



**ΕΛΛΗΝΙΚΟ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ  
ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ  
ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΗΣ  
ΕΡΓΑΣΙΑΣ**



Το έργο συγχρηματοδοτείται από τον κρατικό προϋπολογισμό κατά 71,42% το οποίο αντιστοιχεί σε 75% από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης και 25% από το Ελληνικό Δημόσιο και κατά 28,58% από πόρους του ΕΛ.ΙΝ.Υ.Α.Ε. (Λ.Α.Ε.Κ.)

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ  
ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΡΓΑΖΟΜΕΝΩΝ  
ΜΕ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ  
ΧΗΜΙΚΟΥΣ ΒΛΑΠΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2007**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΡΓΑΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΕΚΘΕΣΗ  
ΣΕ ΧΗΜΙΚΟΥΣ ΒΛΑΠΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

ISBN: 978-960-7678-82-9

Α΄ Έκδοση: Ιούνιος 2007

Copyright © Ελληνικό Ινστιτούτο Υγιεινής και Ασφάλειας της Εργασίας

Λιοσίων 143 και Θειοσίου 6, 104 45 ΑΘΗΝΑ

Τηλ.: 210 82 00 100

Φάξ: 210 82 00 222 – 210 88 13 270

Email: [info@elinyae.gr](mailto:info@elinyae.gr)

Internet: <http://www.elinyae.gr>

Απαγορεύεται η αναπαραγωγή μέρους ή όλου του εντύπου, με οποιονδήποτε τρόπο, χωρίς αναφορά της πηγής.

ΔΙΑΝΕΜΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΕΛ.ΙΝ.Υ.Α.Ε • ΑΠΑΓΟΡΕΥΕΤΑΙ Η ΠΩΛΗΣΗ ΑΠΟ ΤΡΙΤΟΥΣ



Το κείμενο που ακολουθεί αποτελεί την τελική αναφορά του έργου «**Ανάπτυξη νέων μεθόδων βιολογικής παρακολούθησης των εργαζομένων με έκθεση σε χημικούς βλαπτικούς παράγοντες**» το οποίο πραγματοποιήθηκε από το Εργαστήριο Υγειοφυσικής & Περιβαλλοντικής Υγιεινής, ΙΠΤ-Α του ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΕΡΕΥΝΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανταγωνιστικότητα» - ΕΠΑΝ, μέτρο 1.1 «Βιομηχανικές, Τεχνολογικές & Επιχειρηματικές Υποδομές», δράση 1.1.5 «Ενίσχυση της υποδομής του ΕΛ.ΙΝ.Υ.Α.Ε.», πράξη 1.1.5.2 «Παροχή συμβουλευτικών υπηρεσιών και διάδοσή τους στον τομέα της υγείας και ασφάλειας στην εργασία»

Επιστημονικός Υπεύθυνος: **Δρ. Γεωργία Τετζούδη**,  
Συνεργαζόμενη Ερευνήτρια, ΙΠΤ-Α, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Στην υλοποίηση της μελέτης αυτής είχαν ουσιαστική συμμετοχή οι κάτωθι επιστήμονες του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»:

**Βασιλική Χατζή**, Υποψήφια Διδάκτορας  
**Shaukat Iqbal Malik**, Υποψήφιος Διδάκτορας  
**Δρ. Χρύσα Σταυροπούλου**, Συνεργαζόμενη Ερευνήτρια  
**Δρ. Γαβριήλ Παντελιάς**, Ερευνητής Α', Διευθυντής Ινστιτούτου Ραδιοισοτόπων & Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων  
**Κλειώ Μακρυγιαννάκη**, Διοικητική Υποστήριξη

Επιμέλεια έκδοσης: **Εβίτα Καταγή, Ελένη Ζαρέντη**  
Τμήμα Εκδόσεων, Κέντρο Τεκμηρίωσης-Πληροφόρησης ΕΛ.ΙΝ.Υ.Α.Ε.

### **ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ ΕΛ.ΙΝ.Υ.Α.Ε.**

- Πρόεδρος:** • Βασίλειος Μακρόπουλος  
**Αντιπρόεδροι:** • Ιωάννης Δραπανιώτης (Σ.Ε.Β., Γ.Σ.Ε.Β.Ε.Ε., Ε.Σ.Ε.Ε.)  
• Ανδρέας Κολλάς (Γ.Σ.Ε.Ε.)

- Μέλη:** • Ιωάννης Αδαμάκης (Γ.Σ.Ε.Ε.)  
• Θεόδωρος Δέδες (Σ.Ε.Β.)  
• Νικόλαος Θωμόπουλος (Γ.Σ.Ε.Ε.)  
• Δημήτριος Λέντζος (Γ.Σ.Ε.Β.Ε.Ε.)  
• Αναστάσιος Παντελάκης (Ε.Σ.Ε.Ε.)  
• Κυριάκος Σιούλας (Γ.Σ.Ε.Ε.)

### **ΓΕΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ**

Μηνάς Αναλυτής, Οικονομολόγος, PhD

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### 1

#### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η κυτταρογενετική ως εργαλείο ανάλυσης της γενοτοξικής δράσης φυσικών και χημικών παραγόντων	9
1.2 Γενοτοξικότητα και αξιολόγηση βιολογικής δράσης γενοτοξικών παραγόντων	13
1.3 Λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ως κυτταρικό σύστημα αναφοράς και ελέγχου γενοτοξικότητας	13
1.4 Η κλασική κυτταρογενετική μέθοδος ανάλυσης ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων	14
1.5 Η αναγκαιότητα για την ανάπτυξη νέας κυτταρογενετικής μεθόδου εκτίμησης γενοτοξικότητας παραγόντων που προκαλούν καθυστέρηση στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου.	16
1.6 Έλεγχος γενοτοξικής δράσης γεωργικών φαρμάκων στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου	18
1.6.1 Ατραζίνη (Atrazine)	18
1.6.2 Παρακουάτ (Paraquat)	20
1.6.3 Μανέμπ (Maneb)	21
1.6.4 Δελταμεθρίνη (Deltamethrin)	21
1.6.5 Κουζαλοφώπ (Quizalofop)	22
1.6.6 Λινουρόν (Linuron)	22
1.6.7 Τριγλωροαιθυλένιο	22
1.6.8 Τετραγλωροαιθυλένιο	23
1.6.9 4-υδροξύ βενζοϊκό οξύ	23
1.6.10 2- υδροξύ-1,4-ναφθοκινόνη	24
1.7 Έκθεση σε συνδυασμό φυτοφαρμάκων και συχνότητα ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος	24
1.8 Αξιολόγηση γενοτοξικής δράσης Υδροκινόνης (Hydroquinone) με τη μέθοδο ανάλυσης ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων στην G2-φάση	25
1.9 Πολυμορφισμός του γονιδίου της τρानσφεράσης της γλουταθειόνης GSTT1 και συχνότητα ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων	26
1.10 Σκοπός της μελέτης	26

### 2

#### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συνθήκες καλλιέργειας	29
2.2 Έκθεση κυτταρικών καλλιιεργειών διεγερμένων T-λεμφοκυττάρων σε: α. Χημικούς Παράγοντες β. Ιοντίζουσα Ακτινοβολία	30
2.3 Σύλλογή, μονιμοποίηση και προετοιμασία χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων	30
2.4 Επαγωγή πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης κατά την G2 φάση	31
2.5 Ανταλλαγές αδελφών χρωματιδίων κατά την G2 και M φάση ανθρώπινων λεμφοκυττάρων	31
2.6 Χημικές ουσίες και έλεγχος της γενοτοξικής τους δράσης	32

2.7 Εκτίμηση του Δείκτη Διπλασιασμού (R.I., Replication Index) .....	32
2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) για τον έλεγχο του πολυμορφισμού του γονιδίου GSTT1: Αρχή μεθόδου Πολλαπλής Αλυσιδωτής Αντίδρασης της πολυμεράσης (Multiplex Chain Reaction, Multiplex PCR) .....	33
2.9 Πρωτόκολλο μεθόδου Πολλαπλής Αλυσιδωτής Αντίδρασης της πολυμεράσης .....	35

## 3

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ανάπτυξη κυτταρογενετικής μέθοδου για την εκτίμηση της γενετοξικής δράσης χημικών παραγόντων που προκαλούν καθυστέρηση των κυττάρων στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου ..	37
3.2 Ανάλυση ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων σε πρόωρα συμπυκνωμένα χρωματοσώματα λεμφοκυττάρων στην G2-φάση του κυτταρικού κύκλου μετά από έκθεση στο ζιζανιοκτόνο ατραζίνη (atrazine) .....	42
3.3 Έλεγχος γενετοξικής δράσης των φυτοφαρμάκων Παρακουάτ, Μανέμπ, και συνδυασμού Ατραζίνης, Κουζαλοφόπ και Λινουρόν .....	45
3.4 Γενετοξική δράση Υδροκινόνης (Hydroquinone (HQ)) με τη μέθοδο ανάλυσης ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων στην G2 φάση .....	47
3.5 Συνοπτική περιγραφή γενετοξικής δράσης άλλων χημικών παραγόντων του επαγγελματικού περιβάλλοντος .....	50
3.6 Συχνότητα ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων και πολυμορφισμός του γονιδίου της τρानσφεράσης της γλουταθειόνης GSTT1 .....	52

## 4

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Μια νέα κυτταρογενετική μέθοδος για την εκτίμηση της γενετοξικής δράσης χημικών παραγόντων που προκαλούν καθυστέρηση των κυττάρων στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου .....	55
4.2 Ανάλυση ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων σε πρόωρα συμπυκνωμένα χρωματοσώματα λεμφοκυττάρων στην G2-φάση του κυτταρικού κύκλου μετά από έκθεση στο ζιζανιοκτόνο ατραζίνη (atrazine) .....	58
4.3 Έλεγχος γενετοξικής δράσης των φυτοφαρμάκων Παρακουάτ, Μανέμπ, και συνδυασμού φυτοφαρμάκων Ατραζίνη, Κουζαλοφόπ και Λινουρόν .....	59
4.4 Γενετοξική δράση Υδροκινόνης με τη μέθοδο ανάλυσης ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων στην G2 φάση .....	61
4.5 Συχνότητα ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων και πολυμορφισμός του γονιδίου της τρानσφεράσης της γλουταθειόνης GSTT1 .....	62

## 5

<b>ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ .....</b>	<b>65</b>
--	-----------

## 6

<b>ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ .....</b>	<b>67</b>
--	-----------

## 7

<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>69</b>
---------------------------	-----------

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η γενετοξική δράση αρκετών χημικών ουσιών συνδέεται με τη μεταλλαξιγόνο και καρκινογόνο δράση τους. Οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνων δρουν μέσω πολύπλοκων μηχανισμών. Η μελέτη των μηχανισμών αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την ανάπτυξη ειδικών κυτταρογενετικών μεθόδων με τη βοήθεια των οποίων είναι δυνατό να εκτιμηθεί η γενετοξική δράση π.χ. γεωργικών φαρμάκων.

Το ΕΛΙΝΥΑΕ προσπαθεί να συμβάλει σε όλο το φάσμα της έρευνας των κινδύνων για την υγεία στους χώρους εργασίας. Στα πλαίσια αυτά υποστήριξε με όλα τα μέσα την παρούσα έρευνα που είχε ως αντικείμενο την ανάπτυξη νέων μεθόδων βιολογικής παρακολούθησης των εργαζομένων που εκτίθενται σε χημικούς βλαπτικούς παράγοντες

**Βασίλης Μακρόπουλος**  
Πρόεδρος ΕΛ.ΙΝ.Υ.Α.Ε.  
Καθ. Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας





## 1

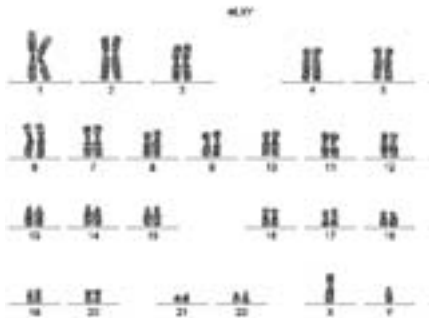
## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

**1.1 Η κυτταρογενετική ως εργαλείο ανάλυσης της γενοτοξικής δράσης φυσικών και χημικών παραγόντων**

Στις σύγχρονες κοινωνίες αυξάνεται συνεχώς η ανησυχία σχετικά με τη μεταλλαξιγόνο και καρκινογόνο δράση ενός ευρέως φάσματος φυσικών και χημικών γενοτοξικών παραγόντων λόγω της ευρείας χρήσης τους, της απελευθέρωσής τους στο περιβάλλον, της επίπτωσής τους στην τροφική αλυσίδα και γενικότερα λόγω των συνηθειών και του τρόπου διαβίωσης σήμερα. Δυστυχώς όμως, ενώ το φάσμα των μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων παραγόντων στο οποίο εκτίθενται οι άνθρωποι και οι υπόλοιποι οργανισμοί του σύγχρονου κόσμου διαρκώς διευρύνεται, υπάρχουν πολύ λίγες μεθοδολογίες με τις οποίες μπορούν να εκτιμηθούν άμεσα οι μεταλλάξεις και γενικότερα οι βλάβες που επάγονται στο γενετικό υλικό των κυττάρων. Ορισμένες άμεσες κυτταρογενετικές τεχνικές βασίζονται στη χρήση οπτικού μικροσκοπίου και στην παρατήρηση αισθητών αλλαγών που επάγονται στα χρωμοσώματα. Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν αφ' ενός εμφανείς χρωμοσωματικές θραύσεις και αναδιατάξεις χρωμοσωματικών τμημάτων σε ένα χρωμοσώμα ή και μεταξύ δύο ή και τριών χρωμοσωμάτων (δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες). Αφ'ετέρου περιλαμβάνουν και ηπιότερες χρωμοσωματικές αλλαγές που χαρακτηρίζονται ως ανταλλαγές των αδελφών χρωματιδίων (Sister Chromatid Exchanges, SCEs). Οι ανταλλαγές των αδελφών χρωματιδίων είναι αμοιβαίες, συμμετρικές ανταλλαγές DNA αλληλουχιών, σε ομόλογες θέσεις ανάμεσα στα αδελφά χρωματίδια, στο στάδιο των τεσσάρων κλώνων κατά την αντιγραφή του DNA. Με τη δημιουργία των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων το κύτταρο πιθανά υπερινικά αυθόρμητα τις βλάβες που υφίσταται το DNA πριν ή και κατά την αντιγραφή του μετά από έκθεση σε γενοτοξικούς παράγοντες. Επομένως, οι ανταλλαγές των αδελφών χρωματιδίων θεωρούνται ως δείκτης τόσο της βλάβης του DNA όσο και της επιδιορθωτικής ικανότητας των κυττάρων. Για τον λόγο αυτό, η συχνότητα ανταλλαγής αδελφών χρωματιδίων



*Εικόνα 1: Απεικόνιση χρωμοσωμάτων στη μετάφαση με τη μέθοδο GTG-ζωνοποίησης μετά από καλλιέργεια λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος*



**Εικόνα 2:** Φυσιολογικός συστατικός καρυότυπος άρρενος με τη μέθοδο GTG-ζωνοποίησης χρωμοσωμάτων



**Εικόνα 3:** 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

που προκύπτει από την ανάλυση μεταφασικών κυττάρων έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα ως δείκτης έκθεσης σε μεταλλαξιγόνους και καρκινογόνους παράγοντες, καθώς επίσης και για τον έλεγχο της γενετοξικής τους δράσης. Η κλασική μέθοδος ανάλυσης των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων *in vitro*, που διεξάγεται σε κύτταρα που βρίσκονται στη μετάφαση της δεύτερης μιτωτικής διαίρεσης, μειονεκτεί καθ' όσον δεν συμπεριλαμβάνει κύτταρα που καθυστερούν π.χ. στην G2 φάση του κυτταρικού τους κύκλου λόγω της έκθεσης σε γενετοξικούς παράγοντες. Συνεπώς, η εκτίμηση της συχνότητας των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων αφενός δεν είναι ακριβής και αφετέρου δεν είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί μετά από έκθεση σε υψηλές δόσεις ενός γενετοξικού παράγοντα, διότι 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 συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων που προκύπτει χρησιμοποιώντας την κλασική κυτταρογενετική μεθοδολογία ενδεχομένως να υποεκτιμά τη δραστικότητα ενός γενετοξικού παράγοντα. Ένα επιπλέον σημαντικό μειονέκτημα της κλασικής ανάλυσης ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων αποκλειστικά σε κύτταρα που ευρίσκονται στη μετάφαση είναι 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. Γενικά, η αύξηση της συχνότητας ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων που προκαλούνται από κάποιο υπό εξέταση παράγοντα σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφο-



**Εικόνα 4:** Απεικόνιση φυσιολογικών χρωμοσωμάτων στη μετάφαση μετά από εφαρμογή της κλασικής χρώσης με Giemsa



**Εικόνα 5:** Μεταφασικά χρωμοσώματα κυττάρου της σειράς Chinese Hamster Ovary (CHO cells) μετά από έκθεση σε γενετοξικούς παράγοντες και χρώση Giemsa. Στην εικόνα φαίνονται ένα χρωμόσωμα δικεντρικό και δύο δακτύλιοι με κεντρομερίδια.

κυττάρων *in vitro*, είναι δυνατό να επηρεαστεί από πολλούς μεθοδολογικούς και βιολογικούς παράγοντες. Οι μεθοδολογικοί παράγοντες καθορίζονται από τις συνθήκες της καλλιέργειας και είναι συνήθως ελεγχόμενοι, ενώ οι βιολογικοί παράγοντες εξαρτώνται από το πειραματικό υλικό.

Στην παρούσα μελέτη το ενδιαφέρον εστιάζεται στην προσπάθεια ανάπτυξης μιας νέας μεθοδολογίας ώστε να ξεπεράσουμε τις αδυναμίες που εμφανίζει η κλασική μέθοδος ανάλυσης των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων στη μετάφαση. Επίσης, στο να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς δράσης πιθανών γενετοξικών παραγόντων, καθώς και τις αιτίες απόκλισης των αποτελεσμάτων μεταξύ εργαστηρίων που πιθανά οφείλονται τόσο σε μεθοδολογικούς όσο και βιολογικούς παράγοντες. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκε μια νέα κυτταρογενετική μεθοδολογία με την οποία η ανάλυση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων αντί να γίνεται σε **μεταφασικά** λεμφοκύτταρα μετά από την *in vitro* καλλιέργειά τους, επιτυγχάνεται να γίνεται ταυτόχρονα και σε **μεσοφασικά** κύτταρα και συγκεκριμένα σε πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα ανθρώπινων λεμφοκυττάρων στην G2 φάση του κυτταρικού τους κύκλου (G2-phase prematurely condensed chromosomes, G2-PCCs). Με τη νέα αυτή μέθοδο συμπεριλαμβάνονται στην ανάλυση και τα λεμφοκύτταρα που παρουσιάζουν καθυστέρηση στην G2 φάση μετά από έκθεση σε γενετοξικούς παράγοντες και επομένως καθίσταται δυνατόν να ελεγχθεί εάν η κλασική μέθοδος ανάλυσης των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων αποκλειστικά σε μεταφασικά κύτταρα υποεκτιμά ή όχι τη γενετοξική δράση πιθανών καρκινογόνων ουσιών. Με την προτεινόμενη μέθοδο είναι δυνατό να ελεγχθεί επίσης εάν οι αποκλίσεις στη συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων που παρατηρούνται από άτομο σε άτομο οφείλονται



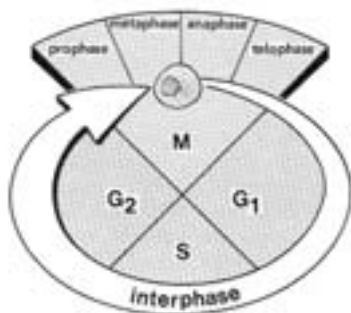
**Εικόνα 6:** Απεικόνιση χρωμοσωμάτων στη μετάφαση με τη μέθοδο GTG-ζωνοποίησης μετά τη δράση γενοτοξικών παραγόντων και την καλλιέργεια λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος. Στην εικόνα φαίνονται χρωμοσωματικές αντι-μεταθέσεις μεταξύ 7 και X καθώς και μεταξύ ω και κ.



**Εικόνα 7:** Απεικόνιση ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος στη μετάφαση με τη μέθοδο FPG. Η σύσφιξη των χρωματιδίων στο κεντρομερίδιο είναι χαρακτηριστικό των μεταφασικών χρωμοσωμάτων.

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. Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε χρησιμοποιήθηκε επιπλέον για τον εμπειρι-

στατωμένο γενοτοξικό έλεγχο χημικών ουσιών που περιέχονται σε ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό στη σύγχρονη γεωργία. Μελετήθηκαν επίσης και άλλα χημικά που εμπεριέχουν ύποπτες καρκινογόνες ουσίες. Δεδομένου δε ότι πολλές φορές χρησιμοποιούνται συνδυασμοί χημικών ουσιών, ελέγχθησαν πειραματικά συνδυασμοί κυρίως φυτοφαρμάκων για τη γενοτοξικότητά τους και την τυχόν συνεργιστική ή προσθετική τους δράση.



**Εικόνα 8:** Σχηματική απεικόνιση της μεσόφασης και του κυτταρικού κύκλου.

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 συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρω-

ματιδίων που παρατηρείται στα λεμφοκύτταρα των υπό εξέταση ατόμων. Οι τρανσφεράσες 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 και επομένως έχουν γενετική προδιάθεση ή όχι στην αύξηση της συχνότητας των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων που παρατηρούνται τόσο σε κύτταρα στη μετάφαση, όσο και σε κύτταρα στην G2 φάση του κυτταρικού τους κύκλου.

## 1.2 Γενοτοξικότητα και αξιολόγηση βιολογικής δράσης γενοτοξικών παραγόντων

Η γενοτοξικότητα συνδέεται άμεσα με τη μεταλλαξιγόνο και καρκινογόνο δράση των χημικών ουσιών και των ακτινοβολιών. Τα μεταλλαξιγόνα προκαλούν βλάβες στο DNA και γενετικές αλλαγές που κυμαίνονται από μία έως λίγες βάσεις του DNA (γονιδιακές μεταλλάξεις) μέχρι αισθητές αλλαγές στη δομή των χρωμοσωμάτων (χρωμοσωματικές ανωμαλίες) ή τον αριθμό των χρωμοσωμάτων (ανευπλοειδίες, πολυπλοειδίες). Οι παράγοντες που προκαλούν μεταλλάξεις ονομάζονται μεταλλαξιγόνοι. Υπάρχουν ειδικοί παράγοντες που προκαλούν χρωμοσωματικές ανωμαλίες και ανευπλοειδίες αντίστοιχα. Οι μεταλλαξιγόνοι παράγοντες μπορούν να επιδράσουν τόσο στα σωματικά όσο και στα γεννητικά κύτταρα του ανθρώπου. Στην πρώτη περίπτωση οι επιπτώσεις εμφανίζονται στο ίδιο το άτομο, ενώ στη δεύτερη περίπτωση στους μελλοντικούς απογόνους του.

Οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες και οι ανευπλοειδίες εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου. Οι μηχανισμοί καρκινογένεσης είναι ιδιαίτερα πιο πολύπλοκοι όταν οι παράγοντες που συμβάλλουν στην καρκινογένεση, όπως οι υποκινητές, δεν είναι απαραίτητα και μεταλλαξιγόνοι. Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος της τοξικότητας κατά την έκθεση σε μια χημική ουσία είναι ο τρόπος χορήγησης της ουσίας και η διάρκεια και συχνότητα της έκθεσης. Η χημική ουσία εισέρχεται στο σώμα κυρίως από την αναπνευστική οδό, τον γαστρεντερικό σωλήνα και το δέρμα μετά από άμεση και παρατεταμένη επαφή. Οι χημικές ουσίες έχουν αναστρέψιμες, αλλά και μη αναστρέψιμες επιδράσεις. Αναστρέψιμες μπορεί να είναι οι επιδράσεις σε ιστούς που αναγεννούνται, όπως τα ηπατικά κύτταρα, σε αντίθεση με μη αναστρέψιμες καταστάσεις όπως η τερατογένεση και ορισμένοι τύποι καρκίνου.

## 1.3 Λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ως κυτταρικό σύστημα αναφοράς και ελέγχου γενοτοξικότητας

Η καλλιέργεια των λεμφοκυττάρων αποτελεί ένα σημαντικό βιολογικό σύστημα για τον έλεγχο των γενετικών επιπτώσεων διαφόρων παραγόντων *in vitro*. Τεράστια ώθηση στον τομέα της Κυτταρογενετικής και της *in vitro* καλλιέργειας ανθρωπίνων λεμφοκυττάρων δόθηκε με την ανακάλυψη ότι ορισμένες ουσίες διεγείρουν τα λεμφοκύτταρα ενός δεδομένου τύπου ώστε να πολλαπλασιασθούν.

Συγχρόνως αναπτύχθηκαν και πολύ καλές τεχνικές για την προετοιμασία χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων από τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Τόσο οι δομικές, όσο και οι αριθμητικές αλλοιώσεις των χρωμοσωμάτων έχουν συσχετιστεί με την υγεία, τα γενετικά σύνδρομα και τις νεοπλασίες και γενικά με την καρκινογένεση. Η αυθόρμητη συχνότητα των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων ανέρχεται περίπου στο 0,6% των γεννήσεων. Χρωμοσωμικές αναλύσεις σε αυτόματες εκτρώσεις έδειξαν επίσης ότι το 50% αυτών παρουσίαζαν χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Επιπλέον, αρκετές υπολειπόμενες ασθένειες όπως η ataxia telangiectasia (TA), η αναιμία Fanconi (FA) και το σύνδρομο bloom (BS) σχετίζονται με αυξημένη χρωμοσωμική αστάθεια.

Τα λεμφοκύτταρα με βάση τα λειτουργικά τους χαρακτηριστικά και την προέλευση τους χωρίζονται σε δύο βασικούς τύπους, τα Τ λεμφοκύτταρα και τα Β λεμφοκύτταρα. Τα Τ και Β λεμφοκύτταρα, που έχουν ωριμάσει στα κεντρικά λεμφικά όργανα και δεν έχουν συναντήσει ακόμα κάποιο αντιγόνο, ονομάζονται μη ευαισθητοποιημένα λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά κυκλοφορούν συνεχώς από το αίμα στους περιφερικούς λεμφικούς ιστούς στους οποίους εισέρχονται μέσω των τριχοειδών. Ο αριθμός των λεμφοκυττάρων ανά μονάδα αίματος εξαρτάται από την ηλικία, με την υψηλότερη τιμή να εντοπίζεται στα νεογέννητα και τα παιδιά. Στους ενήλικες το 60-70% των λεμφοκυττάρων είναι τύπου Τ και το 10-15% είναι τύπου Β.

Στις *in vitro* καλλιέργειες των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων χρησιμοποιείται ως μιτογόνος ουσία συνήθως η φυτοαιματογλουτινίνη (PHA), μια πρωτεΐνη λεκτίνης που προέρχεται από τα κόκκινα φασόλια του είδους *Phaseolus vulgaris* και διεγείρει κυρίως τα Τ λεμφοκύτταρα. Τα περισσότερα λεμφοκύτταρα στην έναρξη της καλλιέργειας βρίσκονται στην G0 φάση του κυτταρικού κύκλου. Κατά την καλλιέργεια *in vitro* με την επίδραση της φυτοαιματογλουτινίνης τα Τ λεμφοκύτταρα επανέρχονται στον κυτταρικό κύκλο (G1, S, G2 και μίτωση). Έχειδειχθεί ότι οι ιονίζουσες ακτινοβολίες προκαλούν χρωμοσωματικού τύπου ανωμαλίες στην G0 και G1 φάση, χρωμοσωμικές και χρωματιδικές ανωμαλίες στην S φάση και χρωματιδικές ανωμαλίες στην G2 φάση. Στην περίπτωση χημικών μεταλλαξιγόνων οι περισσότερες ανωμαλίες είναι χρωματιδικού τύπου. Οι παράγοντες που δρουν στην S φάση προκαλούν κατά κανόνα μεγάλη αύξηση στη συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων.

#### **1.4 Η κλασική κυτταρογενετική μέθοδος ανάλυσης ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων**

Το φαινόμενο των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων παρατηρήθηκε πρώτη φορά το 1938 από την McClintock κατά την εξέταση δακτυλιωτών χρωμοσωμάτων στο *Zea mays*. Μετά από 20 χρόνια, το φαινόμενο εξετάστηκε πειραματικά από τον Taylor και τους συνεργάτες του οι οποίοι χρησιμοποίησαν την αυτοραδιογραφική τεχνική σε χρωμοσώματα ακραίων ριζικών κυττάρων του *Vicia faba*. Η χρήση της αυτοραδιογραφίας στην επίδειξη των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων βασίζεται στην ενσωμάτωση του ισοτόπου τριτιωμένη θυμιδίνη ( $^3\text{H}$ -θυμιδίνη) για ένα κύκλο αντιγραφής του DNA. Ο Latt, 16 χρόνια αργότερα, εισήγαγε μια μη ραδιενεργή τεχνική χρώσης για την απεικόνιση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων. Σύντομα η τεχνική αυτή τροποποιήθηκε από τους

Perry και Wolff, οι οποίοι χρησιμοποίησαν ένα χημικό ανάλογο της θυμιδίνης, τη 5-βρωμοδεσοξουριδίνη (BrdU), εισάγοντας τη μέθοδο που είναι γνωστή ως Fluorescence plus Giemsa (FPG). Η μέθοδος FPG βασίζεται στην ενσωμάτωση της BrdU σε δύο συνεχείς κύκλους αντιγραφής του DNA. Μετά από χρώση με φθορίζουσα χρωστική Hoechst 33258 και Giemsa, κάθε χρωμόσωμα αποτελείται από ένα χρωματίδιο αγνά χρωματισμένο και ένα χρωματίδιο έντονα χρωματισμένο. Οι ανταλλαγές ανάμεσα στα διαφορετικά χρωματισμένα αδελφά χρωματίδια είναι ορατές με σαφήνεια με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου. Παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός της δημιουργίας των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων δεν είναι γνωστός, γνωρίζουμε ότι περιλαμβάνει σπάσιμο και επανένωση των δίκλωνων τμημάτων του DNA. Ένας μεγάλος αριθμός ρηγμάτων κατά τη διάρκεια της S φάσης θα οδηγήσει σε μεγάλο αριθμό ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων.

Αυξημένη συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων εμφανίζεται σε διάφορες ασθένειες όπως στο σύνδρομο Bloom και στην πολλαπλή σκλήρωση. Οι ασθενείς με μελανοχρωματική ξηροδερμία είναι υπερευαίσθητοι στην υπεριώδη ακτινοβολία και στους αλκυλιωτικούς παράγοντες. Εντούτοις, δεν έχει βρεθεί συσχέτιση στην επιδιορθωτική ικανότητα των κυττάρων των ασθενών αυτών και στην επαγωγή των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων. Είναι ενδιαφέρον ότι η συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση των μεταλλάξεων στο γενετικό τόπο HPRT, κατά την έκθεση των κυττάρων σε χημικές ουσίες που προκαλούν διαφορετικές βλάβες στο DNA. Εντούτοις είναι δύσκολο να ανιχνεύσουμε ποιοι τύποι αλλοιώσεων είναι υπεύθυνοι για τον σχηματισμό των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων ώστε να κατανοήσουμε καλύτερα τους μοριακούς μηχανισμούς επαγωγής τους. Οι ανταλλαγές των αδελφών χρωματιδίων θεωρούνται ως δείκτης τόσο της βλάβης του DNA όσο και της επιδιορθωτικής ικανότητας των κυττάρων. Για τον λόγο αυτό, η συχνότητα ανταλλαγής αδελφών χρωματιδίων που προκύπτει από την ανάλυση μεταφασικών κυττάρων έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για τον έμμεσο έλεγχο της γενετοξικής δράσης μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων περιβαλλοντικών παραγόντων. Η κλασική μέθοδος ανάλυσης των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων *in vitro* που διεξάγεται σε κύτταρα που βρίσκονται στη μετάφαση της δεύτερης μιτωτικής διαίρεσης, δεν συμπεριλαμβάνει εντούτοις κύτταρα που έχουν καθυστερήσει π.χ. στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου λόγω της έκθεσής τους σε γενετοξικούς παράγοντες. Συνεπώς, η εκτίμηση της συχνότητας των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων είναι αδύνατο να πραγματοποιηθεί μετά από έκθεση σε υψηλές δόσεις ενός γενετοξικού παράγοντα, διότι τα περισσότερα κύτταρα καθυστερούν στην G2 φάση του κυτταρικού τους κύκλου.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης η πειραματική σχεδίαση επικεντρώνεται στην ανάλυση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων όχι μόνο στη μετάφαση αλλά και στη μεσόφαση με στόχο την κατανόηση των μηχανισμών δράσης πιθανών γενετοξικών και καρκινογόνων παραγόντων, καθώς και των αποκλίσεων των αποτελεσμάτων που παρατηρούνται σε διαφορετικά εργαστήρια και που πιθανά οφείλονται σε μεθοδολογικούς ή βιολογικούς παράγοντες. Για τον λόγο αυτό αναπτύχθηκε μια νέα μεθοδολογία για την ανάλυση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων σε λεμφοκύτταρα του περιφερικού στην G2 φάση του κυτταρικού τους κύκλου σε μεσοφασικά κύτταρα. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον έλεγχο της γενετοξικής δράσης ύποπτων μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων ουσιών και γεωργικών φαρμάκων ακόμη και μετά από έκθεση λεμφοκυττάρων σε υψηλές συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών που κατά κανόνα καθυστερούν τα κύτταρα στην G2 φάση του κυτταρικού τους κύκλου.

## 1.5 Η αναγκαιότητα για την ανάπτυξη νέας κυτταρογενετικής μεθόδου εκτίμησης γενοτοξικότητας παραγόντων που προκαλούν καθυστέρηση στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου.

Η ανάλυση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων (Sister Chromatid Exchanges, SCEs), σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων *in vitro*, είναι ένας ευαίσθητος κυτταρογενετικός δείκτης για τον έλεγχο της μεταλλαξιγένου και της γενοτοξικής δράσης διαφόρων χημικών ουσιών. Η κλασική μέθοδος ανάλυσης των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων στη μετάφαση εμφανίζει εντούτοις δύο βασικά μειονεκτήματα. Το πρώτο είναι ότι δεν μας επιτρέπει να μελετήσουμε τη δράση υψηλών συγκεντρώσεων γενοτοξικών παραγόντων. Ο λόγος είναι ότι, μετά από έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις γενοτοξικών παραγόντων, τα περισσότερα κύτταρα καθυστερούν ή ακόμη και σταματούν στην G2 φάση του κυτταρικού τους κύκλου. Το δεύτερο μειονέκτημα σχετίζεται με την ευαισθησία της μεθόδου και το γεγονός ότι η αυθόρμητη συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων διαφέρει από άτομο σε άτομο ή ακόμη και από μελέτη σε μελέτη όταν προσδιορίζεται με την κλασική μέθοδο ανάλυσης. Ένας από τους παράγοντες, παραδείγματος χάρη, που αυξάνουν τη συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων, και μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις σε μεγαλύτερο βαθμό από τη χημική ουσία που εξετάζουμε, είναι η συγκέντρωση αυτής καθ' εαυτής της βρωμοδεοξυουριδίνης που χρησιμοποιείται απαραίτητως στη μεθοδολογία για την ανίχνευση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων. Η νέα μεθοδολογία που χρησιμοποιούμε μας επιτρέπει να αναλύσουμε τις συχνότητες των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων ανεξάρτητα σε μεταφασικά και σε συμπυκνωμένα χρωμοσώματα της G2 φάσης και να ελέγξουμε που οφείλονται οι διαφορές που παρατηρούμε.



**Εικόνα 9:** Επαγωγή πρόωρης χρωμοσωματικής συμπίκνωσης με τη μέθοδο της κυτταρικής σύντηξης λεμφοκυττάρων και μιτωτικών της σειράς CHO. Τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα στο περιφερικό αίμα (φάση G<sub>0</sub>) έχουν 46 μονοχρωματιδιακά χρωμοσώματα

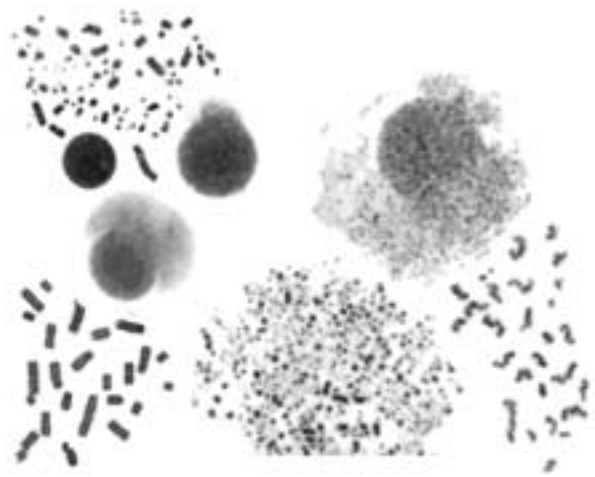


**Εικόνα 10:** Επαγωγή πρόωρης χρωμοσωματικής συμπίκνωσης με τη μέθοδο της κυτταρικής σύντηξης G<sub>0</sub> λεμφοκυττάρων και μιτωτικών της σειράς CHO. Τα λεμφοκύτταρα στο περιφερικό αίμα παρουσιάζουν εμφανείς χρωμοσωματικές αλλοιώσεις μετά την έκθεσή τους σε γενοτοξικούς παράγοντες.





**Εικόνα 11:** Επαγωγή πρόωρης χρωμοσωματικής συμπτύκνωσης με τη μέθοδο της κυτταρικής σύντηξης λεμφοκυττάρων G2 φάσης και μιτωτικών της σειράς CHO. Τα λεμφοκύτταρα στο περιφερικό αίμα παρουσιάζουν εμφανείς χρωματιδικές αλλοιώσεις μετά την έκθεσή τους σε γενotoξικούς παράγοντες.



**Εικόνα 12:** Επαγωγή πρόωρης χρωμοσωματικής συμπτύκνωσης με χρήση ενός ισχυρού αναστολέα των φωσφατασών τύπου 1 και 2A, της καλικουλίνης-A. Στην εικόνα παρουσιάζονται ο αποπολυμερισμός της πυρηνικής μεμβράνης και χρωμοσώματα σε όλες τις φάσεις της μεσόφασης

Η νέα μεθοδολογία βασίζεται αρχικά στην κυτταρική σύντηξη και στην επαγωγή πρόωρης χρωμοσωματικής συμπτύκνωσης (PCC).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε ένα απλό πρωτόκολλο για την ανάλυση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων σε λεμφοκύτταρα της G2 φάσης. Η επαγωγή πρόωρης χρωμοσωματικής συμπτύκνωσης γίνεται με τη χρήση της καλικουλίνης-A, ενός ισχυρού αναστολέα των φωσφατασών τύπου 1 και 2A. Η παρατήρηση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων είναι εφικτή στα χρωμοσώματα της G2 φάσης, με βάση κάποιες τροποποιήσεις της τεχνικής Fluorescence-Plus-Giemsa. Η νέα μεθοδολογία φαίνεται ότι είναι πιο ευαίσθητη από την κλασική μέθοδο των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων στη μετάφαση και πιο κατάλληλη για τον εντοπισμό καρκινογόνων ουσιών, οι οποίες λόγω της κυτταροτοξικότητάς τους σταματούν τα κύτταρα στην G2 φάση.



**Εικόνα 13:** Επαγωγή πρόωρης χρωμοσωματικής συμπίκνωσης σε G2 λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος με χρήση της καλικουλίνης-A και χρώση Giemsa. Στην εικόνα παρουσιάζονται εμφανείς χρωματιδικές αλλοιώσεις μετά από έκθεση σε γεντοξικούς παράγοντες



**Εικόνα 14:** Απεικόνιση ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων σε πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα στη G2 φάση του κυτταρικού κύκλου με χρήση καλικουλίνης-A και της μεθόδου FPG. Η απουσία της σύσφιξης των χρωματιδίων στο κεντρομερίδιο είναι χαρακτηριστικό της μορφής των G2 χρωμοσωμάτων όταν γίνεται χρήση της καλικουλίνης-A.

## 1.6 Έλεγχος γεντοξικής δράσης γεωργικών φαρμάκων στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου

Με τη νέα μέθοδο που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ελέγχθηκε και αξιολογήθηκε η γεντοξική δράση ευρέως διαδεδομένων εντομοκτόνων και ζιζανιοκτόνων όπως: Ατραζίνης, Παρακουάτ, Μανέμπ, Δελταμετρίνης, Κουζαλοφόπ, Λινουρόν, καθώς και συνδυασμών τους. Επιπλέον, με τη μέθοδο ανάλυσης ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων στην G2 φάση, αξιολογήθηκε και η γεντοξική δράση της Υδροκινόνης με στόχο την κατανόηση του μηχανισμού δράσης της καρκινογόνου αυτής χημικής ουσίας.

### 1.6.1 Ατραζίνη (Atrazine)

Η έκθεση των ανθρώπων σε γεωργικές χημικές ουσίες όπως τα εντομοκτόνα και τα ζιζανιοκτόνα έχει σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία, όπως καρκίνο και άλλες γενετικές ασθένειες. Τα ζιζανιοκτόνα

της κατηγορίας των τριαζινών, τα οποία χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των ζιζανίων κατά τη διάρκεια καλλιεργειών καλαμποκιού, σταριού, ζαχαροκάλαμων, κωνοφόρων και άλλων, έχουν συσσωρευτεί στην επιφάνεια και στα υπόγεια υδάτινα αποθέματα λόγω της διαδεδομένης χρήσης τους στη γεωργία και της χαμηλής τους διαλυτότητας στο νερό. Η ατραζίνη, η πιο διαδεδομένη ουσία της κατηγορίας των τριαζινών, βρίσκεται στα αγροτικά υπόγεια ύδατα και σε διάφορα τρόφιμα όπως το καλαμπόκι, οι ξηροί καρποί, τα φρούτα, το σάρι. Για την εκτίμηση της μεταλλαξιογόνου και γενοτοξικής δράσης της ατραζίνης έχουν γίνει πολλές μελέτες με διαφορετικά συστήματα ελέγχου σε βακτήρια, ευκαρυωτικά κύτταρα και ιστούς. Η πλειοψηφία των μελετών έχει δείξει αρνητική δράση, αλλά υπάρχουν και θετικά αποτελέσματα, όπως η δημιουργία όγκων του μαστού σε θηλυκά ποντίκια της σειράς Sprague-Daley. Η Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ κατέταξε αρχικά την ατραζίνη στα πιθανά ανθρώπινα καρκινογόνα, ενώ πρόσφατα προτάθηκε η επανεκτίμηση της πιθανής μεταλλαξιογόνου και καρκινογόνου δράσης της.

Η ατραζίνη ανήκει στην τάξη των s-τριαζινών και είναι το δεύτερο πιο διαδεδομένο ζιζανιοκτόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες. Οι φαρμακολογικές και τοξικολογικές ιδιότητες της ατραζίνης έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό και έχει δημοσιευθεί μια βάση δεδομένων που αναφέρεται στη γενοτοξικότητα της συγκεκριμένης ουσίας. Η ατραζίνη, σε πληθώρα ισομορφών και συνδυασμών, έχει ελεγχθεί ως προς τη μεταλλαξιογόνου της δράση από το 1966. Τα δεδομένα που έχουν προκύψει σχετικά με τη γενοτοξικότητα της ουσίας δεν παρουσιάζουν ομοφωνία. Σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή Προστασίας από Περιβαλλοντικά Μεταλλαξιογόνα και Καρκινογόνα και με βάση τα υπάρχοντα κριτήρια, η ατραζίνη δεν μπορεί ακόμα να κατηγοριοποιηθεί στα μεταλλαξιογόνα ή στα μη μεταλλαξιογόνα. Οι έρευνες σχετικά με τη συνδυασμένη έκθεση ανθρώπινων λεμφοκυττάρων και κυττάρων ποντικών σε ατραζίνη και linuron δείχνουν ότι οι ουσίες δρουν συνεργιστικά ως προς τη δημιουργία ρηγμάτων, ενώ στην ίδια έρευνα δείχθηκε ότι η ατραζίνη μόνη της δε δημιουργεί ρήγματα. Η Διεθνής Υπηρεσία Έρευνας κατά του Καρκίνου κατέταξε αρχικά (1991) την ατραζίνη στα πιθανά καρκινογόνα (κατηγορία 2B) με αποτέλεσμα να απαγορευθεί η χρήση της σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες. Αργότερα (1999) η ατραζίνη επανεκτιμήθηκε και κατατάχθηκε στην κατηγορία 3, όπου ανήκει και η σιμαζίνη.

Καθώς υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι η ατραζίνη προκαλεί βλάβες στο DNA, η εκτίμηση της μεταλλαξιογόνου δράσης της ατραζίνης έχει γίνει τόσο σε *in vitro*, όσο και σε *in vivo* μελέτες με το σύστημα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων, ενός ευαίσθητου δείκτη της επιδιορθωτικής ικανότητας του κυττάρου με ομόλογο ανασυνδυασμό. Με την κλασική μεθοδολογία, η εκτίμηση της συχνότητας των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σε υψηλές δόσεις της ουσίας γιατί τα κύτταρα σταματούν στην G2 φάση και δεν προχωρούν στη μετάφαση. Για να ξεπεραστεί η δυσκολία αυτή και να εκτιμηθεί η δράση της ατραζίνης σε υψηλές συγκεντρώσεις, χρησιμοποιήθηκε η νέα κυτταρογενετική μέθοδος που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης για την ανάλυση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων στην G2 φάση, κατά την καλλιέργεια ανθρώπινων λεμφοκυττάρων *in vitro*. Η μεθοδολογία βασίζεται στον πρόωρο σχηματισμό συμπυκνωμένων χρωμοσωμάτων (premature chromosome condensation, PCC) με τη χρήση της καλικουλίνης-A, ενός ισχυρού αναστολέα των φωσφατασών τύπου 1 και 2A και στην παρατήρηση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων στην G2 φάση, με κάποιες τροποποιήσεις της τεχνικής Fluorescence-Plus-Giemsa. Αυτή η νέα κυτταρογενετική μέθοδος μας επιτρέπει να ελέγξουμε αν οι υψηλές συγκεντρώ-

σεις της ατραζίνης προκαλούν δόσοεξαρτώμενη αύξηση στη συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων κατά την G2 φάση, στην οποία έχουν σταματήσει τα κύτταρα.

