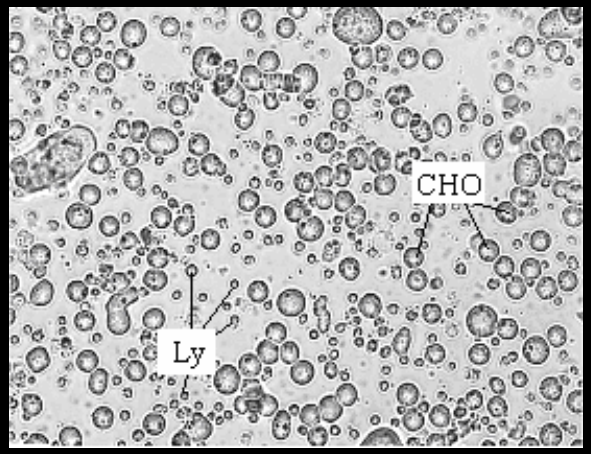


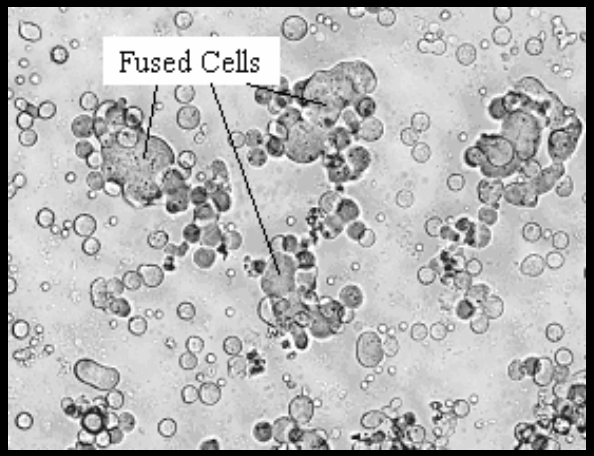
Λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου με τη χρήση καλυκουλίνης-Α.

Βιβλιογραφία: Terzoudi GI, Malik SI, Pantelias GE, Margaritis K, Manola K and Makropoulos W: A new cytogenetic approach for the evaluation of mutagenic potential of chemicals that induce cell cycle arrest in the G2 phase. Mutagenesis 18: 539-543, 2003.

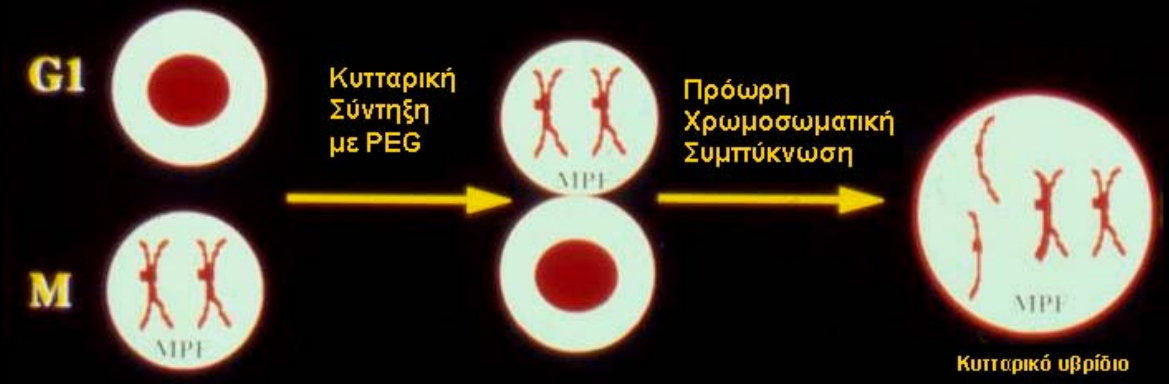
Μεθοδολογία PCC μέσω κυτταρικής σύντηξης

Η Μέθοδος βασίζεται στην σύντηξη μιτωτικών κυττάρων χάμστερ (CHO) με λεμφοκύτταρα (Ly) που έχουν εκτεθεί σε χημικούς γενοτοξικούς παράγοντες και IR.