### 1.6.2 Παρακουάτ (Paraquat)

Μια άλλη κατηγορία ζιζανιοκτόνων η οποία χρήζει ιδιαίτερης προσοχής είναι η ομάδα bipyridyl και ιδιαίτερα το ζιζανιοκτόνο παρακουάτ. Η σύνθεση του παρακουάτ έγινε για πρώτη φορά το 1882, εντούτοις οι ζιζανιοκτόνες ιδιότητές του δεν είχαν ανακαλυφθεί έως το 1959. Η χημική αυτή ουσία είναι μια από τις πλέον γνωστές τοξικές ουσίες του αναπνευστικού συστήματος και είναι αντικείμενο εντατικής έρευνας, καθ' ότι οι βλαβερές επιπτώσεις της στην υγεία έχουν ήδη αρχίσει να διαφαίνονται. Σε περιπτώσεις δηλητηρίασης από τη χημική αυτή ουσία έχει παρατηρηθεί υψηλός δείκτης θνησιμότητας. Σε πολλές χώρες έχει ήδη απαγορευτεί η χρήση της ένωσης παρακουάτ, ή χρησιμοποιείται με πολύ αυστηρές προϋποθέσεις, λόγω των καταστρεπτικών επιπτώσεων στην υγεία και των κινδύνων που εγκυμονεί η τυχόν έκθεση ατόμων του πληθυσμού στη χημική αυτή ουσία. Επίσης, λόγω του μεγάλου αριθμού ατυχημάτων και αυτοκτονιών που έχουν αναφερθεί και που εμπλέκεται άμεσα η χημική αυτή ουσία. Εντούτοις, η χημική ένωση παρακουάτ χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα σε 130 χώρες. Στην Ταϊβάν το παρακουάτ ενοχοποιείται για το 54% των δηλητηριάσεων από φυτοφάρμακα που παρατηρήθηκαν μεταξύ των ετών 1985 και 1993 και η τοξικότητα της κατηγορίας αυτής των φυτοφαρμάκων δεν θα πρέπει να αγνοηθεί. Το παρακουάτ είναι ένωση υψηλής πολικότητας και απορροφάται ελάχιστα από την γαστροεντερική οδό. Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι το 52% της χορηγηθείσας δόσης εντοπίζεται τοπικά στην εντερική οδό ακόμη και 32 ώρες μετά τη χορήγηση. Απορροφάται δηλαδή περίπου το 5-10% της δόσης που δεν έχει χωνευτεί. Το παρακουάτ έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πολλά μέρη του κόσμου σε απόπειρες αυτοκτονιών. Οι τοξικές δηλητηριάσεις από παρακουάτ μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: α) δηλητηρίαση από τυχαία ή σκόπιμη κατάποση παρασκευάσματος με συγκέντρωση μέχρι 20% των ενεργών συστατικών και β) λειτουργικές δηλητηριάσεις, μετά από δερματική έκθεση ή / και εισπνοή διαλύματος σε μορφή σπρέι. Η κατάποση του εμπορικού σκευάσματος του παρακουάτ οδηγεί σε αναπόφευκτο θάνατο μέσα σε 3-4 εβδομάδες. Χαρακτηριστικά συμπτώματα της δηλητηρίασης είναι: αρχικά ερεθισμός και αίσθημα καύσου στο στόμα και τον οισοφάγο, νέκρωση του βλενογόνου του οισοφάγου, σοβαρή γαστρεντερίτιδα με οισοφαγική και γαστρεντερική λοίμωξη, κοιλιακά και θωρακικά άλγη και αίμα στα κόπρανα. Στη συνέχεια επικρατούν τα πνευμονικά συμπτώματα, δύσπνοια, ανοξία, σκιάσεις σε ακτινογραφίες στους πνεύμονες, προοδευτική ίνωση, κόμα και θάνατος. Παρόλο που οι πνευμονικές λοιμώξεις είναι οι πιο απειλητικές για τη ζωή του ασθενούς, το παρακουάτ προκαλεί δηλητηρίαση σε πολλαπλά όργανα επιφέροντας νεκρώσεις στο ήπαρ, στους νεφρούς και στο μυοκάρδιο, μαζί με εκτεταμένα αιμορραγικά επεισόδια σε όλο το σώμα. Αν και οι περισσότερες δηλητηριάσεις με παρακουάτ έχουν προέλθει μετά από κατάποση της ουσίας, εντούτοις υπάρχουν και αναφορές για δηλητηρίαση μετά από δερματική έκθεση, με φλύκταινες και ερύθημα. Τα Εθνικά Κέντρα αντιμετώπισης δηλητηριάσεων αναγνωρίζουν όλο και περισσότερο ότι θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω η γεντοξική δράση της ουσίας αυτής, ώστε τα δεδομένα που θα προκύψουν να λαμβάνονται υπόψη στη λήψη κρίσιμων αποφάσεων. Ένα θέμα στο οποίο εστιάζεται το επιστημονικό ενδιαφέρον αυτή τη στιγμή είναι η εκτίμηση της ανθρώπινης έκθεσης σε περιβαλλοντικούς γεντοξικούς παράγοντες. Η γνώση της επίπτωσης της ανθρώπινης έκθεσης σε παράγοντες πιθανώς απειλητικούς για τη δημόσια υγεία είναι κρίσιμη

σημασίας για μια επιτυχημένη και επιστημονικά τεκμηριωμένη προσέγγιση εκτίμησης των κινδύνων που απειλούν την ανθρώπινη υγεία. Δυστυχώς, οι πληροφορίες που έχουμε ως τώρα δεν επαρκούν για την αναγνώριση του είδους, του προτύπου και του μεγέθους της ανθρώπινης έκθεσης σε χημικές ουσίες, είτε μέσω της τροφής, είτε στον εργασιακό ή στον περιβάλλοντα χώρο.

### 1.6.3 Μανέμπ (Maneb)

Το Μανέμπ, ethylene-bis-di-thio-carbonate μυκητοκτόνο παράγωγο του μαγγανίου, χρησιμοποιείται εκτεταμένα στη γεωργία για την καταπολέμηση ασθενειών σε σοδειές βασικών προϊόντων. Η πιθανή γενετοξικότητα του μανέμπ έχει εκτιμηθεί με διάφορα συστήματα ελέγχου. Αρνητικά ή θετικά αποτελέσματα έχουν εξαχθεί με το Ames test με ή χωρίς την ανάμειξη S9. Ωστόσο, δεν έχουν γίνει καθόλου μελέτες για την επίδραση του μανέμπ στη συχνότητα ανταλλαγής αδελφών χρωματιδίων (SCE). Σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί *in vitro* και *in vivo* σε κύτταρα θηλαστικών παρατηρήθηκε μικρή μόνο αύξηση των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων.

Προκειμένου να εκτιμήσουμε τις μεταλλαξιγόνες και κλαστογόνες (clastogenic) επιπτώσεις του εμπορικού σκευάσματος του μανέμπ *in vitro*, εξετάσαμε τη συχνότητα ανταλλαγής αδελφών χρωματιδίων μετά από έκθεση για 24 και 48 ώρες καλλιέργειών λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος. Στην παρούσα μελέτη το μυκητοκτόνο χορηγήθηκε *in vitro* με τρόπο ώστε να αναπαραγάγει έναν πιθανό μοντέλο για να εκτιμήσουμε τη φυσική μόλυνση στο εργασιακό περιβάλλον και οι συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν με βάση αυτές που χρησιμοποιούνται στους αγρούς σε πραγματικές καλλιέργειες.

### 1.6.4 Δελταμεθρίνη (Deltamethrin)

Τα τελευταία χρόνια, πολύ ενδιαφέρον και ένα μεγάλο μέρος της βιβλιογραφίας έχουν αφιερωθεί στη μελέτη της γενετοξικής δράσης χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στη γεωργία ως φυτοφάρμακα ή παρασιτοκτόνα. Για να ερευνησουμε περαιτέρω το πρόβλημα αυτό, επιλέξαμε στην παρούσα εργασία τη νέα κυτταρογενετική μέθοδο ανάλυσης ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων (SCEs) σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος που αναπτύξαμε για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της έκθεσης στους χημικούς αυτούς παράγοντες. Η κλασική μέθοδος ανάλυσης SCEs έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την *in vitro* μελέτη της γενετοξικότητας παρασιτοκτόνων σε κύτταρα θηλαστικών. Είναι γνωστό ότι το εντομοκτόνο Δελταμεθρίνη δεν φαίνεται να είναι μεταλλαξιγόνο σύμφωνα με τις συμβατικές μεθόδους ανάλυσης. Εντούτοις, είναι δυνατό να προκαλέσει χρωμοσωμική και χρωματιδική θραύση *in Allium cepa*. Ως κοινό εντομοκτόνο η δελταμεθρίνη προκαλεί μέτρια αύξηση σε SCEs. Οι επιπτώσεις της δελταμεθρίνης και των αναμειξιών της με παρασιτοκτόνα βρέθηκαν να είναι διαφορετικές όταν χρησιμοποιούνταν λεμφοκύτταρα από διαφορετικά άτομα, όμως αυτές οι διαφορές δεν αξιολογούνται ως στατιστικά σημαντικές. Επιπρόσθετα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις δελταμεθρίνης δεν είχαμε αύξηση των SCEs ακόμα και σε μεμονωμένες μελέτες. Υπάρχει εντούτοις μια αναφορά από την Ιταλία η οποία έδειξε ότι εργάτες που είχαν εκτεθεί σε παρασιτοκτόνα σε ανθοκαλλιέργειες παρουσίασαν σημαντική αύξηση σε SCEs στα λεμφοκύτταρα. Επίσης, έκθεση κυτταροκαλλιέργειών σε δελταμεθρίνη εμπόδισε τον δείκτη μίτωσης σε βαθμό ανάλογο με την ποσότητα της

δόσης και αύξησε τη συχνότητα χρωμοσωμικών αλλοιώσεων σε λεμφοκύτταρα και σε μυελό των οστών 24 ώρες μετά την έκθεση, παρουσιάζοντας έτσι ενδείξεις πιθανής γενετοξικής δράσης. Η αυξημένη συχνότητα χρωμοσωμικών αποκλίσεων και η παρουσία μικροσπυρήνων σε ερυθροκύτταρα ενισχύουν την άποψη ότι η δελταμεθρίνη έχει και κλαστογόνο δράση. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν την ανάγκη για περαιτέρω *in vitro* μελέτη της γενετοξικής δράσης της δελταμεθρίνης.

### 1.6.5 Κουζαλοφόπ (Quizalofop)

Χρησιμοποιώντας κλασικές μεθοδολογίες, οι επιπτώσεις του κουζαλοφόπ, που χρησιμοποιείται ευρέως ως εντομοκτόνο, και των αναμειξεών του με παρασιτοκτόνα διέφεραν ανάλογα με τα άτομα που εξετάζονταν. Οι διαφορές αυτές δεν αξιολογούνται ως στατιστικά σημαντικές και βάσει της κλασικής μεθόδου ανάλυσης ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων, το κουζαλοφόπ προκαλεί μια ήπια αύξηση σε SCEs. Εντούτοις, η έκθεση κυτταροκαλλιιεργειών στο κουζαλοφόπ επηρεάζει τον μιτωτικό δείκτη και επομένως κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη της γενετοξικής δράσης της χημικής αυτής ουσίας με τη νέα μέθοδο ανάλυσης της ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων σε κύτταρα που έχουν σταματήσει στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου, την οποία αναπτύξαμε στο πλαίσιο της μελέτης αυτής.

### 1.6.9 Λινουρόν (Linuron)

Αρκετά πειράματα έχουν γίνει μέχρι σήμερα, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, και υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για να μελετηθεί η γενετοξική δράση και οι τυχόν μεταλλαξιγόνες επιπτώσεις της χημικής ουσίας λινουρόν, ιδιαίτερα όταν συνδυάζεται με ατραζίνη, που εντοπίζονται σε ορισμένες χώρες στα υπόγεια ύδατα ή ακόμη και στο πόσιμο νερό. Καλλιέργειες λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος από διαφορετικά άτομα έχουν εκτεθεί σε διαφορετικές συγκεντρώσεις λινουρόν και αναμειξεών του με παρασιτοκτόνα. Εντούτοις, τα αποτελέσματα και οι επιπτώσεις που προέκυψαν χρησιμοποιώντας κλασικές μεθόδους ανάλυσης δεν αξιολογούνται ως στατιστικά σημαντικές. Τα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα που εκτέθηκαν *in vitro* είτε σε 1 microgram/ml λινουρόν, είτε σε 0,001 microgram/ml ατραζίνης δεν έδειξαν σημαντικές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, ενώ σημαντικές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν σε λεμφοκύτταρα που εκτέθηκαν ταυτόχρονα σε 0,5 microgram/ml λινουρόν και 0,0005 microgram/ml ατραζίνης, υποδεικνύοντας την προσθετική τους δράση. Εντούτοις, σε υψηλές συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών επηρεάζεται δραματικά ο μιτωτικός δείκτης και η ανάλυση καθίσταται αδύνατη όταν χρησιμοποιούνται αποκλειστικά οι κλασικές κυτταρογενετικές μέθοδοι. Επομένως, στο πλαίσιο της μελέτης αυτής, κρίθηκε απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη της γενετοξικής δράσης των χημικών αυτών ουσιών με τη νέα μέθοδο ανάλυσης της ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων σε κύτταρα που έχουν σταματήσει στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου.

### 1.6.7 Τριχλωροαιθυλένιο

Το τριχλωροαιθυλένιο που χρησιμοποιείται ευρέως ως οργανικός διαλύτης στη βιομηχανία, στην

υφαντουργία και στο στεγνό καθάρισμα, ενώ αποτελεί συστατικό μίας σειράς καταναλωτικών προϊόντων όπως τα καθαριστικά υφασμάτων και τα απολυμαντικά. Το τριχλωροαιθυλένιο χωρίς εποξειδικούς σταθεροποιητές είναι μεταλλαξιογόνο σε βακτήρια, σε ζύμες και σε μύκητες, μετά από μεταβολική ενεργοποίηση. Το τριχλωροαιθυλένιο, δοκιμάστηκε εκτεταμένα με εισπνοή και με χορήγηση από το στόμα σε ποντίκια και αρουραίους. Χαρακτηρίζεται ως καρκινογόνο σε ποντίκια, προκαλώντας με αυξημένες συχνότητες όγκους του ήπατος και του πνεύμονα. Σε αρουραίους, το τριχλωροαιθυλένιο προκάλεσε αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης αδenoκαρκινωμάτων των νεφρικών σωληνοειδών κυττάρων. Στον άνθρωπο, οι μαρτυρίες για καρκινογένεση μετά από επαγγελματική έκθεση σε τριχλωροαιθυλένιο δεν είναι επαρκείς ενώ είναι περιορισμένες οι *in vitro* μελέτες σε ανθρώπινα κύτταρα.

### 1.6.8 Τετραχλωροαιθυλένιο

Το τετραχλωροαιθυλένιο χρησιμοποιείται μαζί με το τριχλωροαιθυλένιο ως διαλύτης στη βιομηχανία και στο βιομηχανικό καθάρισμα μετάλλων, ενώ απαντάται στη σύσταση μίας σειράς καταναλωτικών προϊόντων όπως τα καθαριστικά υφασμάτων και τα απολυμαντικά. Χαρακτηρίζεται ως καρκινογόνο σε ποντίκια, προκαλώντας με αυξημένες συχνότητες όγκους του ήπατος και του πνεύμονα αλλά στον άνθρωπο η καρκινογόνος δράση του μετά από επαγγελματική έκθεση δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη. Σε μία μελέτη σε λεμφοκύτταρα εκτιθέμενων ατόμων σε τετραχλωροαιθυλένιο, δεν παρατηρήθηκε επαγωγή χρωμοσωματικών ανωμαλιών αλλά ούτε αύξηση του αριθμού ανταλλαγής αδελφών χρωματίδων. Ωστόσο, σε άλλη μελέτη βρέθηκαν κάποιες ενδείξεις για πρόκληση βλαβών του DNA σε ποντίκια *in vivo*.

Η γλουταραλδεΐδη που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την υδροκινόνη στη σύσταση των εμφανιστικών υγρών στα ακτινολογικά εργαστήρια (εμφάνιση φωτογραφιών ακτίνων-X). Για το λόγο αυτό, η δράση της γλουταραλδεΐδης, θα μελετηθεί και σε συνδυασμό με τη δράση της υδροκινόνης παρουσία ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

### 1.6.9 4-υδροξύ βενζοϊκό οξύ

Το 4-υδροξύ βενζοϊκό οξύ (methyl paraben, παράγωγα του p-υδροξύ βενζοϊκού οξέος) που ενσωματώνονται σε μία πληθώρα καλλυντικών παρασκευασμάτων και χρησιμοποιούνται ευρέως ως συντηρητικά προσθετικά τροφίμων. Αν και οι χημικές αυτές ενώσεις παραμένουν ακατάταχτες από τις IARC και ACGIH ως προς την ικανότητά τους για καρκινογένεση, και οι μεταλλαξιογόνος δράση τους δεν έχει διευκρινιστεί, πρόσφατες έρευνες, συνηγορούν υπέρ της πιθανής συμβολής των ενώσεων αυτών στη δημιουργία καρκίνου του μαστού. Τα συμπεράσματα αυτά, διεξήχθησαν μετά από αντίχνευση εστέρων του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος (κυρίως μέθυλο-παραβένες) σε 20 διαφορετικούς όγκους προερχόμενους από ανθρώπινο μαστό.

### 1.6.10 2- υδροξυ-1,4-ναφθοκινόνη

Η χημική ουσία Lawsone (2- υδροξυ-1,4-ναφθοκινόνη, Henna) που χρησιμοποιείται στις βαφές μαλλιών. Σε πειράματα in vivo, η ουσία αυτή, αποδείχθηκε τοξική για τους νεφρούς, το στομάχι και το αιμοποιητικό σύστημα και μεταλλαξιογόνος σε κύτταρα CHO μετά από μεταβολική ενεργοποίηση. Ωστόσο, οι in vitro μελέτες σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα είναι περιορισμένες.

## 1.7 Έκθεση σε συνδυασμό φυτοφαρμάκων και συχνότητα ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος

Εξαιτίας του μεγάλου φάσματος των χημικών που χρησιμοποιούμε, είναι σημαντικό να μελετάμε τις αλληλεπιδράσεις και τη συνδυασμένη δράση διαφορετικών χημικών ουσιών που χορηγούνται ταυτόχρονα. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των χημικών σχετίζονται με πολλούς φυσιολογικούς μηχανισμούς, όπως η απορρόφηση, η πρόσδεση σε πρωτεΐνες, ο μεταβολισμός και η έκκριση των ουσιών από το σώμα. Η επίδραση δύο χημικών ουσιών, που χορηγούνται ταυτόχρονα, προκαλεί είτε προσθετική απόκριση, είτε μικρότερη ή μεγαλύτερη από την αναμενόμενη με βάση το άθροισμα της δράσης τους. Δύο ουσίες έχουν προσθετική δράση όταν η δράση των δύο ουσιών μαζί έχει το ίδιο αποτέλεσμα με το άθροισμα της δράσης της κάθε ουσίας ανεξάρτητα (π.χ.  $2+3=5$ ). Προσθετική δράση έχουν τα εντομοκτόνα τα οποία, όταν χορηγούνται μαζί, προκαλούν συνήθως προσθετική αναστολή στη δράση της χολινεστεράσης. Συνεργιστική δράση δύο χημικών ουσιών έχουμε όταν οι δύο χημικές ουσίες που χορηγούνται μαζί έχουν πολύ μεγαλύτερη δράση από το άθροισμα της δράσης κάθε ουσίας ανεξάρτητα (π.χ.  $2+2=20$ ). Εν δυνάμει δράση έχουμε όταν μια ουσία δεν έχει τοξικές επιδράσεις σε κάποιο όργανο, αλλά όταν προστιθέμενη σε κάποια τοξική ουσία αυξάνει την τοξικότητα της (π.χ.  $0+2=10$ ). Ανταγωνιστική δράση έχουμε όταν δύο χημικές ουσίες που χορηγούνται μαζί αλληλεπιδρούν με διαφορετικό τρόπο (π.χ.  $4+6=8$ ,  $4+(-4) = 0$ ,  $4+0=1$ ).

Συγχρόνως, με το ίδιο σύστημα, ελέγξαμε τη μεταλλαξιγόνο δράση άλλων διαδεδομένων εντομοκτόνων και ζιζανιοκτόνων, όπως είναι τα Paraquat, Linuron, Quizalofop, Maneb, Deltamethrin.



## 1.8 Αξιολόγηση γενετοξικής δράσης Υδροκινόνης (Hydroquinone) με τη μέθοδο ανάλυσης ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων στην G2-φάση

Η Υδροκινόνη είναι μια καρκινογόνος ουσία που εντοπίζεται στη φύση στο πετρέλαιο και τη βενζίνη και είναι από παλιά γνωστό ότι προκαλεί μυελοτοξικότητα και λευχαιμία στον άνθρωπο. Εντούτοις δεν έχει ακόμα διευκρινισθεί ο μηχανισμός της καρκινογόνου δράσης της υδροκινόνης. Κλινικές παρατηρήσεις μετά από μελέτες καρκινογένεσης σε πειραματόζωα έχουν αποδείξει, πέρα από κάθε αμφιβολία, την αιτιολογική σχέση μεταξύ του βενζολίου και της λευχαιμίας. Το βενζόλιο είναι μια καρκινογόνος ουσία με μεγάλη εξάπλωση η οποία προκαλεί λευχαιμία και αιματοτοξικότητα. Η έκθεση των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων σε μεταβολίτες του βενζολίου έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί γενετικές βλάβες, όπως ανευπλοειδία, χρωμοσωμικές αποκλίσεις καθώς και αύξηση στη συχνότητα ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων. Σε συνδυασμό με την υδροκινόνη έχει, όπως έχει αποδειχθεί, συνεργιστική δράση στη μυελοτοξικότητα και τη γενετοξικότητα στον μυελό των οστών ποντικών. Το βενζόλιο είναι μια αδιαμφισβήτητα καρκινογόνος ουσία που προκαλεί λευχαιμία, αιματοτοξικότητα και πιθανώς λέμφωμα. Η καρκινογόνος του δράση πιθανότατα εξαρτάται από τη μετατροπή του σε φαινόλη και υδροκινόνη, με τη δεύτερη να οξειδώνεται σε υψηλά τοξική 1,4-βενζοκινόνη στον μυελό των οστών. Έχει ήδη αποδειχθεί ότι η έκθεση ανθρώπινων λεμφοκυττάρων και κυτταρικών σειρών στην υδροκινόνη προκαλεί διάφορες μορφές γενετικής βλάβης, όπως ανευπλοειδία και αύξηση ή μείωση του αριθμού των χρωμοσωμάτων. Το βενζόλιο χρησιμοποιούνταν ως διαλυτικό ευρείας χρήσης, αλλά τώρα χρησιμοποιείται κυρίως για τη σύνθεση άλλων χημικών ουσιών. Χρησιμοποιείται ευρύτατα στη βιομηχανία με αποτέλεσμα να μολύνει το περιβάλλον παγκοσμίως και αδιαμφισβήτητα να προκαλεί λευχαιμία στον άνθρωπο και καρκίνο σε διάφορα όργανα σε ζώα, με πιο σημαντική τοξική επίπτωση στην αιμοποιητική λειτουργία.