Με τον τρόπο αυτό, μετά την κυτταρική σύντηξη, παράγοντες που προωθούν τη Μίτωση (MPF) από τα CHO κύτταρα επιδρούν στα λεμφοκύτταρα, συμπυκνώνοντας πρόωρα τα χρωμοσώματα τους και επιτρέποντας την άμεση ανάλυση της βλάβης.

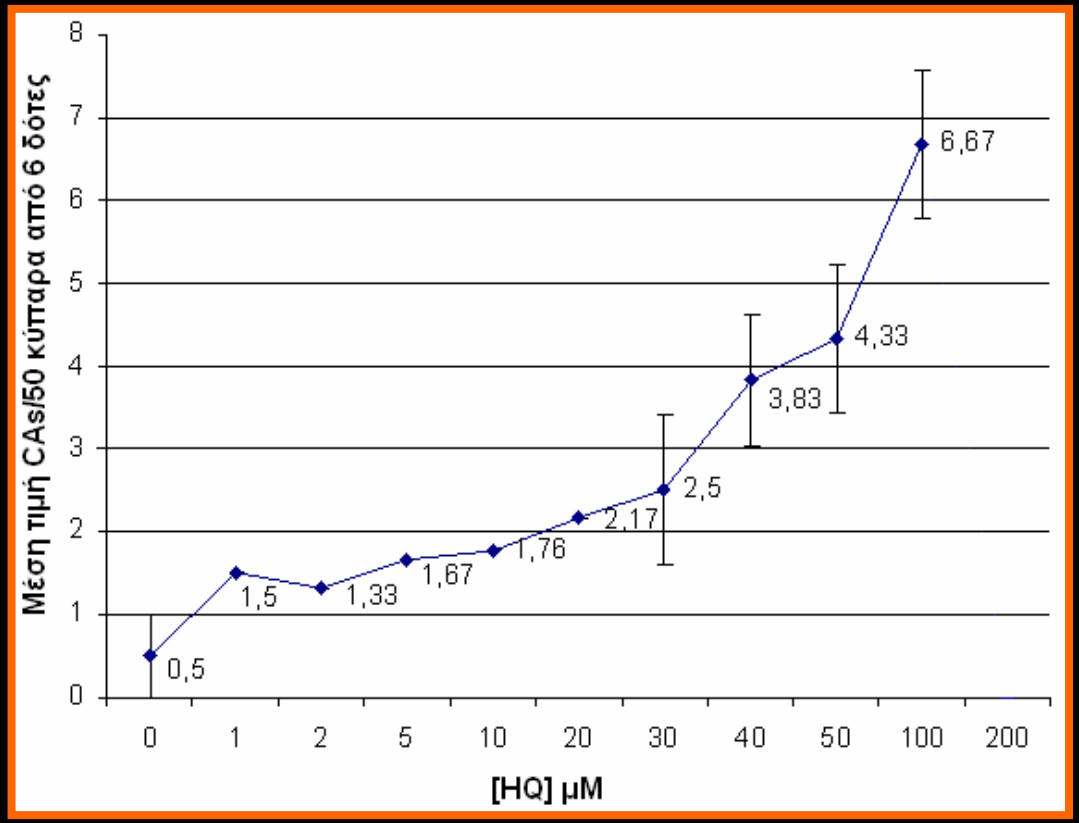


Βιβλιογραφία: Pantelias GE and Maillie HD: A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol. Somatic Cell Genet 9: 533-547, 1983.