Η υδροκινόνη έχει αναφερθεί ότι προκαλεί αύξηση στη συχνότητα ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων και πιθανά και άλλοι μεταβολίτες του βενζολίου να επάγουν χρωμοσωματικές αλλοιώσεις στα λεμφοκύτταρα. Οι επαγόμενες ανταλλαγές αδελφών χρωματιδίων, οι μιτωτικοί δείκτες και οι αλλαγές στην κινητική του κυτταρικού κύκλου έχουν καλά μελετηθεί και ποσοτικοποιηθεί μετά από έκθεση ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος σε βενζόλιο, 1,2,4-benzenetriol, υδροκινόνη και 1,4-βενζοκινόνη. Η χρόνια έκθεση σε βενζόλιο μπορεί να προκαλέσει βλάβη στον μυελό των οστών, η οποία αρχικά μπορεί να εκδηλωθεί ως αναιμία, λευκοπενία, θρομβοκυτταροπενία ή και συνδυασμό όλων αυτών. Η καταστολή λειτουργίας του μυελού των οστών φαίνεται να εξαρτάται από τη δόση τόσο στα πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο. Από επιδημιολογικές μελέτες προκύπτουν επίσης ισχυρές αποδείξεις ότι η υψηλού επιπέδου έκθεση σε βενζόλιο έχει ως αποτέλεσμα αυξημένο κίνδυνο για οξεία μυελογενή λευχαιμία στον άνθρωπο. Πράγματι, για ένα σχεδόν αιώνα έχει αναγνωριστεί η αιματοξικότητα του βενζολίου στον άνθρωπο και η χρόνια ή επαναληπτική έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις της ουσίας συμβάλλουν στην εμφάνιση: θρομβοκυτταροπενίας, λεμφοκυτταροπενίας, νεοπλαστικής αναιμίας καθώς και στο σύνδρομο μυελοδυσπλασίας (MDS) και την αύξηση περιστατικών οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (AML). Σε ασθενείς που εκδήλωσαν οξεία μυελογενή λευχαιμία, μετά τη χορήγηση αλκυλιωτικών παραγόντων για την αντιμετώπιση άλλου είδους καρκίνου ή μετά την έκθεση εργαζομένων σε βενζόλιο λόγω του επαγγέλματός τους, εμφανίζεται ένα πρότυπο χρωμοσωμικής αλλοίωσης που κυρίως περιλαμβάνει την απώλεια μέρους ή όλου του χρωμοσώματος

5 ή/και 7. Αντίθετα, η τρισωμία 8 είναι χαρακτηριστική τόσο στην πρωτογενή όσο και στη δευτερογενή οξεία μυελογενή λευχαιμία. Μελέτη σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος έδειξε ότι η απώλεια των χρωμοσωμάτων 5, 7 και 8, μετά από έκθεση στον μεταβολίτη του βενζολίου υδροκινόνη, εξαρτάται από τη δόση. Ανεξάρτητα από τα παραπάνω, μελέτες που έγιναν σε περιφερικά λεμφοκύτταρα ανθρώπων που εκτέθηκαν σε βενζόλιο στην Κίνα έδειξαν ότι η έκθεση σε βενζόλιο προκαλεί αύξηση στην εμφάνιση ανευπλοειδίας και διαγραφή του μακρού στελέχους των χρωμοσωμάτων 5, 7, ενώ οι φαινολικοί μεταβολίτες και η υδροκινόνη έχουν εμπλακεί σε κρούσματα αιματοξικότητας μετά από έκθεση σε βενζόλιο. Στο πλαίσιο της εργασίας αυτής, κρίθηκε απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη της γενοτοξικής δράσης της υδροκινόνης με τη νέα μέθοδο ανάλυσης της ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων σε κύτταρα που έχουν σταματήσει στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου.

## **1.9 Πολυμορφισμός του γονιδίου της τρानσφεράσης της γλουταθειόνης GSTT1 και συχνότητα ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων**

Είναι γνωστό ότι η ευαισθησία των ανθρώπων στη δημιουργία μεταλλάξεων και καρκίνου είναι διαφορετική, ακόμα και όταν εκτίθενται στους ίδιους παράγοντες, και εξαρτάται από το γονότυπο τους. Οι γονότυποι, που είναι υπεύθυνοι για την διαφορετική επιδεκτικότητα στους μεταλλαξιγόνους παράγοντες, σχετίζονται κυρίως με ένζυμα επιδιόρθωσης ή αποτοξικοποίησης και χρησιμοποιούνται συχνά ως βιομάρτυρες. Οι τρानσφεράσες της γλουταθειόνης S (GSTs) είναι μια οικογένεια κυτταροπλασματικών ενζύμων που εμπλέκονται στην αποτοξικοποίηση ενεργών καρκινογόνων. Έχουν χαρακτηριστεί 4 βασικοί τύποι της οικογένειας των GSTs (α, μ, π, τ). Δύο μέλη της οικογένειας, προϊόντα γενετικού πολυμορφισμού, τα γονίδια GSTM1 και GSTT1 εμφανίζουν σε υψηλότερο ποσοστό γονότυπο με ομόζυγο έλλειμμα του φυσιολογικού γονιδίου. Έχει βρεθεί ότι τα ελλείμματα αυτά είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη καρκίνου στους πνεύμονες και την ουροδόχο κύστη. Στην Καυκάσια φυλή, ομόζυγο έλλειμμα GSTM1(μ) εμφανίζεται στο 50% του πληθυσμού, ενώ ομόζυγο έλλειμμα GSTT1(θ) εμφανίζεται στο 20-38% του πληθυσμού. Ο γονότυπος GSTT1 φαίνεται ότι σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα καρκίνου του εγκεφάλου και μυελοδυσπλασίες.

Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε η σχέση του γονότυπου GSTT1 με τη συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων. Δεδομένου ότι ο γονότυπος GSTT1 ποικίλλει ανάμεσα στα άτομα και τους πληθυσμούς, χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA από υγιή άτομα και από ασθενείς με λευχαιμία.

## **1.10 Σκοπός της μελέτης**

Η εκτίμηση της γενοτοξικής δράσης φυσικών και χημικών παραγόντων με κυτταρογενετικές τεχνικές βασίζεται στην παρατήρηση αισθητών αλλαγών που επάγονται στα χρωματοσώματα. Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν αφ' ενός εμφανείς χρωμοσωματικές θραύσεις και αναδιατάξεις χρωμοσωματι-

κών τμημάτων σε ένα χρωμόσωμα ή και μεταξύ δύο ή και τριών χρωματοσωμάτων (δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες). Αφ' ετέρου περιλαμβάνουν και ηπιότερες χρωμοσωματικές αλλαγές που χαρακτηρίζονται ως ανταλλαγές των αδελφών χρωματιδίων (Sister Chromatid Exchanges, SCEs). Οι ανταλλαγές των αδελφών χρωματιδίων θεωρούνται ως δείκτης τόσο της βλάβης του DNA όσο και της επιδιορθωτικής ικανότητας των κυττάρων. Για τον λόγο αυτό, η συχνότητα ανταλλαγής αδελφών χρωματιδίων που προκύπτει από την ανάλυση μεταφασικών κυττάρων έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για τον έμμεσο έλεγχο της γενετοξικής δράσης μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων περιβαλλοντικών παραγόντων. Η κλασική μέθοδος ανάλυσης των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων *in vitro*, που διεξάγεται σε κύτταρα που βρίσκονται στη μετάφαση της δεύτερης μιτωτικής διαίρεσης, δεν συμπεριλαμβάνει τα κύτταρα που έχουν καθυστερήσει π.χ. στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου λόγω της έκθεσής τους σε γενετοξικούς παράγοντες. Συνεπώς, η εκτίμηση της συχνότητας των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων είναι αδύνατο να πραγματοποιηθεί μετά από έκθεση σε υψηλές δόσεις ενός γενετοξικού παράγοντα, διότι τα περισσότερα κύτταρα καθυστερούν στην G2 φάση του κυτταρικού τους κύκλου. Ένα επιπλέον σημαντικό μειονέκτημα της κλασικής ανάλυσης ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων αποκλειστικά σε κύτταρα που ευρίσκονται στη μετάφαση είναι 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.

Στην παρούσα μελέτη το ενδιαφέρον εστιάζεται στην προσπάθεια να ξεπεράσουμε τις αδυναμίες που εμφανίζει η εφαρμογή της κλασικής μεθόδου ανταλλαγής αδελφών χρωματιδίων για την εκτίμηση της γενετοξικής δράσης φυσικών και χημικών παραγόντων. Επίσης, στην κατανόηση των μηχανισμών δράσης πιθανών γενετοξικών και καρκινογόνων παραγόντων, καθώς και των αποκλίσεων των αποτελεσμάτων που παρατηρούνται σε διαφορετικά εργαστήρια και που οφείλονται σε μεθοδολογικούς και βιολογικούς παράγοντες. Προς τον σκοπό αυτό έγινε προσπάθεια να αναπτυχθεί μια νέα κυτταρογενετική μεθοδολογία με την οποία η ανάλυση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων αντί να γίνεται σε **μεταφασικά** κύτταρα, επετεύχθη να γίνεται σε **μεσοφασικά** κύτταρα. Συγκεκριμένα, η ανάλυση ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων επετεύχθη να γίνεται σε πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα ανθρώπινων λεμφοκυττάρων στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου (G2-phase prematurely condensed chromosomes, G2-PCCs) μετά από *in vitro* καλλιέργειά τους. Με τη νέα αυτή μέθοδο συμπεριλαμβάνονται στην ανάλυση και τα λεμφοκύτταρα που παρουσιάζουν καθυστέρηση στην G2 φάση του κυτταρικού τους κύκλου μετά από έκθεση σε γενετοξικούς παράγοντες και καθίσταται δυνατός ο έλεγχος του κατά πόσον η κλασική μέθοδος ανάλυσης των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων σε μεταφασικά κύτταρα υποεκτιμά ή όχι τη γενετοξική δράση πιθανών καρκινογόνων ουσιών. Επομένως, με την κυτταρογενετική ανάλυση σε πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα στην G2-φάση του κυτταρικού κύκλου ξεπερνιούνται οι αδυναμίες ανάλυσης ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων στη μετάφαση με στόχο:

- α) την εμπειριστατωμένη μελέτη χημικών ουσιών καθώς και συνδυασμών τους που χαρακτηρίζονται ως πιθανά μεταλλαξιγόνες και καρκινογόνες
- β) τη διερεύνηση και κατανόηση των μηχανισμών δράσης τους
- γ) την κατανόηση των αποκλίσεων των αποτελεσμάτων από διαφορετικά εργαστήρια που αναφέ-

ρονται στον χαρακτηρισμό της γενοτοξικής δράσης παραγόντων με κυτταρογενετικές μεθόδους, που ενδεχομένως οφείλονται σε μεθοδολογικούς και βιολογικούς παράγοντες και

δ) 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. Η τυχόν αλληλεξάρτηση των δύο αυτών παραμέτρων θα συνέβαλε ουσιαστικά στην ανάπτυξη ενός δείκτη για την ανίχνευση γενετικής προδιάθεσης στην καρκινογένεση.

## 2

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 2.1 Συνθήκες καλλιέργειας

Ως πηγή λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε περιφερικό φλεβικό αίμα από υγιείς δότες. Κάθε ειδικός σωλήνας καλλιέργειας περιέχει 0,5 ml ολικού αίματος, 5 ml McCoy's 5A θρεπτικό μέσο με 10% ορό εμβρύου μόσχου (FCS, Foetal Calf Serum), 1% γλουταμίνη, 1% αντιβιοτικά (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη) και 1% φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA). Οι καλλιέργειες επωάστηκαν σε κλίβανο στους 37°C με παροχή διοξειδίου του άνθρακα 5% επί 72 ώρες.

Συγκεκριμένα, κατά τη μεθοδολογία αυτή γίνεται:

1. Λήψη φλεβικού αίματος υπό άσηπτες συνθήκες σε ηπαρινισμένα σωληνάκια, ώστε να αποφευχθεί η πήξη του αίματος.
2. Για κάθε καλλιέργεια τοποθετούνται σε ειδικά σωληνάκια καλλιέργειας των 15ml (Costar, No. 2071), 0,5 ml περιφερικού αίματος σε 5 ml θρεπτικό υλικό Mc Coy's 5A (Biochrom KG seromed, No. F1015). Το θρεπτικό υλικό έχει εμπλουτιστεί με 10% εμβρυικό ορό μοσχαριού (FCS, Foetal Calf Serum, Biochrom KG seromed, No.S0115), 1% γλουταμίνη (l-gln, Biochrom KG seromed, No. K282) και 1% αντιβιοτικά, όπως πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (penicillin, streptomycin, Biochrom KG seromed, No. A2213). Το FCS παρέχει τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες για τα κύτταρα. Τα αντιβιοτικά δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη τυχόν μολύνσεων, ενώ η γλουταμίνη δρα ως βοηθητικός παράγοντας στον αναδιπλασιασμό του DNA κατά τη φάση της σύνθεσης (S).
3. Προσθήκη στο θρεπτικό υλικό 1% Φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA Biochrom KG seromed, NoM5030) απαραίτητη για την αποδιαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων και την επιτέλεση του κυτταρικού τους κύκλου.
4. Τοποθέτηση των σωληναρίων καλλιέργειας υπό γωνία 30°C, σε επωαστικό κλίβανο 37°C, σε ατμόσφαιρα 95% αέρα, 5% CO<sub>2</sub> και 100% υγρασία για 72 ώρες. Η θερμοκρασία των 37°C είναι απαραίτητη για την επιτέλεση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων, ενώ το 5% CO<sub>2</sub> στον αέρα απαιτείται για τη διατήρηση του pH μεταξύ 6,8 και 7,2 ώστε να είναι εφικτή η παραπέρα ανάπτυξη των κυττάρων.
5. Τα κύτταρα εκτίθενται σε διαφορετικές δόσεις γενοτοξικών παραγόντων. Σε κάθε δόση ακτινοβολίας, εκτίθενται τουλάχιστον 2 δείγματα κάθε δότη και παράλληλα καλλιέργειες ολικού αίματος μη εκτεθέμενες σε γενοτοξικούς παράγοντες χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες.

## 2.2 Έκθεση κυτταρικών καλλιιεργειών διεγερμένων T-λεμφοκυττάρων σε:

### α. Χημικούς Παράγοντες

Ο έλεγχος της μεταλλαξιγόνου δράσης των τοξικών ουσιών, εκτιμάται μετά από έκθεση των καλλιιεργειών στις υπό μελέτη ουσίες. Οι κυτταρικές καλλιέργειες περιφερικού αίματος, εκτίθενται στους υπό μελέτη χημικούς παράγοντες για 48 ώρες. Η δράση των ουσιών, μελετάται σε κάθε έναν από τους τέσσερις διαφορετικούς δότες σε ένα εύρος συγκεντρώσεων μεταξύ 0,01 mM- 50 mM.

### β. Ιοντίζουσα Ακτινοβολία

Η υδροκινόνη εμπεριέχεται στη σύσταση των εμφανιστικών υγρών στα ακτινολογικά εργαστήρια. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν κυτταρογενετικές μελέτες σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος υγιών δοτών που αφορούν την επίδραση της υδροκινόνης σε συνδυασμό με ιοντίζουσα ακτινοβολία 1-3 Gy (ακτινοβολία-γ).

## 2.3 Συλλογή, μονιμοποίηση και προετοιμασία χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων

- 1) Επίδραση κολσεμιδίου σε τελική συγκέντρωση 0,02 μg/ml για 1 ώρα, ώστε τα λεμφοκύτταρα να σταματήσουν τον κυτταρικό τους κύκλο στη μετάφαση.
- 2) Φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 1200 στροφές/λεπτό και απόχυση υπερκείμενου.
- 3) Προσθήκη 10 ml υπότονου διαλύματος KCl 0,075M για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα λόγω διαφοράς οσμωτικής πίεσης διογκώνονται και τελικά σπάει η κυτταρική τους μεμβράνη ώστε τα χρωμοσώματα να απλωθούν και να γίνουν ορατά.
- 4) Απόχυση του υπότονου διαλύματος KCl μετά από φυγοκέντριση 5 λεπτών στις 1200 στροφές/λεπτό, εκτός από περίπου 0,5 ml στα οποία και επαναιωρούνται τα κύτταρα για να αποφευχθεί ο σχηματισμός συσσωματωμάτων κατά τη μονιμοποίηση.
- 5) Μονιμοποίηση κυττάρων στάγδην με 10 ml διαλύματος μεθανόλης-οξικού οξέος σε αναλογία 3:1 (v/v). Μετά από μια επιπλέον φυγοκέντριση και απόχυση του πρώτου μονιμοποιητικού, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 ml φρέσκου μονιμοποιητικού.
- 6) Νέα φυγοκέντριση και απόχυση του υπερκείμενου εκτός από περίπου 1 ml στο οποίο επαναιωρείται το κυτταρικό διάλυμα.
- 7) Επίστρωση 1-2 σταγόνων εναιωρήματος κυττάρων σε καθαρή και υγρή αντικειμενοφόρο πλάκα. Οι πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν σε οριζόντια θέση.

- 8) Η ποιότητα των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων ελέγχεται με μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης.
- 9) Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τα χρωμοσώματα που πρόκειται να ελεγχθούν ως προς την ακτινοευαισθησία τους βάφονται με χρώση Giemsa (5% σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, Sorensen Ph 6.8) για 10 min.

## 2.4 Επαγωγή πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης κατά την G2 φάση

Για την επαγωγή πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης στα λεμφοκύτταρα χρησιμοποιήθηκε καλικουλίνη-A (Calyculin A, Sigma-Aldrich). Για να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες για την πρόωρη χρωμοσωματική συμπύκνωση κατά την G2 φάση, η καλικουλίνη-A προστέθηκε στις καλλιέργειες σε δόσεις 10 nM, 50 nM και 100 nM σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, δηλαδή μισή, μία και τρεις ώρες πριν τη λήξη της επώασης των λεμφοκυττάρων. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες στις οποίες προστέθηκε N-διακετυλ-N-μεθυλ-κολχικίνη (colcemid) σε συγκέντρωση 0,05 μg/ml, τρεις ώρες πριν το τέλος της επώασης, χωρίς την προσθήκη καλικουλίνης-A. Η συχνότητα των κυττάρων με πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα εκφράζεται σε εκατοστιαίο ποσοστό των συνολικών πυρήνων που παρατηρήθηκαν σε μεγέθυνση x 200. Για κάθε διαφορετικό πείραμα αναλύθηκαν περίπου 300 κύτταρα. Επιπλέον υπολογίστηκαν οι συχνότητες των κυττάρων με πλήρως συμπυκνωμένα χρωμοσώματα, με μερικώς και καθόλου συμπυκνωμένα χρωμοσώματα, καθώς και οι συχνότητες των μεταφασικών κυττάρων, για κάθε πείραμα αντίστοιχα.

## 2.5 Ανταλλαγές αδελφών χρωματιδίων κατά την G2 και M φάση ανθρώπινων λεμφοκυττάρων

Η 5-βρωμοδεοξυουριδίνη (Sigma) προστέθηκε 24 ώρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας σε τελική συγκέντρωση 20 μM. Η ενσωμάτωση της 5-βρωμοδε-οξυουριδίνης στα διαιρούμενα κύτταρα επιτρέπει την αναγνώριση των κυττάρων που βρίσκονται στη δεύτερη μιτωτική διαίρεση. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37° C για 72 ώρες πριν την κατεργασία των κυττάρων. Με τη λήξη της καλλιέργειας, τα κύτταρα κατεργάζονται με υποτονικό διάλυμα KCl 0,075 M, μονιμοποιητικό διάλυμα μεθανόλης-οξικού οξέος 3:1 και 20 μl εναιωρήματος και ρίχνονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Οι πλάκες αποθηκεύονται στο σκοτάδι με ξηρό αέρα. Για την παρατήρηση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων, οι πλάκες βάφονται με την τεχνική Fluorescence-Plus-Giemsa. Σε κάθε πλάκα προστίθενται λίγες σταγόνες φθορίζουσας χρωστικής Hoechst 33258 (5 μg/ml) σε Sorensen's buffer (pH 6,8) και τα παρασκευάσματα, αφού καλυφθούν με καλυπτρίδες, τοποθετούνται σε ξηραντήρα στους 55° C και εκτίθενται σε λάμπα φθορισμού black light (Radium SupraBlack HBT 125-281) σε απόσταση 2 εκατοστών για 10 λεπτά. Στη συνέχεια οι πλάκες διαποτίζονται με Sorensen's buffer και βά-

φονται με 4% χρωστική Giemsa (Gurr R66 in Sorensen's buffer) για 15 λεπτά. Η μέτρηση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια των Carrano και Natarajan σε κύτταρα που βρίσκονται στη μετάφαση της δεύτερης μιτωτικής διαίρεσης και σε κύτταρα της G2 φάσης. Όλα τα κύτταρα που αναλύθηκαν περιείχαν 46 χρωμοσώματα.

## 2.6 Χημικές ουσίες και έλεγχος της γενετοξικής τους δράσης

Για τον έλεγχο της υπόθεσης ότι η μεταλλαξιγόνος δράση πιθανών γενετοξικών παραγόντων εκτιμάται λιγότερο με την κλασική SCE ανάλυση και για την εκτίμηση των δόσεων που σταματούν τα κύτταρα στην G2 φάση, οι ουσίες προστέθηκαν στις καλλιέργειες τις τελευταίες 24 ώρες της συνολικής διάρκειας της καλλιέργειας. Το ζιζανιοκτόνο με την ενεργό ουσία ατραζίνη (2-χλωρο-4-αιθυλ-αμινο-δισοπροπυλάμινο-1, 3, 5-τριαζίνη) χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις από 5 έως 220 µg/ml. Η ουσία με ζιζανιοκτόνο δράση Gramoxon, γνωστή και ως διχλωρίδιο Paraquat (1,1-διμεθυλ-4,4 διπυριδίο), προστέθηκε σε συγκέντρωση 500 µM και η υδροκουινόνη (1,4 βενζενδιόλη) σε συγκεντρώσεις 50 και 200 µM. Όλες οι χημικές ουσίες προέρχονται από τη Sigma-Aldrich, Germany. Η μιτομυκίνη-C (MMC, Kyowa Hakko Kogyo Co. LTD, Japan) παρασκευάστηκε σε RPMI μέσο και χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας σε τελική συγκέντρωση 0,1 µg/ml. Η καλικουλίνη-A διαλύθηκε σε απόλυτη αλκοόλη, η ατραζίνη σε διμεθυσουλφοξείδιο (DMSO), το Paraquat σε απεσταγμένο νερό και η υδροκουινόνη σε διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS).

Κάθε καλλιέργεια με διαφορετικές συγκεντρώσεις χημικών επαναλήφθηκε ανεξάρτητα τουλάχιστον 3 φορές και υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση των μέσων τιμών κάθε ανεξάρτητου πειράματος αντίστοιχα. Από κάθε καλλιέργεια αναλύθηκαν 30-50 κύτταρα για τον υπολογισμό των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το κριτήριο t (Student's t-test).

## 2.7 Εκτίμηση του Δείκτη Διπλασιασμού (R.I., Replication Index)

Για κάθε συγκέντρωση χημικού παράγοντα σε κάθε δόση, μετρήθηκε ο αριθμός των  $M_1$ ,  $M_2$  και  $M_3+$  μεταφάσεων. Η μέτρηση του αριθμού των  $M_1$ ,  $M_2$  και  $M_3+$  μεταφάσεων επιτρέπει την εκτίμηση της καθυστέρησης των κυττάρων σε επίπεδο κύκλων διπλασιασμού ως συνέπεια της επίδρασης των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη ουσιών με βάση τον υπολογισμό του Δείκτη Διπλασιασμού (RI, Replication Index), ο οποίος δίνεται από τον τύπο:

$$RI = 1(M_1) + 2(M_2) + 3(M_3) / (M_1) + (M_2) + (M_3)$$

όπου: RI=Replication Index



$M_1, M_2, M_3$  = πρώτος, δεύτερος και τρίτος κυτταρικός κύκλος, αντίστοιχα

Το σύνολο των μεταφάσεων που μετρήθηκαν για τον υπολογισμό του δείκτη διπλασιασμού σε όλες τις συγκεντρώσεις και στο μάρτυρα για κάθε δότη ήταν 200 μεταφάσεις με 46 χρωμοσώματα.

## 2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) για τον έλεγχο του πολυμορφισμού του γονιδίου GSTT1: Αρχή μεθόδου Πολλαπλής Αλυσιδωτής Αντίδρασης της πολυμεράσης (Multiplex Chain Reaction, Multiplex PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι μία μέθοδος για την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Μέσω της PCR καθίσταται δυνατή η παραγωγή τεράστιου αριθμού πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με σχετικά απλό τρόπο. Η αντίδραση PCR σχεδιάστηκε και παρουσιάστηκε από τον Dr Kary Mullis το 1983, ο οποίος τότε εργαζόταν στην εταιρεία Cetus στο Emeryville της Καλιφόρνιας. Η πρώτη δημοσίευση για την PCR εμφανίστηκε το 1985. Από τότε ο αριθμός των δημοσιεύσεων όπου αναφέρεται χρήση της PCR αυξάνεται εκθετικά. Το 1989 το περιοδικό Science επέλεξε την PCR σαν το μέγιστο επιστημονικό επίτευγμα και την Tag DNA πολυμεράση σαν το μόριο της χρονιάς. Το 1993 ο Dr Kary Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας.

Η αντίδραση PCR εκμεταλλεύεται ορισμένα χαρακτηριστικά του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής του DNA με σκοπό την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλιωνα μόρια μπορούν να παραχθούν με απλό τρόπο από δίκλιωνα μόρια DNA, όταν αυτά θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες, οπότε αποχωρίζονται. Η DNA πολυμεράση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Επομένως το σημείο έναρξης της σύνθεσης του DNA μπορεί να καθορισθεί με τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδικού εναρκτηρίου μορίου (εκκινητή, primer) που συνδέεται με τη μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο.

Το αρχικό υλικό για μια αντίδραση PCR είναι το δείγμα DNA το οποίο περιέχει την αλληλουχία-στόχο. Δεν είναι απαραίτητο να έχει απομονωθεί μόνο η αλληλουχία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί, διότι αυτή μπορεί να καθορισθεί από τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση. Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιλαμβάνει πολλούς κύκλους (συνήθως 25-35), ο καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες με βάση τα ακόλουθα βήματα:

1. Αποδιάταξη (denaturation): Το μίγμα θερμαίνεται αρχικά στους 95°C για περίπου 5 min. Σε αυτή τη θερμοκρασία τα δίκλιωνα μόρια DNA αποχωρίζονται τελειώς και έτσι παράγονται οι μονόκλωνες αλυσίδες που θα χρησιμεύσουν ως εκμαγεία για τους εκκινητές και τη DNA πολυμεράση.

2. Υβριδίωση (annealing): Η θερμοκρασία μειώνεται ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μόρια του μονόκλωνου DNA. Η θερμοκρασία υβριδίωσης αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την εξειδίκευση της αντίδρασης PCR. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι που χρησιμοποιούνται ποικίλλουν ανάλογα με τις αλληλουχίες που ενισχύονται.

3. Προέκταση (extension): Στο επόμενο βήμα η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, περιοχή βέλτιστης θερμοκρασίας για τη θερμοσταθερή Tag DNA. Ο χρόνος επώασης στους 72°C ποικίλλει ανάλογα με το μήκος του τμήματος στόχου που θέλουμε να ενισχύσουμε.

4. Τέλος, η θερμοκρασία αυξάνεται και πάλι στους 95°C, μόνο για λίγα δευτερόλεπτα, έτσι ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA (που αποτελούνται από την αρχική και τη νεοσυντιθεμένη συμπληρωματική αλυσίδα) να αποχωριστούν και πάλι. Αυτές οι μονόκλωνες αλυσίδες αποτελούν τα εκμαγεία για τον επόμενο γύρο σύνθεσης DNA και επαναλαμβάνονται συνήθως 25-35 κύκλοι αποχωρισμού των αλυσίδων, υβριδοποίησης των εκκινητών και σύνθεσης DNA. Ο χρόνος προέκτασης του τελικού κύκλου είναι συνήθως μεγαλύτερος (10 min) έτσι ώστε να δοθεί χρόνος στην πολυμεράση για την ολοκλήρωση της προέκτασης όλων των προϊόντων.

Οι κυριότεροι παράγοντες που επιδρούν στην αντίδραση PCR είναι:

1. Δείγμα DNA
2. DNA πολυμεράση
3. Επιλογή εκκινητών
4. Θερμοκρασία υβριδίωσης εκκινητών
5. Συγκέντρωση ιόντων Mg<sup>2+</sup>
6. Συγκέντρωση τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοζιτών
7. Παρουσία ενισχυτών και αναστολέων
8. Αριθμός κύκλων.

Ο συνηθέστερος τρόπος ποιοτικού προσδιορισμού των προϊόντων της αντίδρασης PCR περιλαμβάνει ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel), η συγκέντρωση της οποίας εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA που ηλεκτροφορείται. Για τμήματα DNA μεγαλύτερα των 150 bp (ξεύγη βάσεων) η περιεκτικότητα του πηκτώματος σε αγαρόζη έως 2% (W/V) είναι επαρκής, αλλά για τμήματα μεταξύ 50-150 bp απαιτείται συνήθως ειδική αγαρόζη. Για τμήματα μικρότερα των 50 bp σε μέγεθος, το πολυακρυλαμίδιο είναι το καλύτερο διαχωριστικό μέσο με συγκεντρώσεις από 8 σε 20% (W/V).

Για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των προϊόντων της αντίδρασης PCR χρησιμοποιείται κυρίως το βρωμιούχο αιθίδιο, μια ουσία που έχει την ικανότητα να εκπέμπει φθορισμό λόγω σχηματισμού συμπλόκων παρεμβολής (intercalation) με το δίκλωνο DNA όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Το όριο ανίχνευσης με την τεχνική αυτή είναι 1-50 ng DNA. Άλλες φθορίζουσες ουσίες που άρχισαν να χρησιμοποιούνται πρόσφατα και χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλή ευαισθησία είναι το SYBR GREEN και το SYBR GOLD (Molecular Probes).

Στην πολλαπλή PCR χρησιμοποιούνται διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για την ταυτόχρονη ενίσχυ-

ση πολλών διαφορετικών περιοχών της αλληλουχίας στόχου. Εφαρμόζεται κυρίως στη διάγνωση γενετικών ασθενειών που οφείλονται σε γονιδιακά ελλείμματα. Η ύπαρξη του ελλείμματος αποδεικνύεται όταν στο πήκτωμα μετά από ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR, έχει χαθεί κάποια ζώνη λόγω της απώλειας της περιοχής όπου υβριδοποιείται κάποιο ζεύγος εκκινητών. Η μέθοδος δίνει παρόμοια αποτελέσματα με την ανάλυση κατά Southern blot, έχει όμως το πλεονέκτημα της απλότητας στη χρήση.

## 2.9 Πρωτόκολλο μεθόδου Πολλαπλής Αλυσιδωτής Αντίδρασης της πολυμεράσης

Οι αντιδράσεις της πολλαπλής PCR γίνονται σ' ένα ρυθμιστικό διάλυμα (1x) (buffer), το οποίο περιέχει: Tris-Cl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 15 Mm  $\text{MgCl}_2$ , pH 8,7 (20°C) (Qiagen PCR byffer). Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 50  $\mu\text{l}$ . Το μίγμα της αντίδρασης περιέχει τα εξής υλικά:

50-200 ng DNA

1-1,5 mM  $\text{MgCl}_2$

30 pmoles εκκινητών

200  $\mu\text{M}$  dNTPs

1,5 μονάδες πολυμεράσης Taq (Taq DNA polymerase, 201203 Qiagen, 250 units).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι παρακάτω:

GSTT1-FOR

GSTT1-REV

b-globin-FOR

b-globin-REV

• Η αλληλουχία του εκκινητή (primer) GSTT1-FOR είναι:

5'-TTC-CTT-ACT-GGT-CCT-CAC-ATC-TC-3'

• Η αλληλουχία του εκκινητή (primer) GSTT1-REV είναι:

5'-TCA-CCG-GAT-CAT-GGC-CAG-CA-3'

• Η αλληλουχία του εκκινητή (primer) b-globin-FOR είναι:

5'-CAA-CTT-CAT-CCA-CGT-TCA-CC-3'

• Η αλληλουχία του εκκινητή (primer) b-globin -REV είναι:

5'-GAA-GAG-CCA-AGG-ACA-GGT-AC-3'

Οι συνθήκες της πολλαπλής PCR είναι:

- 1 κύκλος: Αποδιάταξη για 5 min στους 94°C
- 35 κύκλοι: Αποδιάταξη για 1 min στους 94°C
- 35 κύκλοι: Υβριδοποίηση για 1 min στους 56°C
- 35 κύκλοι: Προέκταση για 1 min στους 56°C
- 4°C

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (2 gr αγαρόζης σε 100 ml TAE 10%) με βρωμιούχο αιθίδιο. Ηλεκτροφορούμε 10  $\mu\text{l}$  DNA όπου έχουμε προσθέσει 1  $\mu\text{l}$  μπλε της βρωμοφαινόλης.



## 3

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Ανάπτυξη κυτταρογενετικής μέθοδου για την εκτίμηση της γενετοξικής δράσης χημικών παραγόντων που προκαλούν καθυστέρηση των κυττάρων στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου

Με τη χρήση κυτταρογενετικών μεθόδων ανάλυσης χρωμοσωματικών αλλοιώσεων ή ανάλυσης ανταλλαγής αδελφών χρωματιδίων, έχουν διεξαχθεί πολλές *in vivo* και *in vitro* μελέτες για τον έλεγχο της γενετοξικής δράσης πιθανών μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων παραγόντων. Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών, εντούτοις, δεν οδηγούν πάντοτε σε σταθερά συμπεράσματα, ενώ έχουν αναφερθεί και ευρήματα κυτταρογενετικού ελέγχου που είναι μεταξύ τους αντικρουόμενα. Ιδιαίτερα, όταν η συχνότητα SCEs είναι ελαφρώς αυξημένη αναφορικά με μετρήσεις σε δείγματα μη εκτεθειμένα, η γενετοξική δράση χαρακτηρίζεται ως μηδαμινή μετά από έκθεση σε δόσεις μέγεθους τέτοιου ώστε να μη θεωρούνται κυτταροτοξικές. Εντούτοις, παρόλο που με τη χρήση υψηλότερων χημικών δόσεων θα μπορούσε να εξακριβωθεί αν η συχνότητα ανταλλαγής αδελφών χρωματιδίων εξαρτάται από την ποσότητα της δόσης, δεν μπορούν να χορηγηθούν υψηλότερες δόσεις γιατί με αυτόν τον τρόπο τα προσβληθέντα κύτταρα κατακρατούνται στη φάση G2 και δεν προχωρούν στη μετάφαση, τουλάχιστον προσωρινά, εμποδίζοντας έτσι την ανάλυσή τους με τη συμβατική μεθοδολογία SCE.

A



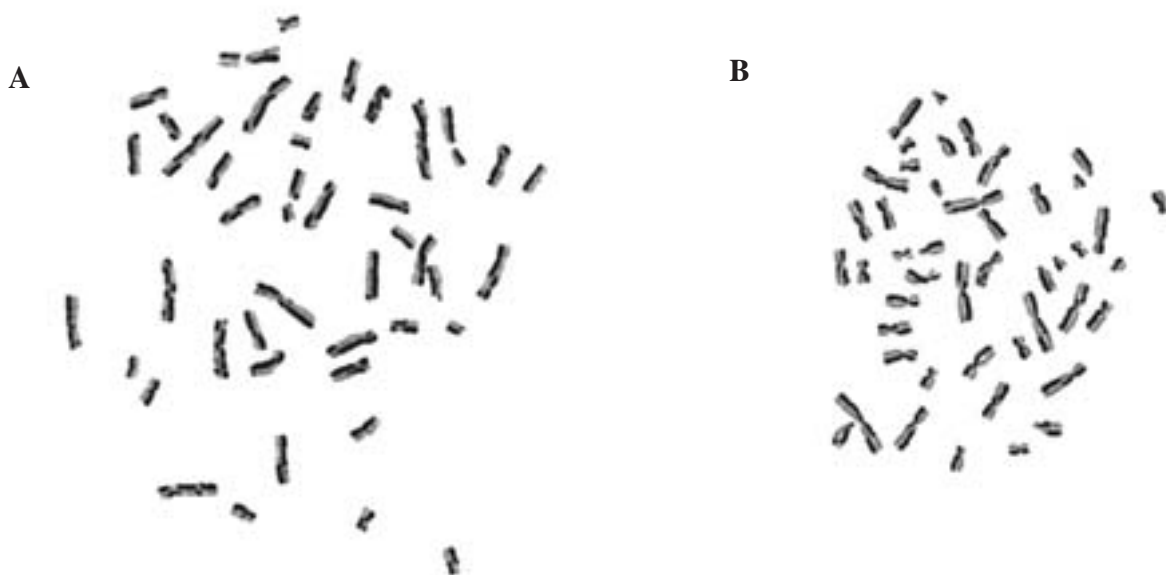
B



**Εικόνα 15:** Παραδείγματα ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων (SCEs) σε G2-φάσης πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος μετά από επίδραση με 50 nM καλνκουλίνης-A για 1 ώρα. Στο σχήμα φαίνεται η χαρακτηριστική εικόνα των ενωμένων αδελφών χρωματιδίων: (A) SCEs σε G2-φάσης φυσιολογικό λεμφοκύτταρο, (B) SCEs σε G2-φάσης λεμφοκύτταρο μετά από έκθεση σε 50 µg/ml ατραζίνης

Η προτεινόμενη σε αυτή την εργασία κυτταρογενετική μεθοδολογία για την αξιολόγηση μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων παραγόντων ξεπερνά αυτή τη δυσκολία της συμβατικής μεθόδου, διότι καθιστά δυνατή την ανάλυση ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων στη μεσόφαση και ιδιαίτερα σε πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα λεμφοκυττάρων στην G2 φάση του κυτταρικού τους κύκλου (G2-PCCs). Παραδείγματα ανάλυσης των SCEs με χρήση της μεθοδολογίας G2-PCCs παρατίθενται στις εικόνες 15 και 16. Και στις δύο περιπτώσεις, εικόνα 15A (μάρτυρας) και εκτιθέμενο δείγμα (εικόνα 15B και εικόνα 16A), τα αδελφά χρωματίδια κάθε χρωμοσώματος είναι ευθυγραμμισμένα σε κοντινή επαφή, παράλληλα μεταξύ τους και τα κεντρομερίδια δεν είναι ξεκάθαρα ορατά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να μην μπορούν να αναγνωριστούν εύκολα τα δικεντρικά και τα ακεντρικά χρωμοσώματα και αυτή είναι μια σημαντική δυσκολία για την ανάλυση αλλοιώσεων χρωμοσωματικού τύπου χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία αυτή. Εντούτοις, για την ανάλυση SCE σε G2-PCCs και τον έλεγχο της γενετοξικής δράσης φυσικών και χημικών παραγόντων, το γεγονός ότι η θέση των κεντρομεριδίων των χρωμοσωμάτων δεν είναι ορατή δεν προβληματίζει καθόλου. Αντιθέτως, το γεγονός αυτό διαφοροποιεί τη μορφή των G2-PCCs από τη μορφή των χρωμοσωμάτων στη μετάφαση (εικόνα 16B), επιτρέποντας έτσι κατά μοναδικό τρόπο στο ίδιο χρωμοσωματικό παρασκεύασμα την ταυτόχρονη ανάλυση των ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων, τόσο σε G2-PCCs, όσο και σε μεταφασικά χρωμοσώματα μετά από έκθεση σε γενετοξικούς παράγοντες.

Ο σχεδιασμός των πειραμάτων στοχεύει στην προτυποποίηση ενός απλού πρωτοκόλλου ανάλυσης SCE σε G2-PCCs, στη διακρίβωση της πιθανούς υποεκτίμησης της μεταλλαξιγόνου δράσης ορισμένων χημικών ουσιών, όταν χρησιμοποιείται η συμβατική ανάλυση SCE, και επίσης στην εκτίμηση της έκθεσης σε ουσίες που προκαλεί την καθυστέρηση των κυττάρων στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου.



**Εικόνα 16:** Παραδείγματα ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων (SCEs) σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος μετά από επίδραση 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Μιτομυσίνης-C για 1 ώρα: (A) SCEs σε G2-φάσης κύτταρο, (B) SCEs σε κύτταρο στη μετάφαση.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν τέσσερις σειρές πειραμάτων.

Στην **πρώτη σειρά** αναπτύχθηκε το πρωτόκολλο και διερευνήθηκαν οι καταλληλότερες συνθήκες για την επαγωγή PCC και την ανάλυση των SCEs σε G2-PCCs λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, έκθεση σε 50 nM calyculin-A για 2 ώρες καθώς και σε 100 nM για μία ώρα είχαν ως αποτέλεσμα το υψηλότερο ποσοστό κυττάρων με πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα. Εντούτοις, τα χρωμοσώματα των περισσότερων κυττάρων γίνονται ασαφή και μικροσκοπικά όταν καλλιέργεια αίματος για 72 ώρες εκτίθεται στην calyculin-A για περισσότερο από μία ώρα. Για τους λόγους αυτούς και λαμβάνοντας υπόψη τόσο τη μορφολογία των πρόωρων συμπυκνωμένων χρωμοσωμάτων, όσο και το ποσοστό επαγωγής τους, επιλέγηκε η έκθεση σε 50 nM calyculin-A για μία ώρα ως η καλύτερη συνθήκη για την επαγωγή PCC και την ανάλυση SCE των λεμφοκυττάρων σε G2-φάση.

			PCCs στις διάφορες					
			φάσεις του					
			κυτταρικού κύκλου					
Συγκέντρωση καλυκουλίνης/ διάρκεια επίδρασης σε ώρες	Πυρήνες (%)	Μερικώς συμπυκνω- μένοι πυρήνες (%)	G1 (%)	S (%)	G2 (%)	Μίτωση (%)	Συνολικά PCCS (%)	Κύτταρα που αναλύθηκαν
10 nM / 1 h	55,9	5,2	1,4	33,5	1,1	2,6	38,8	268
<b>10 nM / 2 h</b>	60,5	0,4	0	28,3	2	8,5	38,8	247
10 nM / 3 h	52,8	6,3	0	36,9	3,5	0,3	40,8	284
50 nM / 0,5 h	47	29	4	8	8,4	2,5	23	319
50 nM / 1 h	44	8,8	7	29,4	10	0	49,9	339
<b>50 nM / 2 h</b>	65	2,6	4,8	41,4	8,2	0	54,5	229
<b>50 nM / 3 h</b>	47,6	2,8	4,1	41,2	4,1	0	49,5	315
<b>100 nM / 0.5 h</b>	52,6	15,7	2,1	24,5	2,4	2,4	31,5	285
100 nM / 1 h	36,4	7,8	2	43,7	3,4	6,4	55,6	343
100 nM / 3 h	66	4,4	0	27,3	2,2	0	29,5	227

**Πίνακας 1:** Επαγωγή PCC σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος μετά την έκθεσή τους σε διαφορετικές δόσεις Calyculin-A για διάφορα χρονικά διαστήματα.

Η **δεύτερη σειρά πειραμάτων** πραγματοποιήθηκε για να εξετάσουμε κατά πόσον πιθανά καρκινογό-

νες ουσίες εμφανίζουν γενετοξική δράση σε επίπεδα έκθεσης που καθυστερούν τα λεμφοκύτταρα στην G2 φάση, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο SCEs ανάλυσης σε G2 PCCs. Επίσης κατά πόσο η συχνότητα των SCEs σε υψηλές εκθέσεις που προκαλούν καθυστέρηση στο κυτταρικό κύκλο εξαρτάται από τη δόση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Όταν χρησιμοποιήθηκαν χημικές ουσίες ατραζίνη και υδροκινόνη στις καλλιέργειες αίματος σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (τοξικές), δεν μπορούσαμε να μετρήσουμε τις SCEs με τη χρήση της συμβατικής ανάλυσης SCE, καθώς σε αυτό το σημείο του πειράματος δεν υπήρχαν κύτταρα σε μίτωση. Εντούτοις, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, με τη χρήση πρόωρης χρωμοσωμικής συμπύκνωσης μπορούσαμε εύκολα να μελετήσουμε τη γενετοξική δράση και το αριθμό των SCEs ανά κύτταρο στη φάση G2, ακόμα και για δόσεις που ξεπερνούσαν τα όρια της τοξικότητας. Στην περίπτωση της ατραζίνης, η αύξηση της χημικής συγκέντρωσης από 100 σε 200  $\mu\text{gr/ml}$  δεν συνεπαγόταν αύξηση στη συχνότητα SCEs, όπως μετρήθηκε σε πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα λεμφοκυττάρων στη φάση G2. Αυτό το εύρημα δεν υποστηρίζει τη γενετοξική δραστηριότητα αυτής της ουσίας.

Χημική ουσία	Συγκέντρωση στην καλλιέργεια	SCEs / κύτταρο στη μετάφαση ( $\pm$ SD)	SCEs / G2-φάσης κύτταρο ( $\pm$ SD)
Μάρτυρας		5,00 $\pm$ 0,60	7,10 $\pm$ 0,52
Ατραζίνη	100 $\mu\text{gr/ml}$	Δεν υπήρχαν μεταφάσεις	10,10 $\pm$ 0,71
Ατραζίνη	200 $\mu\text{gr/ml}$	Δεν υπήρχαν μεταφάσεις	10,45 $\pm$ 0,48
Υδροκινόνη	200 $\mu\text{M}$	Δεν υπήρχαν μεταφάσεις	13,12 $\pm$ 0,80

**Πίνακας 2:** Αριθμός SCEs σε κύτταρα G2-PCC, σε σύγκριση με την ανάλυση κυττάρων στη μετάφαση, μετά από έκθεση σε διάφορες χημικές ουσίες σε επίπεδα κυτταροτοξικότητας. Οι τυπικές αποκλίσεις (S.D) υπολογίστηκαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Στην **τρίτη ομάδα πειραμάτων** εφαρμόσαμε την κυτταρογενετική μεθοδολογία που αναπτύξαμε για να εξετάσουμε κατά πόσον η ανάλυση SCE σε μεταφασικά κύτταρα υποεκτιμά την πιθανότητα γενετοξικότητας διαφόρων ύποπτων καρκινογόνων ουσιών. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και η στατιστική τους ανάλυση. Με τη μέθοδο ανάλυσης SCE σε G2-PCC μετρήθηκε πολύ υψηλότερη συχνότητα SCEs ανά κύτταρο από ότι στα κύτταρα στη μετάφαση. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι με τη χρήση της συμβατικής ανάλυσης SCE σε μεταφασικά κύτταρα υποεκτιμάται η πιθανότητα μεταλλαξιγένεσης των χημικών ουσιών που προσωρινά σταματούν τα κύτταρα στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου.