Αποτελέσματα

(1) Μελέτη επαγωγής CAs

- Έκθεση σε [HQ] >30μM → στατιστικώς σημαντική διαφορά στις CAs ως προς το Control
- Στα 200μM δεν ήταν δυνατή η ανάλυση μεταφάσεων

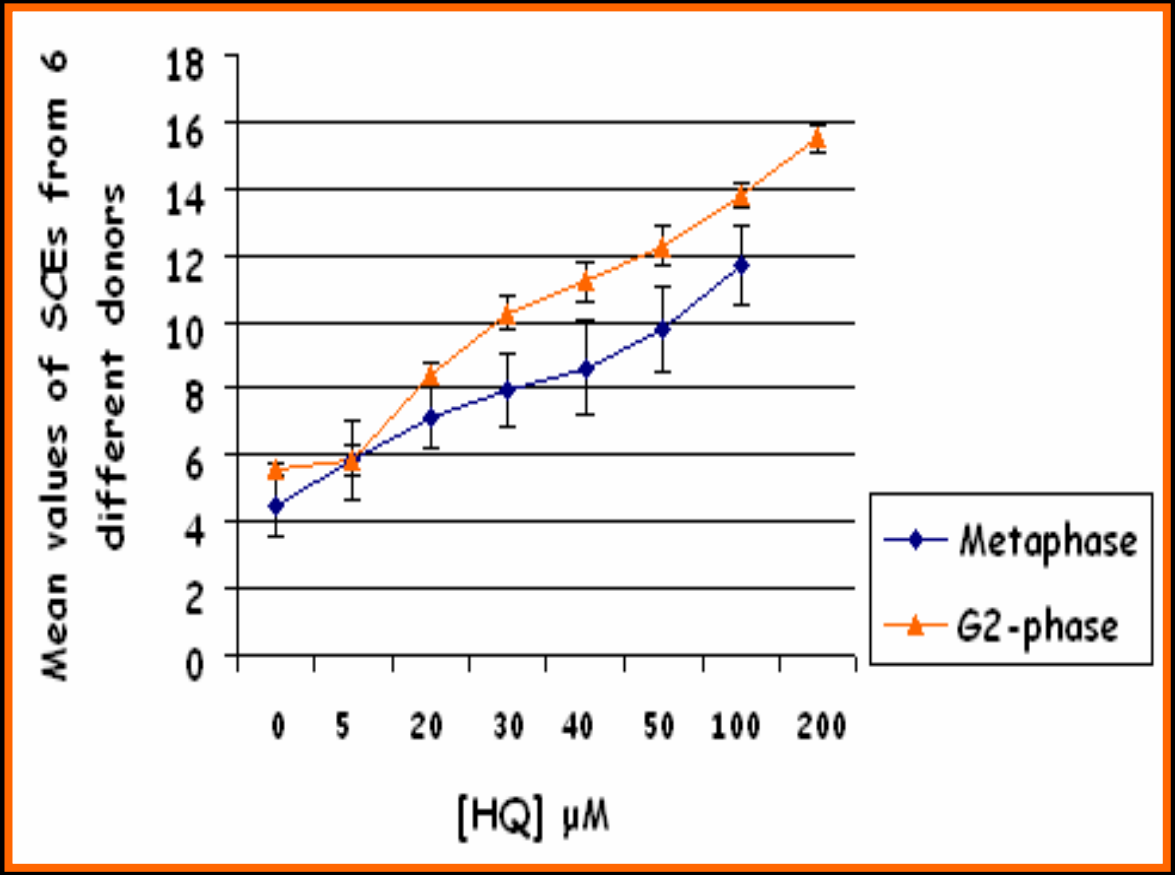


(2) Μελέτη επαγωγής SCEs

- Η HQ προκαλεί δοσοεξαρτώμενη αύξηση των SCEs
- Με τη μέθοδο PCC, μελετήθηκαν SCEs στη G2-φάση (παρατηρήθηκε ↑↑ SCEs)

<u>Επιπλέον:</u>

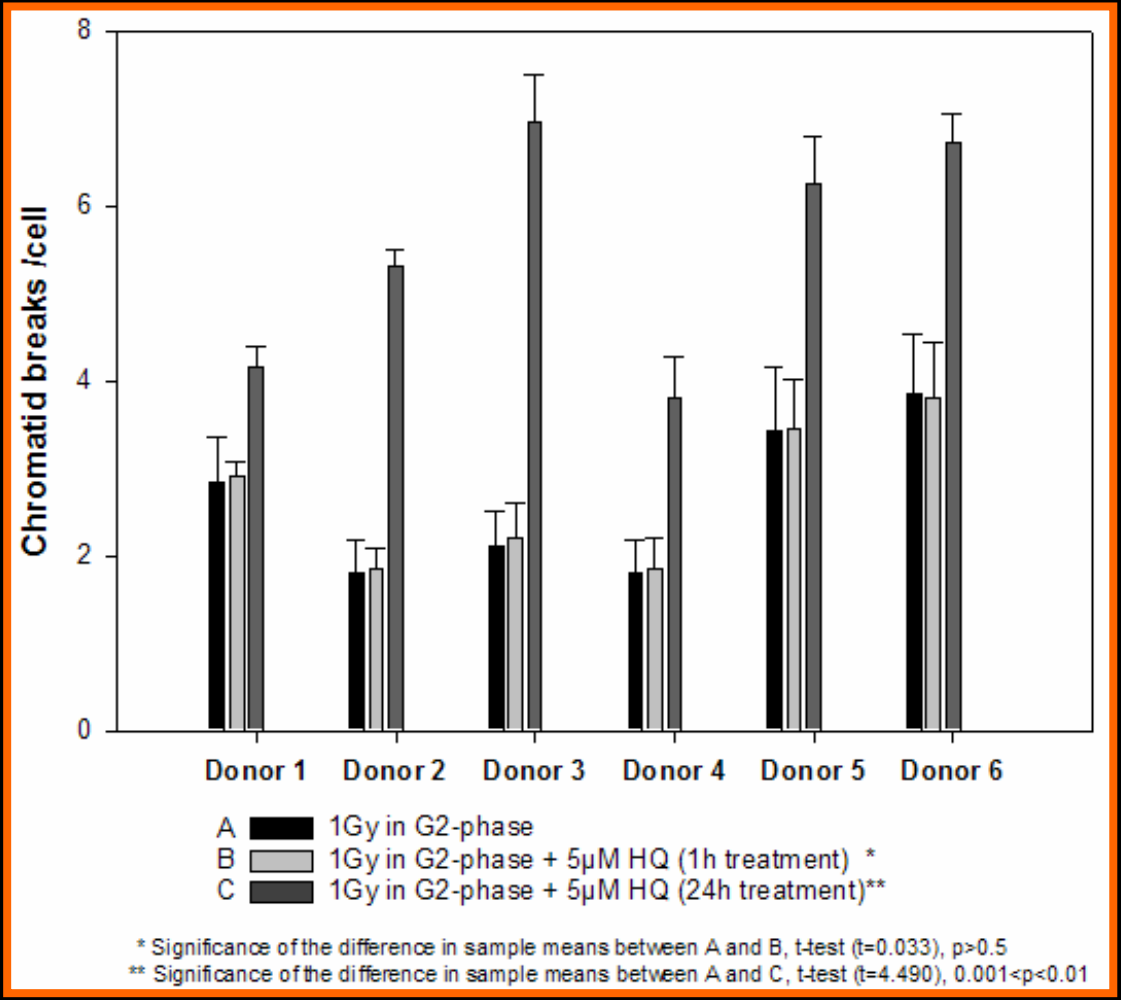
Κατέστη δυνατή η ανάλυση SCEs στη G2-φάση σε [HQ] που η ανάλυση στη Μετάφαση δεν είναι εφικτή (200μM)



(3) Μελετήθηκε η τροποποίηση των βιολογικών επιδράσεων IR μετά από επίδραση χημικών γενοτοξικών παραγόντων

Λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος εκτέθηκαν σε μη-γενοτοξική δόση HQ και σε IR.

Η HQ αυξάνει τη G2-ακτινοευαισθησία.