Χημική ουσία	Συγκέντρωση στην καλλιέργεια	SCEs/κύτταρο στη μετάφαση ( $\pm$ SD)	SCEs/G2-φάσης κύτταρο ( $\pm$ SD)	Τιμή t-test	Σημαντικότητα ( $\alpha=0.05$ )
Μάρτυρες	-	6,00 $\pm$ 0,48	7,10 $\pm$ 0,65	2,36	0,1 < p < 0,05
Ατραζίνη	20 $\mu\text{gr/ml}$	6,70 $\pm$ 0,38	9,96 $\pm$ 0,54	8,55	0,01 < p < 0,001
Υδροκινόνη	50 $\mu\text{M}$	8,70 $\pm$ 0,60	14,50 $\pm$ 0,82	9,89	p < 0,001
Παρακουάτ	500 $\mu\text{M}$	6,10 $\pm$ 0,75	8,41 $\pm$ 0,58	4,22	0,02 < p < 0,01
Μιτομυσίνη-C	0,1 $\mu\text{gr/ml}$	15,30 $\pm$ 0,91	27,42 $\pm$ 1,23	13,71	p < 0,001

**Πίνακας 3:** Αριθμός SCEs ανά κύτταρο σε G2-PCC λεμφοκυττάρων, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της κλασικής ανάλυσης σε μεταφασικά κύτταρα μετά από έκθεση σε διάφορες χημικές ουσίες. Οι τυπικές αποκλίσεις (S.D) υπολογίστηκαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα.



Στην **τέταρτη ομάδα πειραμάτων**, μελετήθηκε η επίδραση της κινητικής του κυτταρικού κύκλου στην απόκλιση που παρατηρείται στον αριθμό ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων σε μη εκτεθειμένα δείγματα (αυθόρμητες SCEs) από διαφορετικούς ανθρώπους. Στον Πίνακα 4 παρατίθενται τα αποτελέσματα και η στατιστική τους ανάλυση. Κατά μέσο όρο η συχνότητα των SCEs που μετράται στη φάση G2 είναι σημαντικά υψηλότερη ( $0,01 < p < 0,001$ ) από εκείνη που μετράται στη μετάφαση. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μικρότερου βαθμού απόκλιση SCEs όταν η ανάλυσή τους πραγματοποιήθηκε σε πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα στη φάση G2 από ότι στα μεταφασικά κύτταρα. Το φάσμα των αυθόρμητων ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων ανά κύτταρο σε υγιή μη εκτεθειμένα άτομα κυμαίνεται μεταξύ 4,5 - 10,5 με συντελεστή απόκλισης 28,3% όταν η ανάλυση έγινε σε μεταφασικά κύτταρα, ενώ το φάσμα ήταν 7,0 - 8,5 με συντελεστή απόκλισης 7,6% όταν οι SCEs μετρήθηκαν στη μεσόφαση σε G2-PCCs. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ένα σημαντικό μέρος της υπάρχουσας απόκλισης στη συχνότητα SCEs που παρατηρείται μεταξύ ατόμων του πληθυσμού μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στην κινητική του κυτταρικού κύκλου των λεμφοκυττάρων περισσότερο, παρά σε βιολογικούς παράγοντες και ενδογενή ευαισθησία στην αλληλεπίδραση με γενετοξικούς παράγοντες.

Δότες	SCEs / κύτταρο στη μετάφαση (Μέσος* $\pm$ SD)	SCEs / G2 φάσης κύτταρο (Μέσος $\pm$ SD)	Διαφορά μέσων τιμών**
1	4,5 $\pm$ 0,3	7,2 $\pm$ 0,5	2,7
2	9,0 $\pm$ 0,7	8,5 $\pm$ 0,7	-0,5
3	10,5 $\pm$ 1,2	8,3 $\pm$ 0,9	-2,2
4	5,8 $\pm$ 0,8	7,0 $\pm$ 0,8	1,2
5	5,5 $\pm$ 0,7	7,1 $\pm$ 0,6	1,6
6	6,6 $\pm$ 0,5	7,4 $\pm$ 0,7	0,8
7	6,0 $\pm$ 0,4	7,1 $\pm$ 0,5	1,1
8	5,0 $\pm$ 0,7	8,3 $\pm$ 0,8	3,3
9	5,1 $\pm$ 0,8	8,4 $\pm$ 0,6	3,3
10	5,8 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 0,6	1,7
11	5,3 $\pm$ 0,4	7,2 $\pm$ 0,4	1,9
12	5,7 $\pm$ 0,5	7,5 $\pm$ 0,5	1,8
Μέση τιμή $\pm$ SD	6,23 $\pm$ 1,76	7,6 $\pm$ 0,58	1,40 $\pm$ 1,55
	Συντελεστής	Συντελεστής	
	Διακύμανσης	Διακύμανσης	
	CV = 28.3%	CV = 7.6%	

**Πίνακας 4:** Διακύμανση στον αριθμό SCE ανά κύτταρο σε υγιή μη εκτεθειμένα άτομα μετά από ανάλυση σε μεταφασικά και μεσοφασικά κύτταρα στη G2 φάση χρησιμοποιώντας πρόωρη χρωμοσωματική συμπύκνωση.

\* Μέσοι και τυπικές αποκλίσεις έχουν υπολογιστεί από τρία ανεξάρτητα πειράματα

\*\* Σημαντικότητα των διαφορών των μέσων τιμών, t-test,  $a=0,05$  ( $t=3,13$ ,  $0,01 < p < 0,001$ )

### 3.2 Ανάλυση ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων σε πρόωρα συμπυκνωμένα χρωματοσώματα λεμφοκυττάρων στην G2-φάση του κυτταρικού κύκλου μετά από έκθεση στο ζιζανιοκτόνο ατραζίνη (atrazine)

Η βέλτιστη συνθήκη που επιλέχθηκε για την επαγωγή και παρατήρηση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων σε G2-PCC λεμφοκύτταρα είναι η κατεργασία των κυττάρων με καλικουλίνη-A σε συγκέντρωση 50 nM για 1 ώρα. Στην εικόνα 17 φαίνονται οι ανταλλαγές των αδελφών χρωματιδίων σε G2-PCC κύτταρα μετά από έκθεση σε ατραζίνη. Ως θετικοί μάρτυρες επιλέχθηκαν οι καλλιέργειες λεμφοκυττάρων με συγκέντρωση μιτομυκίνης-C 0,1 μg/ml, οι δε ανταλλαγές των αδελφών χρωματιδίων σε G2-PCC κύτταρα φαίνονται στην εικόνα 18. Σε αντίθεση με την εμφάνιση των μεταφασικών χρωμοσωμάτων, τα αδελφά χρωματίδια στα πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα είναι ευθυγραμμισμένα, παράλληλα μεταξύ τους σε στενή επαφή και τα κεντρομερίδια τους δεν είναι ορατά με ευκρίνεια.



**Εικόνα 17:** Παραδείγματα ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων (SCEs) σε G2-φάσης πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος μετά από έκθεση σε 20 Bgr/ml ατραζίνης. Τα αδελφά χρωματίδια στα πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα είναι παράλληλα μεταξύ τους και τα κεντρομερίδιά τους δεν είναι ευδιάκριτα.



**Εικόνα 18:** Παραδείγματα ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων (SCEs) σε G2-φάσης πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος μετά από επίδραση 0,1 Bgr/ml μιτομυκίνης-C.

**Εικόνα 19:** Παραδείγματα ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων (SCEs) λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος στη μετά-φαση. Η παρουσία της σύσφιξης των χρωματιδίων στο κεντρομερίδιο είναι χαρακτηριστικό της μορφής των μεταφασικών χρωμοσωμάτων.



Προκειμένου να ελέγξουμε αν οι υψηλές συγκεντρώσεις της ατραζίνης προκαλούν δόσοεξαρτώμενη αύξηση στη συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων, σχεδιάστηκαν τέσσερις σειρές πειραμάτων. Με την πρώτη σειρά εξετάστηκε αν η γενετοξική δράση της ατραζίνης μπορεί να υπολογιστεί σε λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στην G2 φάση ακόμα και σε συγκεντρώσεις που ξεπερνούν τα κυτταροτοξικά όρια της ατραζίνης και τα κύτταρα σταματούν στην G2 φάση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 5. Σε συγκεντρώσεις της ατραζίνης 120-220 µg/ml κανένα κύτταρο δεν ξεπερνά την G2 φάση ώστε να γίνει η κλασική ανάλυση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων, ενώ μπορούμε να υπολογίσουμε τη συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων σε λεμφοκύτταρα της G2 φάσης.

Συγκέντρωση χημικής ουσίας στην καλλιέργεια	SCEs / κύτταρο στη μετάφαση (Μέσος ± SD)	SCEs / G2-φάσης κύτταρο (Μέσος ± SD)
Μάρτυρες	6,10 ± 0,60	6,60 ± 0,52
Ατραζίνη 60 µgr/ml	8,50 ± 1,10	9,90 ± 0,71
Ατραζίνη 120 µgr/ml	Δεν υπήρχαν μεταφάσεις	10,30 ± 0,90
Ατραζίνη 220 µgr/ml	Δεν υπήρχαν μεταφάσεις	10,25 ± 0,80
Μιτομισίνη-C 0.1 µgr/ml	15,30 ± 0,91	27,42 ± 1,23

**Πίνακας 5 :** Υπολογισμός των SCEs σε G2-PCC κύτταρα μετά από έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις ατραζίνης. Σε υψηλές συγκεντρώσεις ατραζίνης δεν παρατηρήθηκαν μεταφάσεις. Υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση των μέσων τιμών τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (σε λεμφοκύτταρα του ίδιου δότη) για κάθε συγκέντρωση της ατραζίνης αντίστοιχα.

Συγκέντρωση Ατραζίνης στην καλλιέργεια	SCEs / κύτταρο στη μετάφαση Εύρος τιμών* (Μέσος ± SD)	Συντελεστής διακύμανσης (%)	SCEs / G2-φάσης κύτταρο Εύρος τιμών* (Μέσος ± SD)	Συντελεστής διακύμανσης (%)
0 µgr/ml	4,4 – 8,9 (6,0 ± 1,6)	26,7	6,0 – 7,2 (6,4 ± 0,5)	7,8
5 µgr/ml	5,2 – 7,8 (6,5 ± 1,2)	18,5	7,2 – 8,3 (7,7 ± 0,6)	7,8
10 µgr/ml	6,0 – 9,2 (8,0 ± 1,4)	17,5	7,9 – 10,0 (8,9 ± 0,9)	10,1
20 µgr/ml	5,5 – 9,9 (7,5 ± 1,5)	20,0	8,0 – 10,4 (9,3 ± 0,8)	8,5
50 µgr/ml	7,1 – 10,5 (8,1 ± 1,4)	17,3	9,4 – 10,0 (9,6 ± 0,7)	7,3
100 µgr/ml	-	-	9,9 – 12,5 (10,5 ± 0,9)	8,6
150 µgr/ml	-	-	9,9 – 11,9 (10,1 ± 0,9)	8,9
200 µgr/ml	-	-	11,6 – 12,0 (10,4 ± 0,8)	7,7

**Πίνακας 6:** Η τιμή των SCEs που μετρήθηκαν σε G2-PCC κύτταρα και σε μεταφασικά κύτταρα μετά από έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της ατραζίνης. Υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση των μέσων τιμών έξι ανεξάρτητων πειραμάτων (από έξι διαφορετικούς δότες) για κάθε συγκέντρωση της ατραζίνης αντίστοιχα.

\* Εύρος των SCEs/κύτταρο από 4-6 δότες.

-: δεν υπήρχαν μεταφάσεις

Η **δεύτερη σειρά πειραμάτων** σχεδιάστηκε για να ελεγχθεί αν η ατραζίνη σε συγκεντρώσεις 5-220  $\mu\text{g/ml}$  προκαλεί δόσοεξαρτώμενη αύξηση της συχνότητας των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων και επομένως της επισκευής του DNA μέσω του μηχανισμού του ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombinational repair) σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων *in vitro*. Όπως φαίνεται στον πίνακα 6, τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από υψηλές εκθέσεις σε ατραζίνη δεν δείχνουν δόσοεξαρτώμενη αύξηση στη συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων.

Στην **τρίτη σειρά πειραμάτων** εξετάστηκε αν η ανάλυση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων στα μεταφασικά χρωμοσώματα είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος για την εκτίμηση της γενετοξικής δράσης της ατραζίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Μεγαλύτερος αριθμός ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων ανά κύτταρο σημειώθηκε στα κύτταρα που βρίσκονται στην G2 φάση, σε σχέση με τα μεταφασικά κύτταρα. Στην τέταρτη κατηγορία πειραμάτων εξετάστηκε η επίδραση της κινητικής του κυτταρικού κύκλου στη συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων μετά από έκθεση σε 20  $\mu\text{g/ml}$  ατραζίνης. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται επίσης στον Πίνακα 7. Μικρότερη μεταβλητότητα ( $CV=8,5\%$ ) παρατηρήθηκε όταν η ανάλυση έγινε στην G2 φάση σε σχέση με τα μεταφασικά κύτταρα ( $CV=20\%$ ). Το εύρος των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων ανά κύτταρο από υγιείς δότες μετά από έκθεση σε ατραζίνη είναι 5,5-9,9 σε μεταφασικά κύτταρα, ενώ το αντίστοιχο εύρος στα G2-PCC κύτταρα είναι 8,4-10,4.

Δότης	SCEs / κύτταρο στη μετάφαση (Mean* $\pm$ SD)	SCEs / G2-φάσης κύτταρο (Mean* $\pm$ SD)	Διαφορά μέσων τιμών **
1.	6,7 $\pm$ 0,5	9,2 $\pm$ 1,0	2,5
2.	6,9 $\pm$ 0,7	8,4 $\pm$ 0,6	1,5
3.	9,9 $\pm$ 1,2	10,4 $\pm$ 0,9	0,5
4.	6,6 $\pm$ 0,9	8,4 $\pm$ 0,5	1,8
5.	5,5 $\pm$ 0,8	9,0 $\pm$ 0,8	3,5
6.	8,2 $\pm$ 0,9	9,3 $\pm$ 0,9	1,1
7.	8,7 $\pm$ 1,0	10,2 $\pm$ 1,2	1,5
Μέσοι όροι $\pm$ SD	7,5 $\pm$ 1,5	9,3 $\pm$ 0,8	1,77 $\pm$ 0,98
	<b>Συντελεστής διακύμανσης CV = 20 %</b>	<b>Συντελεστής διακύμανσης CV = 8,5 %</b>	

**Πίνακας 7:** Μεταβολή στη συχνότητα των SCEs που υπολογίστηκε σε μεταφασικά και σε G2-PCC λεμφοκύτταρα μετά από έκθεση σε 20  $\mu\text{g/ml}$  της ατραζίνης.

\*μέση τιμή τριών ανεξάρτητων πειραμάτων

\*\*εκτίμηση της διαφοράς των μέσων τιμών των δειγμάτων, t-test

$\alpha=0,05$  ( $t=4,78$ ,  $0,01 < p < 0,001$ )

### 3.3 Έλεγχος γενεοτοξικής δράσης των φυτοφαρμάκων Παρακουάτ, Μανέμπ, και συνδυασμού Ατραζίνης, Κουζαλοφρόπ και Λινουρόν

#### Παρακουάτ (Paraquat)

Για να εξετάσουμε εάν υψηλές συγκεντρώσεις του παρακουάτ μπορούν να προκαλέσουν, ανάλογα με τη δόση, αύξηση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων (SCEs) και επομένως δόσοεξαρτώμενη αύξηση περιστατικών επισκευής του DNA με τον μηχανισμό του ανασυνδυασμού των ομόλογων περιοχών του γονιδιώματος, διεξάγαμε διαφορετικές σειρές πειραμάτων χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του φυτοφαρμάκου (0,00 / 0,50 / 0,75 mM) και δείγματα αίματος από δύο διαφορετικούς υγιείς δότες (α,β). Επίσης, διερευνήθηκε αν η γενεοτοξική δράση του παρακουάτ μπορεί να εκτιμηθεί στη φάση G2, ακόμα και μετά από εκθέσεις σε υψηλές συγκεντρώσεις οι οποίες καθυστερούν τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G2.

Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 8 και αποδεικνύουν ότι αυξανόμενη της συγκέντρωσης αυξάνεται και ο αριθμός των SCEs ανά κύτταρο. Στην περίπτωση που εφαρμόστηκε η κλασική μέθοδος ανάλυσης SCEs στη μετάφαση, τα αποτελέσματα παρουσιάζουν σημαντική διακύμανση για τους διαφορετικούς δότες περιφερικού αίματος. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε η νέα μέθοδος ανάλυσης των SCEs στην G2 φάση με τη βοήθεια της μεθόδου της πρόωρης χρωμοσωμικής συμπύκνωσης, παρατηρήθηκαν μόνο μικρές διακυμάνσεις στη συχνότητα της ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων.

Δότες	Συγκέντρωση Παρακουάτ (mM)	SCEs / κύτταρο στη μετάφαση*	SCEs / κύτταρο στη G2 φάση*
Μάρτυρας (a)	0,00	4,72±0,5	5,90±0,5
Μάρτυρας (b)	0,00	6,10±0,6	5,70±0,6
(a)	0,50	7,30±0,7	8,41±0,8
(b)	0,50	8,56±0,7	8,30±0,7
(a)	0,50	6,70±0,6	8,50±0,7
(b)	0,50	8,20±0,8	8,73±0,8
(a)	0,75	9,27±0,8	12,11±0,9
(b)	0,75	11,35±0,8	12,79±0,9

**Πίνακας 8:** Επιπτώσεις του ζιζανιοκτόνου Παρακουάτ στο κυτταρογενετικό επίπεδο χρησιμοποιώντας *Calyculin A* σε *in vitro* καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

\*μέση τιμή δύο ή τριών ανεξάρτητων πειραμάτων για κάθε δότη  
(a): δότης Α, (b): δότης Β.

**Μανέμπ**

Για να αξιολογηθεί η γενετοξική δράση του φυτοφαρμάκου μανέμπ στο κυτταρογενετικό επίπεδο χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος ανθρώπων και η μεθοδολογία ανάλυσης ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων (SCEs) στη μετάφαση καθώς και στη μεσόφαση χρησιμοποιώντας Calyculin A. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 9 και δείχνουν αφ' ενός ότι υπάρχει θετική απόκριση στη συχνότητα ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων αυξανόμενη της δόσης στο φυτοφάρμακο μανέμπ και αφ' ετέρου ότι υπάρχει μικρή διακύμανση στη συχνότητα ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων για διαφορετικούς δότες και διαφορετικές συγκεντρώσεις στη φάση G2. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε η κλασική μέθοδος ανάλυσης ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων στη μετάφαση, τα αποτελέσματα παρουσίασαν σημαντική διακύμανση για τους διαφορετικούς δότες περιφερικού αίματος.

Δότες	Συγκέντρωση Μανέμπ (mM)	SCEs / κύτταρο στη μετάφαση*	SCEs / κύτταρο στη G2 φάση*
Μάρτυρας (a)	0,00	4,72±0,5	5,90±0,5
Μάρτυρας (b)	0,00	6,10±0,6	5,70±0,6
(a)	0,10	7,26±0,9	9,35±0,8
(b)	0,10	8,16±0,9	9,49±0,7
(a)	0,20	7,95±0,6	10,50±0,7
(b)	0,20	8,98±0,8	10,73±0,8

**Πίνακας 9:** Επιπτώσεις του φυτοφαρμάκου Maneb στο κυτταρογενετικό επίπεδο χρησιμοποιώντας Calyculin A σε *in vitro* καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων.

\*μέση τιμή δύο ή τριών ανεξάρτητων πειραμάτων για κάθε δότη  
(a): δότης A, (b): δότης B.

**Γενετοξική δράση συνδυασμού φυτοφαρμάκων**

Για τη διακρίβωση της γενετοξικότητας που μπορεί να προκαλέσει ο συνδυασμός διαφόρων φυτοφαρμάκων, έγιναν καλλιέργειες λεμφοκυττάρων ανθρώπινου περιφερικού αίματος παρουσία Ατραζίνης, Λινουρόν καθώς και συνδυασμού αυτών σε συγκεντρώσεις κυμαινόμενες από 10-25 και 50μg/ml. Τα ευρήματα που πήραμε από την έκθεση καλλιεργιών ανθρώπινων λεμφοκυττάρων σε ατραζίνη και λινουρόν οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο συνδυασμός τους δεν προκαλεί χρωμοσωματικές αλλοιώσεις ούτε και συνεργιστική δράση σε επίπεδο ανταλλαγής αδελφών χρωματιδίων. Επίσης στις μελέτες αυτές φάνηκε ότι ούτε η ατραζίνη ούτε και το λινουρόν προκαλούν χρωμοσωματικές αλλοιώσεις από μόνα τους. Τα αποτελέσματα και οι επιπτώσεις που έχουν οι χημικές αυτές ενώσεις χορηγηθείσες *in vitro*, είτε μόνες τους είτε σε συνδυασμό, στις καλλιέργειες λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος παρατίθενται στον Πίνακα 9.

Συγκέντρωση	Ατραζίνη	Λινουρόν	Συνδυασμός
0 µg/ml	4,7±1,55	-----	-----
10 µg/ml	8,70±2,7	8,0±2,6	9,0±2,6
25 µg/ml	8,33±2,5	8,36±2,3	8,70±2,0
50 µg/ml	9,0±3,2	8,73±2,8	9,80±1,75

Πίνακας 10

Εξετάστηκε επίσης η γενεοτοξική δράση συνδυασμού των φυτοφαρμάκων Παρακουάτ και Quizalofop σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα μετά από in vitro έκθεση σε καλλιέργειες περιφερικού αίματος διάρκειας 24 και 48 ωρών. Τα αποτελέσματα στο επίπεδο ανταλλαγής αδελφών χρωματιδίων παρατίθενται στον Πίνακα 10.

Χημικός συνδυασμός	Συγκέντρωση (µg/ml)	SCEs/κύτταρο στη μετάφαση	Αριθμός αναλυθέντων κυττάρων
Μάρτυρας	0 µg/ml	4,92±2,2	49
Παρακουάτ+	0,5µg/ml+0,5µg/ml	10,96±4,3	42
Παρακουάτ+Κουαζαλοφόπ	0,5µg/ml+0,75µg/ml	9,62±4,1	39
Μανέμπ+ Κουαζαλοφόπ	0,5µg/ml+0,5µg/ml	10,3±4,4	39
Ατραζίνη+Λινουρόν	10µg/ml+50µg/ml	9,0±2,6	40
Ατραζίνη + Λινουρόν	10µg/ml+25µg /ml	6,7±2,0	40
Λινουρόν + Ατραζίνη	10µg/ml+25µg/ml	8,84±2,8	54
Λινουρόν + Ατραζίνη	10µg/ml+50µg/ml	9,0±2,7	45
Μανέμπ + Κουαζαλοφόπ + Παρακουάτ	0,5+0,5+0,5µg/ml	9,9±3,1	45

Πίνακας 11

### 3.4 Γενεοτοξική δράση Υδροκινόνης (Hydroquinone (HQ)) με τη μέθοδο ανάλυσης ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων στην G2 φάση

Η έκθεση των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων σε μεταβολίτες του βενζολίου έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί γενετικές βλάβες, όπως ανευπλοειδία, χρωμοσωμικές αποκλίσεις, καθώς και αύξηση στη συχνότητα ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων. Σε συνδυασμό με την υδροκινόνη έχει συνεργιστική δράση στη μυελοτοξικότητα και τη γενεοτοξικότητα, όπως έχει αποδειχθεί, στον μυελό των οστών ποντικών. Το βενζόλιο είναι μια αδιαμφισβήτητα καρκινογόνος ουσία που προκαλεί λευχαιμία, αιματοτοξικότητα και πιθανώς λέμφωμα. Η καρκινογόνος του δράση πιθανότατα εξαρτάται από τη μετατροπή του σε φαινόλη και υδροκινόνη, με τη δεύτερη να οξειδώνεται σε υψηλά τοξική 1,4-βενζοκινόνη στον μυελό των οστών.

Χρησιμοποιώντας κλασικές κυτταρογενετικές μεθόδους έχει διερευνηθεί η δράση της υδροκινόνης, αλλά οι μελέτες περιορίζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις της χημικής αυτής ουσίας, διότι σε υψηλές συγκεντρώσεις επηρεάζεται ο κυτταρικός κύκλος με αποτέλεσμα να έχουμε συγκέντρωση των κυττάρων στην G2 φάση. Πιθανολογείται ότι η υδροκινόνη προκαλεί αύξηση στη συχνότητα ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων και ενδεχομένως και χρωμοσωματικές αλλοιώσεις στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Αν επιβεβαιωθεί η γενοτοξική δράση της υδροκινόνης, αναμένεται ανάλογη δράση να έχουν και οι άλλοι μεταβολίτες του βενζολίου. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκε η δράση της υδροκινόνης στο κυτταρογενετικό επίπεδο, τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές συγκεντρώσεις της χημικής αυτής ουσίας. Εφαρμόζοντας τη νέα μεθοδολογία που αναπτύξαμε σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος υγιών δοτών, κατέστη δυνατή η απευθείας ανάλυση των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων και εκτίμηση των επαγομένων ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων (SCEs) όχι μόνο στη μετάφαση αλλά και στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Οι συγκεντρώσεις Υδροκινόνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 2-100  $\mu\text{M}$  στις καλλιέργειες περιφερικού αίματος και περισσότερες από 40 μεταφάσεις λεμφοκυττάρων αναλύθηκαν από δύο ανεξάρτητα πειράματα. Τα αποτελέσματα από αναλύσεις μεταφασικών κυττάρων παρατίθενται στον Πίνακα 12 και δείχνουν ότι η συχνότητα των SCEs ανά κύτταρο αυξάνει αυξανομένης της συγκέντρωσης Υδροκινόνης.

Συγκέντρωση Υδροκινόνης ( $\mu\text{M}$ )	Αριθμός SCEs / κύτταρο	Αριθμός κυττάρων που αναλύθηκαν
0	$5,7 \pm 2,7$	40
0	$6,5 \pm 2,9$	40
2	$8,4 \pm 2,5$	48
5	$8,0 \pm 3,0$	45
10	$7,5 \pm 3,0$	47
20	$9,8 \pm 4,1$	45
30	$9,4 \pm 3,0$	49
50	$10,4 \pm 4,2$	50
100	$13,4 \pm 2,2$	45
200	-	-

**Πίνακας 12:** Αριθμός των SCEs ανά κύτταρο στη μετάφαση, μετά από έκθεση σε Υδροκινόνη για 24 ώρες. Η τυπική απόκλιση από τους μέσους όρους έξι διαφορετικών δοτών έχει υπολογιστεί για κάθε πειραματικό σημείο.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 12, ο αριθμός των SCEs ανά κύτταρο στη μετάφαση αυξάνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της Υδροκινόνης, έως τη συγκέντρωση των 100  $\mu\text{M}$ . Η συγκέντρωση των 200  $\mu\text{M}$  Υδροκινόνης δεν επέτρεψε εντούτοις στα λεμφοκύτταρα να φθάσουν στη μετάφαση, ώστε να καταστεί δυνατή η ανάλυση ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων στη μετάφαση. Πιθανά τα κύτταρα να είχαν σταματήσει σε σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στην G2 φάση. Για να διερευνηθεί το φαινόμενο αυτό προκλήθηκε πρόωγη χρωμοσωματική συμπύκνωση στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Με τη μέθοδο αυτή έγινε δυνατή η ανάλυση των SCEs απευθείας στην G2 φάση, ακόμη και στην περίπτωση που τα κύτταρα είχαν εκτεθεί σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις Υδροκινόνης. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 13.



Συγκέντρωση Υδροκινόνης (μM)	Αριθμός SCEs / κύτταρο στη μετάφαση	Αριθμός SCEs / κύτταρο στη G2 φάση
0	5,5±2,7	5,6 ± 0,9
10	8,0±2,4	10,1 ± 0,8
20	9,0±2,1	11,6 ± 1,2
50	10,4±3,1	12,3 ± 1,7
100	11,9±3,3	13,5 ± 1,8
200	-	15,2 ± 1,5

**Πίνακας 13:** SCEs ανά κύτταρο στη μετάφαση και στη μεσόφαση (G2-φάση) με χρήση της πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης, μετά από έκθεση σε Υδροκινόνη για 48 ώρες. Οι τυπικές αποκλίσεις έχουν υπολογιστεί από τους μέσους όρους έξι διαφορετικών δοτών.

Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα της μελέτης για την επίδραση της Υδροκινόνης σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος, καθώς και τη συνεπίδραση με ιοντίζουσα ακτινοβολία παρατίθενται παρακάτω:

- Η υδροκινόνη προκαλεί ελάττωση του μιτωτικού δείκτη M.I. με την αύξηση της συγκέντρωσης της ουσίας στην καλλιέργεια.
- Η υδροκινόνη, χαρακτηρίστηκε κυτταροτοξική σε καλλιέργειες ολικού αίματος σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 0,5 mM.
- Στις περιπτώσεις συνεπίδρασης της υδροκινόνης με την ακτινοβολία., παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ελάττωση του M.I. συγκριτικά με τα δείγματα που εκτέθηκαν μόνο σε υδροκινόνη (χωρίς συνεπίδραση ακτινοβολίας).
- Η υδροκινόνη, προκαλεί αύξηση του αριθμού των SCEs στη μετάφαση. Συνεπίδραση υδροκινόνης με ιοντίζουσα ακτινοβολία (1 Gy), αυξάνει ακόμη περισσότερο τον αριθμό των SCEs.
- Σε πειράματα συνεπίδρασης γλουταραλδεϋδης και υδροκινόνης, παρατηρήθηκε συνεργιστική (αθροιστική) δράση στην ελάττωση του μιτωτικού δείκτη, στον αριθμό των SCEs καθώς και στον αριθμό των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων.
- Η υδροκινόνη προκαλεί ελάττωση της τιμής του R.I., γεγονός που φανερώνει την πιθανή επίδρασή της στον κυτταρικό κύκλο.
- Σε συγκεντρώσεις υδροκινόνης μεγαλύτερες ή ίσες των 30μM, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση ( $p < 0.05$ ) του χρωματιδικού τύπου αλλοιώσεων (όπως σπασίματα χρωματίδης) ενώ δεν καταγράφηκαν χρωμοσωματικού τύπου αλλοιώσεις (βλ. δικεντρικά).
- Μετά από συνεπίδραση υδροκινόνης με ιοντίζουσα ακτινοβολία (1 Gy) παρατηρήθηκε αθροιστική δράση και αύξηση του αριθμού των αλλοιώσεων (χρωματιδικού αλλά και χρωμοσωματικού τύπου).

### 3.5 Συνοπτική περιγραφή γενετοξικής δράσης άλλων χημικών παραγόντων του επαγγελματικού περιβάλλοντος

#### 1. Τριχλωροαιθυλένιο

- Το τριχλωροαιθυλένιο, σε δύο διαφορετικούς δότες, προκάλεσε αύξηση του μιτωτικού δείκτη (M.I.) με την αύξηση της συγκέντρωσης ενώ σε έναν άλλο δότη προκάλεσε ελάττωση του M.I.
- Το τριχλωροαιθυλενίου, προκάλεσε αιμόλυση στις κυτταροκαλλιέργειες σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες ή ίσες των 10 mM και 1mM αντίστοιχα.
- Παρουσία τριχλωροαιθυλενίου, δεν παρατηρήθηκαν χρωμοσωματικές αλλοιώσεις στη φάση της μετάφασης απουσία μεταβολικής ενεργοποίησης στην καλλιέργεια. Ωστόσο, παρατηρήθηκε σε όλους τους δότες (4) που μελετήθηκαν μία μικρή αύξηση των αλλοιώσεων (χρωματιδικού τύπου) στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου (παρουσία καλυκουλίνης).
- Το τριχλωροαιθυλένιο, δε φαίνεται να προκαλεί αύξηση του αριθμού των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματίδων (SCEs) ανά μετάφαση, συγκριτικά με τα δείγματα μάρτυρες.
- Η τιμή του δείκτη κυτταρικού διπλασιασμού (RI) δεν φαίνεται να επηρεάζεται παρουσία τριχλωροαιθυλενίου χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση.
- Το τριχλωροαιθυλένιο μετά από επίδραση 48 ωρών απουσία μεταβολικού ενεργοποιητή και παρουσία καλυκουλίνης, φαίνεται να προκαλεί καθυστέρηση των κυττάρων στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου.

#### 2. Τετραχλωροαιθυλένιο

- Μετά από επίδραση τετραχλωροαιθυλενίου σε διάφορες συγκεντρώσεις, παρατηρήθηκε ελάττωση του μιτωτικού δείκτη σε 2 διαφορετικούς δότες.
- Το τετραχλωροαιθυλενίου, όπως και το τριχλωροαιθυλένιο, κρίθηκε κυτταροτοξικό σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες ή ίσες των 10 mM και 1mM αντίστοιχα, προκαλώντας αιμόλυση στις καλλιέργειες και κυτταρικό θάνατο.
- Απουσία μεταβολικής ενεργοποίησης, δεν παρατηρήθηκαν χρωμοσωματικές αλλοιώσεις στη φάση της μετάφασης. Ωστόσο, όπως και στην περίπτωση του τριχλωροαιθυλενίου παρατηρήθηκε μία μικρή αύξηση των αλλοιώσεων (χρωματιδικού τύπου) στη φάση G2 του κυτταρικού.
- Απουσία μεταβολική ενεργοποίησης, δεν παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των SCEs ανά μετάφαση, συγκριτικά με τα δείγματα μάρτυρες.

- Το τετραχλωροαιθυλένιο, δε φαίνεται να επηρεάζει την τιμή του δείκτη κυτταρικού διπλασιασμού (RI).
- Το τετραχλωροαιθυλένιο, μετά από επίδραση 48 ωρών και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, δε φαίνεται να επιδρά στην πορεία του κυτταρικού κύκλου των T-λεμφοκυττάρων.

### 3. Γλουταραλδεΐδη

- Η γλουταραλδεΐδη, προκαλεί μικρή ελάττωση του M.I. με την αύξηση της συγκέντρωσης της ουσίας στην καλλιέργεια.
- Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες ή ίσες των 10-4M, η γλουταραλδεΐδη εμφανίζει κυτταροτοξικότητα.
- Σε πειράματα συνεπίδρασης γλουταραλδεΐδης και υδροκινόνης, παρατηρήθηκε συνεργατική (αθροιστική) δράση τόσο σε επίπεδο χρωμοσωματικών αλλοιώσεων όσο και σε επίπεδο SCEs.
- Σε ορισμένους δότες, αλλά όχι σε άλλους, παρατηρήθηκε πολλαπλασιαστική δράση μετά από επίδραση της γλουταραλδεΐδης σε συνδυασμό με ιοντίζουσα ακτινοβολία (1 Gy). Με βάση τα αποτελέσματα πιθανολογείται πως το φαινόμενο αυτό, σχετίζεται με την ακτινοευαισθησία του κάθε δότη. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω πειράματα για να διευκρινιστεί εάν η υπόθεση αυτή ευσταθεί.
- Η γλουταραλδεΐδη απουσία μεταβολικής ενεργοποίησης στις καλλιέργειες, δε φαίνεται να προκαλεί αλλοιώσεις στη φάση της μετάφασης ως προς τα δείγματα μάρτυρες.
- Ωστόσο, απουσία μεταβολικής ενεργοποίησης παρατηρήθηκε σε δύο δότες αύξηση του αριθμού των SCEs στη μετάφαση, συγκριτικά με τα δείγματα μάρτυρες.
- Η γλουταραλδεΐδη φαίνεται να παρουσιάζει συνεργατική δράση μετά από συνεπίδραση με υδροκινόνη και πολλαπλασιαστική δράση (σε ορισμένους δότες) με ιοντίζουσα ακτινοβολία.

### 4. 4-Υδροξυ-Βενζοϊκό Οξύ (Methyl Paraben)

- Παρουσία 4-υδροξυ-βενζοϊκού οξέος, σε καλλιέργειες ολικού αίματος υγιών δοτών, παρατηρείται ελάττωση του μιτωτικού δείκτη με την αύξηση της συγκέντρωσης του παράγοντα.
- Απουσία μεταβολικού ενεργοποιητή, δεν παρατηρήθηκε επαγωγή χρωμοσωματικών αλλοιώσεων στη φάση της μετάφασης (M) ως προς τα δείγματα μάρτυρες.
- Σε συγκεντρώσεις της ουσίας μεγαλύτερες ή ίσες του 1mM, μετά από επίδραση στην καλλιέρ-

γεια για 24 ώρες, παρατηρήθηκε σε ορισμένες μεταφάσεις (και όχι σε άλλες) μία αύξηση στον αριθμό των SCEs ως προς τα δείγματα μάρτυρες. Το φαινόμενο αυτό του «μωσαϊκισμού», ενδεχομένως να αποτελεί μία ένδειξη μεταλλαξιγόνου δράσης της εν λόγω χημικής ουσίας. Ωστόσο, κρίνεται απαραίτητη η επανάληψη των πειραμάτων αυτών, προκειμένου να διευκρινιστεί αν η υπόθεση αυτή ευσταθεί.

## 5. 2-Υδροξυ-1,4-Ναφθοκινόνη (Lawsonie)

- Παρουσία Lawsonie σε καλλιέργειες ολικού αίματος υγιών δοτών (χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση), παρατηρήθηκε ελάττωση του μιτωτικού δείκτη με την αύξηση της συγκέντρωσης του παράγοντα.
- Απουσία μεταβολικής ενεργοποίησης, δεν παρατηρήθηκε επαγωγή χρωμοσωματικών αλλοιώσεων ούτε στη φάση της μετάφασης (M), ούτε στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου.
- Μετά από επίδραση του παράγοντα για 48 ώρες και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση των καλλιιεργειών, δεν παρατηρήθηκε επίδραση στην πορεία του κυτταρικού κύκλου αλλά ούτε και στο ρυθμό διπλασιασμού (R.I.) των T-λεμφοκυττάρων.

## 3.6 Συχνότητα ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων και πολυμορφισμός του γονιδίου της τρानσφεράσης της γλουταθειόνης GSTT1

Οι γονότυποι, που είναι υπεύθυνοι για τη διαφορετική επιδεκτικότητα στους μεταλλαξιγόνους παράγοντες, σχετίζονται κυρίως με ένζυμα επιδιόρθωσης ή αποτοξικοποίησης και είναι γνωστό ότι η ενδογενής ευαισθησία στην επαγωγή μεταλλάξεων και καρκινογένεσης είναι διαφορετική από άτομο σε άτομο, ακόμα και όταν τα άτομα αυτά εκτίθενται στους ίδιους παράγοντες. Οι τρानσφεράσες της γλουταθειόνης S (GSTs) είναι μια οικογένεια κυτταροπλασματικών ενζύμων που εμπλέκονται στην αποτοξικοποίηση ενεργών καρκινογόνων. Δύο μέλη της οικογένειας τρानσφερασών της γλουταθειόνης, τα γονίδια GSTM1 και GSTT1, που είναι προϊόντα γενετικού πολυμορφισμού, εμφανίζονται σε υψηλότερο ποσοστό γονότυπο με ομόζυγο έλλειμμα του φυσιολογικού γονιδίου. Έχει αναφερθεί ότι τα ελλείμματα αυτά εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου στους πνεύμονες και την ουροδόχο κύστη. Ιδιαίτερα, ο γονότυπος GSTT1 φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα καρκίνου του εγκεφάλου, καθώς και με μυελοδυσπλασίες. Επειδή δε ο γονότυπος με ομόζυγο έλλειμμα του φυσιολογικού γονιδίου GSTT1 σχετίζεται με ελλιπή αποτοξικοποίηση γενοτοξικών παραγόντων, πιθανά να σχετίζεται και με ελλιπή μηχανισμό επισκευής του DNA μέσω του μηχανισμού του ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombinational repair). Επομένως, γονότυπος με ομόζυγο έλλειμμα του φυσιολογικού γονιδίου GSTT1 ενδέχεται να συμβάλλει στην αύξηση της συχνότητας ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων (SCEs) μετά από έκθεση σε γενοτοξικούς παράγοντες. Τα αποτελέσματα από

μα σειρά πειραμάτων για τον έλεγχο της υπόθεσης αυτής φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 14 και συνοψίζονται στα κάτωθι:

- Από την ανάλυση του γενετικού υλικού 40 διαφορετικών δοτών με τη μεθοδολογία PCR βρέθηκαν 35 δότες οι οποίοι φέρουν το γονίδιο GSTT1 και 5 οι οποίοι εμφανίζουν αρνητικό γονότυπο ως προς το GSTT1. Μετά από σύγκριση του ενδογενούς αριθμού των SCEs/κύτταρο στους δότες αυτούς, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στον αριθμό των SCEs. Το αποτέλεσμα αυτό, φανερώνει πως η ενδογενής ευαισθησία κάθε ατόμου σε επίπεδο SCEs δε σχετίζεται με γενετικό πολυμορφισμό στο υπό μελέτη γονίδιο.
- Μετά από σύγκριση του αριθμού των SCEs και των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων μεταξύ ενός GSTT1+ και ενός GSTT1- δοτών σε καλλιέργειες που έχουν υποστεί έκθεση σε βενζο[α]πυρένιο 0,01mM, δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στον αριθμό των SCEs/κύτταρο. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ούτε στον αριθμό των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε τόσο στη φάση της μετάφασης όσο και στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δοτών.

A.A.	Φύλο	Ηλικία	GSTT1	SCEs / κύτταρο ±S.D.*
1	Άρρεν	31	+	7,40±0,7
3	Θήλυ	35	-	8,47±1,1
4	Άρρεν	25	+	7,60±0,8
5	Άρρεν	26	+	6,80±0,7
6	Άρρεν	29	+	5,10±0,9
7	Θήλυ	37	+	7,60±0,8
8	Θήλυ	35	+	8,10±1,1
9	Θήλυ	22	+	6,50±0,9
10	Θήλυ	26	+	7,45±0,8
11	Άρρεν	27	+	6,32±0,9
12	Άρρεν	28	+	6,97±0,7
13	Άρρεν	34	-	7,80±0,9
14	Θήλυ	29	+	6,56±0,8
15	Άρρεν	38	+	5,70±0,7
16	Άρρεν	26	+	5,56±0,9
17	Άρρεν	28	+	7,35±1,0
18	Άρρεν	27	+	6,52±0,9
19	Άρρεν	29	+	6,18±0,8
20	Θήλυ	25	+	8,14±0,9
21	Θήλυ	24	+	5,52±0,7
22	Θήλυ	26	+	6,20±0,9
23	Θήλυ	22	-	5,60±0,9
24	Θήλυ	29	+	6,20±0,8
25	Θήλυ	29	+	4,69±0,6
26	Θήλυ	26	+	5,12±0,9
27	Θήλυ	29	+	6,59±0,8
28	Άρρεν	25	+	5,80±0,7
29	Άρρεν	25	+	5,90±0,7
30	Θήλυ	28	+	6,20±0,8
31	Άρρεν	24	+	6,20±0,9

Πίνακας 14

\*Οι τυπικές αποκλίσεις αναφέρονται στη μέση τιμή από δύο ή τρία ανεξάρτητα πειράματα

## 4

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 4.1 Μια νέα κυτταρογενετική μέθοδος για την εκτίμηση της γενετοξικής δράσης χημικών παραγόντων που προκαλούν καθυστέρηση των κυττάρων στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου

Η γενετοξική δράση μεταλλαξιγόνων και πιθανά καρκινογόνων ουσιών έχει μελετηθεί τόσο με *in vitro* όσο και με *in vivo* πειράματα χρησιμοποιώντας διαφορετικά συστήματα ελέγχου και ανάλυσης. Η κλασική μεθοδολογία ανάλυσης ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων (Sister Chromatid Exchanges, SCEs) σε χρωμοσωματικά παρασκευάσματα, κατόπιν καλλιέργειας ανθρωπίνων λεμφοκυττάρων, θεωρείται ως ένας ευαίσθητος δείκτης για τον έλεγχο έκθεσης και γενετοξικής δράσης διαφόρων φυσικών και χημικών παραγόντων. Για τον λόγο αυτό η ανάλυση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος χρησιμοποιείται ευρέως και σήμερα ως μέθοδος κυτταρογενετικής εξέτασης και βιοπαρακολούθησης εκτιθεμένων εργαζομένων σε μεταλλαξιγόνους και καρκινογόνους παράγοντες.

Στην εφαρμογή της μεθόδου ανάλυσης ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων υπάρχουν εντούτοις δύο σημαντικά πρακτικά προβλήματα. Πρώτον, η ανάλυση της συχνότητας των SCEs γίνεται με εξέταση κυττάρων που είναι αποκλειστικά στη μετάφαση. Αυτό προϋποθέτει ότι τα κύτταρα θα πρέπει να εκτεθούν σε χαμηλές μη κυτταροτοξικές δόσεις ώστε να μη διαταραχθεί σημαντικά ο κυτταρικός τους κύκλος και ιδιαίτερα η μετάβασή τους στη μίτωση. Διαφορετικά, τα κύτταρα που τυχόν θα καθυστερήσουν στην G2 φάση και γενικά στον κυτταρικό τους κύκλο μετά από έκθεση σε γενετοξικούς παράγοντες δεν θα περιλαμβάνονται στην ανάλυση. Αυτό αποτελεί ένα σοβαρό μειονέκτημα της μεθοδολογίας, καθότι τα κύτταρα που προχωρούν στη μετάφαση χωρίς καθυστέρηση είναι κυρίως αυτά με τις λιγότερες αλλοιώσεις. Ενδεχομένως λοιπόν η συμβατική ανάλυση SCEs στη μετάφαση να υποεκτιμά ή και να οδηγεί σε λανθασμένα συμπεράσματα όσον αφορά τη γενετοξική δράση ορισμένων μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων παραγόντων. Το δεύτερο μειονέκτημα της συμβατικής μεθόδου ανάλυσης SCEs στη μετάφαση είναι οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται κάτω από ίδιες πειραματικές συνθήκες στον αριθμό των SCEs ανά κύτταρο σε δείγματα περιφερικού αίματος διαφορετικών ατόμων (Controls), που δεν έχουν δηλαδή εκτεθεί σε συγκεκριμένο μεταλλαξιγόνο παράγοντα. Επίσης, ορισμένες φορές αναφέρονται από διαφορετικά εργαστήρια διακυμάνσεις και αντιφατικά αποτελέσματα για παράγοντες που χαρακτηρίζονται ως πιθανά καρκινογόνοι.