(4) Διερευνήθηκαν με PCC οι μηχανισμοί δράσης της HQ στην αύξηση της ακτινοευαισθησίας

Πιο συγκεκριμένα, αν η HQ επιδρά:

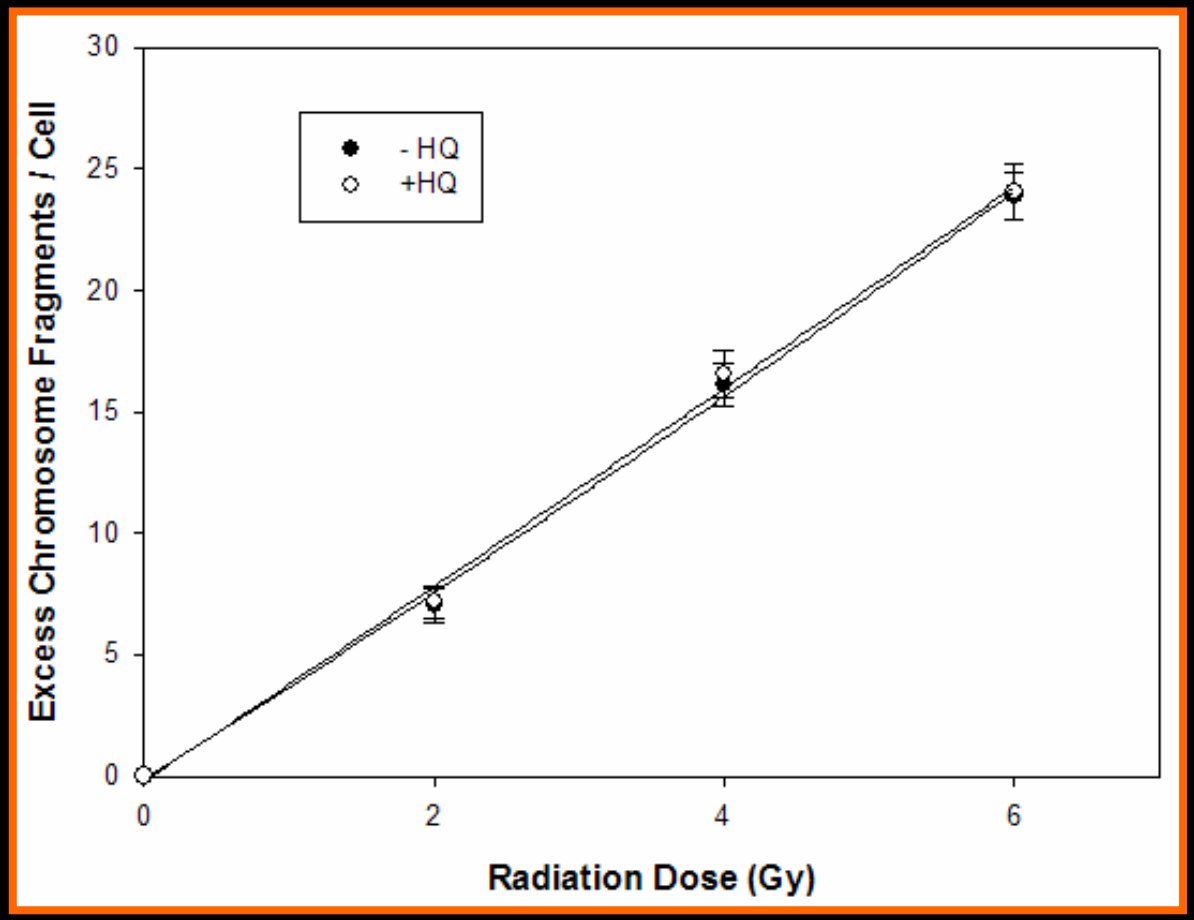
- Α) Αρχική βλάβη που προκαλείται από την ακτινοβολία
- Β) Μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA
- Γ) Κυτταρικό κύκλο

(4A) Επίδραση HQ + IR στην επαγωγή χρωμοσωματικών βλαβών

Ο αριθμός των CAs μετά από έκθεση σε 2, 4 και 6 Gy παραμένει ίδιος παρουσία και απουσία HQ.

<u>Συμπέρασμα</u>:

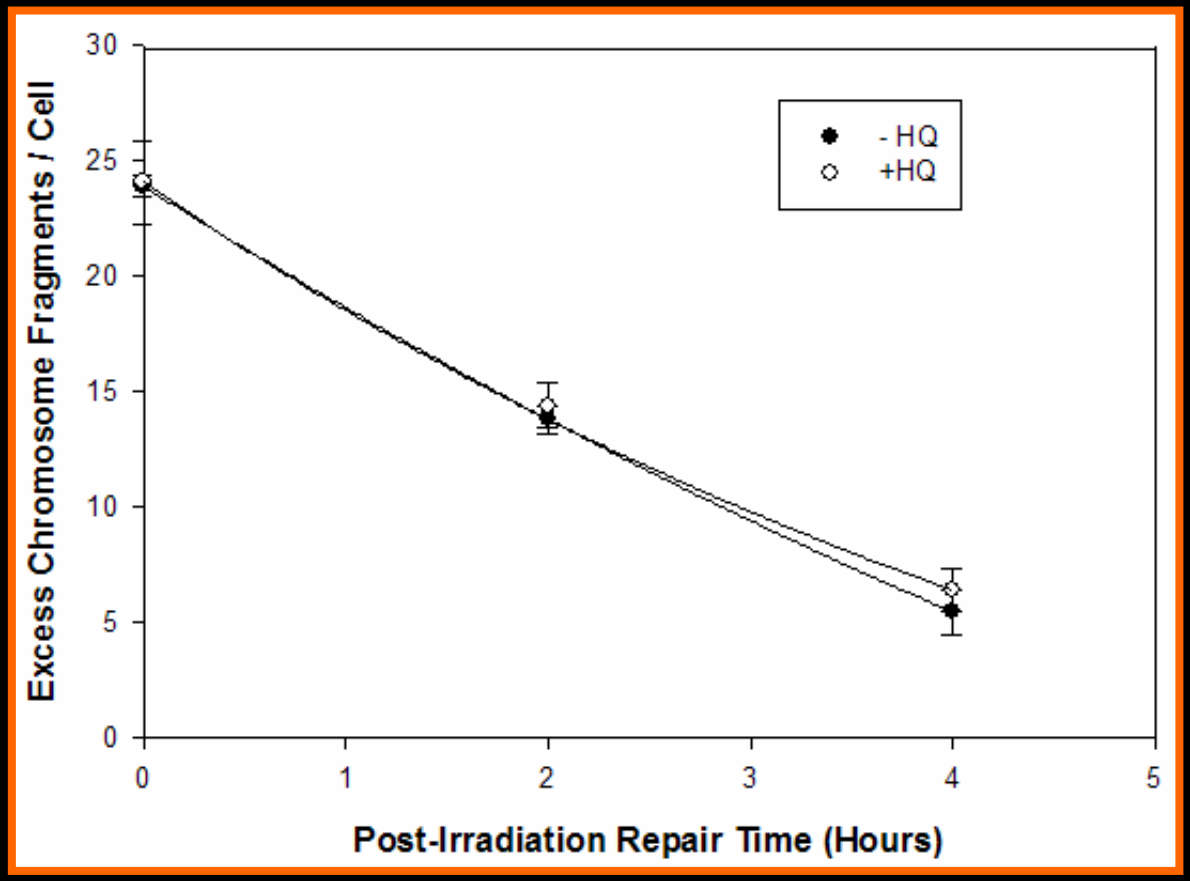
η HQ δεν επιδρά στην αρχική βλάβη που προκαλείται από την ακτινοβολία



(4B) Επίδραση HQ + IR στο μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA

Ο αριθμός των CAs
2 και 4 ώρες μετά την
έκθεση σε IR παραμένει
ίδιος παρουσία και
απουσία HQ.

<u>Συμπέρασμα</u>:
η HQ δεν επιδρά στο
μηχανισμό επιδιόρθωσης
του DNA

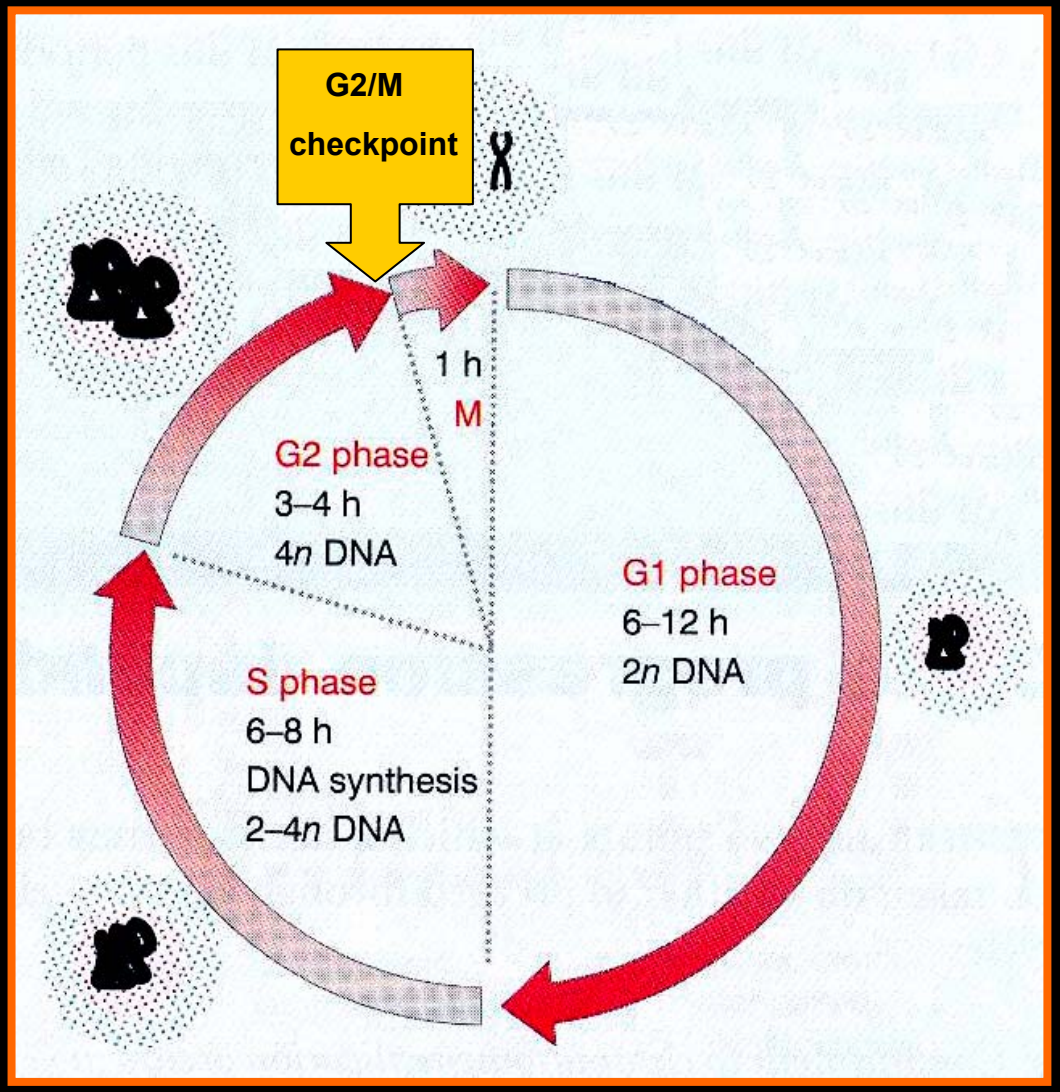


(4Γ) Επίδραση HQ+IR στον κυτταρικό κύκλο

Μετά από ταξινόμηση κυττάρων στις G1, S, G2, M φάσεις του κύκλου

<u>Συμπέρασμα</u>:

Η HQ αυξάνει την επαγωγή CAs μετά από έκθεση σε IR επιδρώντας στο *"G2/M checkpoint"* επιτρέποντας περισσότερα αλλοιωμένα κύτταρα να περνούν στη Μετάφαση.



Παρουσιάσεις - Συνέδρια

Hatzi V.I., G.I.Terzoudi, S.I. Malik, G.E. Pantelias & V. Makropoulos "Combined cytogenetic action of hydroquinone and ionising radiation as analyzed in metaphase and G2-phase of peripheral blood lymphocytes". *35th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society – Environment and Human Genetic Disease-Causes, mechanisms and effects*, Kos, July, 2005.

Hatzi V.I., G.I.Terzoudi, S.I. Malik, C. Stavropoulou, G.E. Pantelias, and V. Makropoulos. "Individual sensitivity to the genotoxic agents by the analysis of SCEs in G2-phase arrested cells and the potential role of endogenous mutagenesis" *35th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society – Environment and Human Genetic Disease-Causes, mechanisms and effects*, Kos, July, 2005.

Χατζή Β.Ι., Γ.Ι. Τερζούδη, Γ.Ε. Παντελιάς και Β. Μακρόπουλος. "Κυτταρογενετική μελέτη συνδυασμένης δράσης υδροκινόνης και ιοντίζουσας ακτινοβολίας σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος" *4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Προαγωγής και Αγωγής Υγείας,* Αθήνα 8-10 Δεκεμβρίου 2005.

Hatzi V.I., G.I.Terzoudi, G.E. Pantelias and V. Makropoulos. "Simultaneous in vitro exposure to hydroquinone and ionising radiation: SCEs and chromosome aberration analysis in peripheral blood lymphocytes" *28th International Congress on Occupational Health*, 11-16 June 2006, Milan, Italy.

INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY 00: 0-00, 0000

The benzene metabolite hydroquinone enhances G2-chromosomal radiosensitivity by inducing a less-efficient G2-M-checkpoint in irradiated lymphocytes

VASILIKI I. HATZI[1], GEORGIA I. TERZOUDI[1], GABRIEL E. PANTELIAS[1], CHARA SPILIOPOULOU[3] and VASILIOS MAKROPOULOS[2]

[1]Institute of Nuclear Technology and Radiation Protection, National Center for Scientific Research, NCSR 'Demokritos'; [2]Hellenic Institute for Occupational Health and Safety, ELINYAE; [3]Department of Forensic Medicine and Toxicology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

Review Article
Special Issue: Role of Microscopy on Environmental Factors Influencing Human Genetic Material
TheScientificWorldJOURNAL (2006) 6, 1174–1190
ISSN 1537-744X; DOI 10.1100/tsw.2006.210

TheScientificWorldJOURNAL
www.thescientificworld.com

The Use of Premature Chromosome Condensation to Study the Influence of Environmental Factors on Human Genetic Material in Interphase Cells

Vasiliki I. Hatzi[1], Georgia I. Terzoudi[1*], Christina Paraskevopoulou[1], Vasilios Makropoulos[2], Demetrios P. Matthopoulos[3], and Gabriel E. Pantelias[1]

[1]Institute of Nuclear Technology and Radiation Protection, National Center for Scientific Research, NCSR "Demokritos", 153 10 Ag. Paraskevi Attikis, Athens, Greece; [2]Hellenic Institute for Occupational Health and Safety, ELINYAE, Liosion 143 & Theirsiou 6, 10445, Attiki Square, Athens, Greece; [3]University of Ioannina, Agrinio Campus, Department of Environmental and Natural Resources Management, Seferi 2, Agrinio 30100, Greece

E-mail: vh@ipta.demokritos.gr; georgia@ipta.demokritos.gr; cparaskev@rrp.demokritos.gr; info@elinyae.gr; dmatthop@cc.uoi.gr; gabriel@ipta.demokritos.gr

Received June 10, 2006; Revised August 15, 2006; Accepted August 18, 2006; Published September 25, 2006