Για την επίλυση των προβλημάτων αυτών απαιτείται μία κυτταρογενετική μέθοδος που να επιτρέπει την οπτική απεικόνιση και ταυτόχρονη ανάλυση όχι μόνο των μεταφασικών χρωμοσωμάτων αλλά και των χρωμοσωμάτων της μεσόφασης. Η οπτική απεικόνιση των μεσοφασικών χρωμοσωμάτων και

η χρήση τους για τη βιολογική παρακολούθηση, μετά από έκθεση σε γενοτοξικούς παράγοντες, πραγματοποιήθηκαν για πρώτη φορά με την ανάπτυξη μιας μεθόδου κυτταρικής σύντηξης και πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης (PCC) σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος. Από τότε, πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν τη μεθοδολογία αυτή για την ανάλυση χρωμοσωμικών αλλοιώσεων σε μεσοφασικά κύτταρα και γενικά η μεθοδολογία PCC έχει αποδειχθεί ένα ισχυρό κυτταρογενετικό, κυτταροκινητικό εργαλείο για τη διερεύνηση των παραγόντων που εμπλέκονται στη μετατροπή της βλάβης στο DNA σε ορατές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, και που ενδεχομένως καθορίζουν και την ενδογενή ευαισθησία που παρατηρείται σε διαφορετικά άτομα του πληθυσμού μετά από έκθεση σε διάφορους γενοτοξικούς παράγοντες.

Στο πλαίσιο της εργασίας αυτής αναπτύχθηκε μια νέα μεθοδολογία ανάλυσης ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων σε κύτταρα στη μεσόφαση και ιδιαίτερα στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου και η οποία όμως δεν βασίζεται στο φαινόμενο της κυτταρικής σύντηξης, αλλά στην επαγωγή πρόωρης χρωμοσωμικής συμπύκνωσης που πραγματοποιείται με τη χημική ουσία Calyculin-A. Χρησιμοποιώντας Calyculin-A, που έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας ισχυρός αναστολέας της φωσφατάσης τύπου 1 και 2A, επιτυγχάνεται η πρόωρη χρωμοσωμική συμπύκνωση μεσοφασικών κυττάρων και ιδιαίτερα εκείνων που λόγω της έκθεσης τους σε γενοτοξικούς παράγοντες καθυστερούν στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου. Στη συνέχεια, η οπτική απεικόνιση και ανάλυση των SCEs στα επαγόμενα πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα της G2 φάσης επιτυγχάνεται με την εφαρμογή της τεχνικής fluorescent-plus-Giemsa (FPG). Η κυτταρογενετική αυτή προσέγγιση αποδείχθηκε περισσότερο ευαίσθητη από τη συμβατική μέθοδο ανάλυσης των SCEs στα μεταφασικά κύτταρα, καθώς υπερπηδά πολλές από τις δυσκολίες της και συμβάλλει κατά μοναδικό τρόπο στην αξιολόγηση της γενοτοξικής δράσης πιθανών καρκινογόνων ουσιών που προκαλούν καθυστέρηση του κυτταρικού κύκλου στην G2 φάση. Με τη μέθοδο αυτή κατέστη δυνατόν να μελετηθεί η γενοτοξική δράση ακόμη και υψηλών δόσεων πιθανά καρκινογόνων ουσιών. Επίσης εξετάστηκε εάν η διακύμανση που παρατηρείται στις αυθόρμητες ανταλλαγές των αδελφών χρωματιδίων σε διαφορετικά υγιή άτομα (controls) οφείλεται σε διαφορές κινητικής του κυτταρικού κύκλου των λεμφοκυττάρων τους ή σε κάποια άλλη βιολογική βάση ενδογενούς ευαισθησίας ή και διαφοροποίησης των επισκευαστικών τους ενζύμων.

Για την προτυποποίηση ενός απλού πρωτοκόλλου ανάλυσης SCEs σε G2-PCCs και τη διακρίβωση πιθανούς υποεκτίμησης της μεταλλαξιγόνου δράσης ορισμένων χημικών ουσιών όταν εφαρμόζεται η συμβατική ανάλυση SCEs, πραγματοποιήθηκαν τέσσερις σειρές πειραμάτων. Στην πρώτη σειρά αναπτύχθηκε το πρωτόκολλο και διερευνήθηκαν οι καταλληλότερες συνθήκες για την επαγωγή PCC και την ανάλυση των SCEs σε G2-PCCs λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος. Έκθεση σε 50 nM calyculin-A για 2 ώρες καθώς και σε 100 nM για μία ώρα είχαν ως αποτέλεσμα το υψηλότερο ποσοστό κυττάρων με πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα. Εντούτοις, τα χρωμοσώματα των περισσότερων κυττάρων γίνονται ασαφή και μικροσκοπικά όταν καλλιέργεια αίματος για 72 ώρες εκτίθεται στην calyculin-A για περισσότερο από μία ώρα. Για τους λόγους αυτούς και λαμβάνοντας υπόψη τόσο τη μορφολογία των πρόωρων συμπυκνωμένων χρωμοσωμάτων όσο και το ποσοστό επαγωγής τους, η έκθεση σε 50 nM calyculin-A για μία ώρα κρίθηκε ως η καλύτερη συνθήκη για την επαγωγή PCC και την ανάλυση SCEs στην G2-φάση των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος.

Η δεύτερη σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε για να εξετάσουμε κατά πόσον πιθανά καρκι-



νογόνες ουσίες θα εμφανίσουν γενεοτοξική δράση σε επίπεδα έκθεσης που καθυστερούν τα λεμφοκύτταρα στην G2 φάση, καθώς και κατά πόσο η αύξηση των SCEs είναι δόσοεξαρτώμενη στην περιοχή των υψηλών δόσεων. Όταν χρησιμοποιήθηκαν οι χημικές ουσίες ατραζίνη και υδροκινόνη στις καλλιέργειες αίματος σε υψηλές συγκεντρώσεις, δεν ήταν δυνατή η ανάλυση των επαγομένων SCEs με τη χρήση της συμβατικής μεθοδολογίας καθώς οι υψηλές συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών καθυστέρησαν τα κύτταρα στην G2 φάση με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν κύτταρα στη μετάφαση. Με την εφαρμογή εντούτοις της νέας μεθοδολογίας κατέστη δυνατή η μελέτη της γενεοτοξικής δράσης και η ποσοτικοποίηση των SCEs ανά κύτταρο στη φάση G2, ακόμα και για δόσεις που ξεπερνούσαν τα όρια της τοξικότητας. Στην περίπτωση της ατραζίνης, η αύξηση της χημικής συγκέντρωσης από 100 σε 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  δεν συνεπαγόταν αύξηση στη συχνότητα SCEs, όπως μετρήθηκε σε πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα λεμφοκυττάρων στη φάση G2. Αυτό το εύρημα δεν υποστηρίζει επομένως τη γενεοτοξική δραστηριότητα αυτής της ουσίας.

Στην τρίτη ομάδα πειραμάτων εφαρμόστηκε η νέα κυτταρογενετική μεθοδολογία για να διερευνηθεί κατά πόσον η ανάλυση SCEs σε μεταφασικά κύτταρα υποεκτιμά την πιθανότητα γενεοτοξικότητας διαφόρων ύποπτων καρκινογόνων ουσιών. Με τη μέθοδο ανάλυσης SCEs σε G2-PCC μετρήθηκε πολύ υψηλότερη συχνότητα SCEs ανά κύτταρο από ότι στα κύτταρα στη μετάφαση. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι με τη χρήση της συμβατικής ανάλυσης SCEs σε μεταφασικά κύτταρα υποεκτιμάται η πιθανότητα μεταλλαξιγένεσης των χημικών ουσιών που προσωρινά σταματούν τα κύτταρα στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου.

Στην τέταρτη ομάδα πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της κινητικής του κυτταρικού κύκλου στην απόκλιση που παρατηρείται στον αριθμό ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων σε μη εκτεθειμένα δείγματα (αυθόρμητες SCEs) από διαφορετικούς ανθρώπους. Κατά μέσο όρο η συχνότητα των SCEs που μετράται στη φάση G2 είναι σημαντικά υψηλότερη ( $0,01 < p < 0,001$ ) από εκείνη που μετράται στη μετάφαση. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μικρότερου βαθμού απόκλιση των SCEs όταν η ανάλυσή τους πραγματοποιήθηκε σε πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα στη φάση G2 από ότι στα μεταφασικά κύτταρα. Το φάσμα των αυθόρμητων ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων ανά κύτταρο σε υγιή μη εκτεθειμένα άτομα κυμαίνεται μεταξύ 4,5 - 10,5 με συντελεστή απόκλισης 28,3% όταν η ανάλυση έγινε σε μεταφασικά κύτταρα, ενώ το φάσμα ήταν 7,0 - 8,5 με συντελεστή απόκλισης 7,6% όταν οι SCEs μετρήθηκαν στη μεσόφαση σε G2-PCCs. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ένα σημαντικό μέρος της υπάρχουσας απόκλισης στη συχνότητα SCEs που παρατηρείται μεταξύ απόμων του πληθυσμού μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στην κινητική του κυτταρικού κύκλου των λεμφοκυττάρων περισσότερο, παρά σε βιολογικούς παράγοντες και ενδογενή ευαισθησία στην αλληλεπίδραση με γενεοτοξικούς παράγοντες.

Συμπερασματικά, στο κεφάλαιο αυτό της παρούσας μελέτης προτείνεται ένα απλό πρωτόκολλο για την ανάλυση των SCEs σε πρόωρα συμπυκνωμένα λεμφοκύτταρα G2 φάσης, το οποίο αντιπαρέχεται τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει η συμβατική ανάλυση των SCEs σε μεταφασικά κύτταρα. Η νέα αυτή κυτταρογενετική προσέγγιση επιτρέπει την ανάλυση των SCEs σε κύτταρα που έχουν καθυστερήσει στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου και εφαρμόζεται εύκολα αφού απαιτεί απλώς τον καθιερωμένο εξοπλισμό ενός εργαστηρίου κυτταρογενετικής. Μπορεί επομένως να εφαρμοστεί στα περισσότερα εργαστήρια βιοπαρακολούθησης, με σκοπό την εκτίμηση της γενεοτοξικής επίδρασης χη-

μικής έκθεσης ακόμη και σε επίπεδα δόσεων που καθυστερούν τα κύτταρα στην G2 φάση. Ειδικότερα, ίσως είναι η μοναδική κυτταρογενετική μέθοδος για τη διερεύνηση του κατά πόσον η συμβατική μέθοδος ανάλυσης των SCEs σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος υποεκτιμά τη γενετοξική δράση διαφόρων παραγόντων που θεωρούνται ως πιθανά μεταλλαξιγόνοι ή καρκινογόνοι. Η προτεινόμενη μεθοδολογία συμβάλλει επίσης με μοναδικό τρόπο στην διευκρίνιση της βιολογικής βάσης στην οποία οφείλεται η διακύμανση της συχνότητας των SCEs που παρατηρείται μεταξύ ατόμων του πληθυσμού κάτω από τις ίδιες συνθήκες έκθεσης.

## 4.2 Ανάλυση ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων σε πρόωρα συμπυκνωμένα χρωματοσώματα λεμφοκυττάρων στην G2-φάση του κυτταρικού κύκλου μετά από έκθεση στο ζιζανιοκτόνο ατραζίνη (atrazine)

Παρόλο που τα δεδομένα για τη μεταλλαξιγόνο και καρκινογόνο δράση των τριαζινών είναι αντιφατικά, η έκθεση των ανθρώπων σε αυτά τα ζιζανιοκτόνα θα συνεχιστεί και ενδεχομένως να αυξηθεί τα επόμενα χρόνια. Για τις ΗΠΑ μόνο εκτιμάται ότι 90-121 εκατομμύρια μονάδες δραστηριότητας χρησιμοποιούνται κάθε χρόνο. Οι περισσότερες έρευνες που έχουν γίνει υποστηρίζουν ότι οι τριαζίνες δεν έχουν καθόλου ή έχουν ελάχιστη γενετοξική δράση. Εντούτοις δύο έρευνες με τη μέθοδο SCG (alkaline single cell gel assay) έχουν δείξει ότι η ατραζίνη μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA και σε ερυθροκύτταρα γυρίνου. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η ατραζίνη προκαλεί βλάβες στο DNA με και χωρίς την S9 ενεργοποίηση σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων *in vitro*. Είναι φανερό ότι απαιτείται περαιτέρω μελέτη και εκτίμηση της μεταλλαξιγόνου και καρκινογόνου δράσης της ατραζίνης.

Με σκοπό να μελετήσουμε τη γενετοξικότητα της ατραζίνης και την υπόθεση ότι σε υψηλές δόσεις μπορεί να έχουμε δόσοεξαρτώμενη απόκριση, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε μια νέα κυτταρογενετική μέθοδο για τον υπολογισμό των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων. Συγκεκριμένα εξετάστηκε αν η γενετοξική δράση της ατραζίνης μπορεί να υπολογιστεί σε λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στην G2 φάση ακόμα και σε συγκεντρώσεις που ξεπερνούν τα κυτταροτοξικά όρια της ατραζίνης. Τα αποτελέσματα στον Πίνακα 5 δείχνουν ότι σε υψηλές δόσεις της ατραζίνης δεν μπορεί να γίνει εκτίμηση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων με την κλασική μέθοδο στη μετάφαση, διότι τα κύτταρα σταματούν στη G2 φάση. Με τη χρήση της νέας μεθόδου τα επίπεδα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων μπορούν να υπολογιστούν σε G2-PCC λεμφοκύτταρα. Τα αποτελέσματα στον Πίνακα 6 δείχνουν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της ατραζίνης από 120-220  $\mu\text{g}/\text{ml}$  δεν προκαλεί αντίστοιχη αύξηση της συχνότητας των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων σε G2-PCC λεμφοκύτταρα και επομένως δεν υπάρχει δόσοεξαρτώμενη απόκριση στο φαινόμενο του ομόλογου ανασυνδυασμού. Συνεπώς τα πειράματά μας δεν δείχνουν γενετοξική δράση της ατραζίνης.

Τα αποτελέσματα που εμφανίζονται στον Πίνακα 7 δείχνουν ότι η μεγαλύτερη τιμή των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων ανά κύτταρο σημειώθηκε στα κύτταρα που βρίσκονται στην G2 φά-

ση, σε σχέση με τα μεταφασικά κύτταρα. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά μπορούμε να πούμε ότι η ανάλυση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων σε G2-PCC λεμφοκύτταρα είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος από την κλασική. Κατά μέσο όρο η συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων σε G2-PCC λεμφοκύτταρα είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερη ( $0,01 < p < 0,001$ ) σε σχέση με τη συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων στη μετάφαση. Στον Πίνακα 7 φαίνονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων που έγιναν για να ελέγξουμε αν οι μεταβολές στην κινητική του κυτταρικού κύκλου μπορούν να επηρεάσουν τη συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων σύμφωνα με την κλασική ανάλυση στη μετάφαση. Μικρότερη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε κατά την ανάλυση G2-PCC κυττάρων σε σχέση με τα μεταφασικά κύτταρα. Το εύρος των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων ανά κύτταρο από υγιείς δότες μετά από έκθεση σε ατραζίνη ήταν 5,5-9,9 με συντελεστή απόκλισης 20% σε μεταφασικά κύτταρα, ενώ το αντίστοιχο εύρος στα G2-PCC κύτταρα ήταν 8,4-10,4 με συντελεστή απόκλισης 8,5%.

Συμπερασματικά, η χρήση ενός απλού πρωτοκόλλου για την ανάλυση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων σε G2-PCC λεμφοκύτταρα επιτρέπει την εκτίμηση της ενδεχόμενης γενετοξικότητας της ατραζίνης, ακόμα και σε υψηλές δόσεις. Παρόλο που στις χαμηλές συγκεντρώσεις της ατραζίνης η συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων μας δείχνει στατιστικά σημαντική αύξηση της μεταλλαξιγόνου δράσης της ατραζίνης, σε υψηλές συγκεντρώσεις (50-200  $\mu\text{g/ml}$ ) δεν εμφανίζεται η αναμενόμενη γενετοξικότητα. Καθώς η δημιουργία των ανταλλαγών μεταξύ των αδελφών χρωματιδίων είναι μια ευαίσθητη μέθοδος και φαίνεται να επηρεάζεται από τη φάση και την κινητική του κυτταρικού κύκλου, είναι πιθανό ένα σημαντικό μέρος των αποκλίσεων των αποτελεσμάτων σχετικά με τη μεταλλαξιγόνο δράση της ατραζίνης, να οφείλεται σε διαφορές της κατάστασης των λεμφοκυττάρων *in vitro*.

### 4.3 Έλεγχος γενετοξικής δράσης των φυτοφαρμάκων Παρακουάτ, Μανέμπ, και συνδυασμού φυτοφαρμάκων Ατραζίνη, Κουζαλοφρόπ και Λινουρόν

Το ευρέως διαδεδομένο φυτοφάρμακο παρακουάτ αξιολογήθηκε για να ελεγχθεί η τυχόν γενετοξική του δράση σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος. Ο πειραματικός σχεδιασμός επικεντρώθηκε στο να εξετάσουμε εάν υψηλές συγκεντρώσεις του παρακουάτ μπορούν να προκαλέσουν, ανάλογα με τη δόση, αύξηση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων (SCEs) και επομένως δόσοεξαρτώμενη αύξηση περιστατικών επισκευής του DNA με τον μηχανισμό του ανασυνδυασμού των ομόλογων περιοχών του γονιδιώματος. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του φυτοφαρμάκου (0,00 / 0,50 / 0,75 mM) και δείγματα αίματος από δύο διαφορετικούς υγιείς δότες (α,β). Επίσης, διερευνήθηκε αν η γενετοξική δράση του παρακουάτ μπορεί να εκτιμηθεί στη φάση G2 ακόμα και μετά από εκθέσεις σε υψηλές συγκεντρώσεις οι οποίες καθυστερούν τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G2.

Τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον Πίνακα 8 αποδεικνύουν ότι αυξανόμενη της συγκέ-

ντρωσης αυξάνεται και ο αριθμός των SCEs ανά κύτταρο και ότι το παρακουάτ προκαλεί μικρή αλλά σημαντική αύξηση στη συχνότητα ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων. Σε αυτά τα πειράματα και σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από μία, βρέθηκε ότι οι επιπτώσεις της χημικής ουσίας στο κυτταρογενετικό επίπεδο εξαρτώνται από την ποσότητα της δόσης. Στην επόμενη σειρά πειραμάτων εξετάσαμε εάν η γενετοξικότητα του παρακουάτ μπορεί να εκτιμηθεί στη φάση G2, ακόμα και μετά από εκθέσεις σε υψηλές συγκεντρώσεις του φυτοφαρμάκου, οι οποίες προκαλούν καθυστέρηση και συγκέντρωση των κυττάρων στη φάση αυτή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν χρησιμοποιήθηκε πρόωρη χρωμοσωμική συμπύκνωση, ώστε να γίνουν οι αναλύσεις απευθείας στην G2 φάση, παρατηρήθηκε μικρή διακύμανση στη συχνότητα των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων για διαφορετικούς δότες και διαφορετικές συγκεντρώσεις κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε η κλασική μέθοδος ανάλυσης ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων στη μετάφαση, τα αποτελέσματα παρουσίασαν σημαντική διακύμανση για τους διαφορετικούς δότες περιφερικού αίματος.

Ανάλογες αναφορές έχουν γίνει για το φυτοφάρμακο γραμοξόν μετά από πειράματα *in vitro*. Έχουν αναφερθεί χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε διαφορετικά στάδια μίτωσης. Τα ως τώρα δεδομένα δείχνουν ότι το φυτοφάρμακο γραμοξόν πρέπει να θεωρείται μεταλλαξιγόνο.

Για τη γενετοξική δράση του φυτοφαρμάκου Μανέμπ έχουν γίνει εκτεταμένες έρευνες χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους ανάλυσης. Τα αποτελέσματα όμως που έχουν προκύψει από τις αξιολογήσεις αυτές δε συμφωνούν απόλυτα και οι απόψεις δίστανται. Σε γενικές γραμμές υπάρχουν αρκετά στοιχεία ότι το μανέμπ δεν είναι μεταλλαξιγόνο σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα. Επιπλέον, οι μακροχρόνιες μελέτες που έγιναν για το μανέμπ δεν έδειξαν καμία καρκινογόνο επίπτωση, συμφωνώντας έτσι με τις παρατηρήσεις που έχουν γίνει σε *in vivo* μελέτες. Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, μετά την ενεργοποίηση με S9 πιθανώς ξεκινάει η διαδικασία αποτοξίνωσης γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει το ότι παίρνουμε καλύτερα αποτελέσματα. Επίσης, το μανέμπ δεν προκαλεί μεταλλάξεις σε επίπεδο δομικής χρωμοσωμικής βλάβης σε αρουραίους, χάμστερ και ποντίκια. Σε πιο εξειδικευμένες μελέτες για κληρονομική μεταλλαξιγόνο δραστηριότητα σε κύτταρα μικροβίων ή ποντίκια βρέθηκε να είναι αρνητική. Και αυτές οι μελέτες επιβεβαιώνουν ότι το μανέμπ δεν προκαλεί χρωμοσωμική βλάβη. Εντούτοις, σε άλλες εργασίες έχουν αναφερθεί χρωμοσωματικές ανωμαλίες στο μυελό των οστών ποντικών. Οι αλλοιώσεις αυτές συμπεριελάμβαναν κυρίως χρωματιδικές αλλοιώσεις και ανταλλαγές, οδηγώντας γενικά στο συμπέρασμα ότι το μανέμπ επάγει χρωμοσωματικές και μοριακές αλλοιώσεις σε επίπεδο DNA, RNA και πρωτεϊνικής σύνθεσης.

Για να διευκρινιστεί η δράση του φυτοφαρμάκου αυτού στο κυτταρογενετικό επίπεδο χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος και η μεθοδολογία ανάλυσης ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων (SCEs) στη μετάφαση, καθώς και στη μεσόφαση χρησιμοποιώντας Calyculin A. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 9 δείχνουν αφ' ενός ότι υπάρχει θετική απόκριση στη συχνότητα ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων αυξανόμενης της δόσης του φυτοφαρμάκου μανέμπ. Εντούτοις, δεν παρατηρήθηκαν δομικές ή χρωμοσωματικές αλλοιώσεις μετά από κλασική ανάλυση με χρώση Giemsa. Με την εφαρμογή της νέας μεθόδου ανάλυσης στη μεσόφαση, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει μικρή διακύμανση στη συχνότητα ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων για διαφορετικούς δότες και διαφορετικές συγκεντρώσεις στη φάση G2. Αντίθετα, όταν χρησι-

μοποιήθηκε η κλασική μέθοδος ανάλυσης ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων στη μετάφαση τα αποτελέσματα παρουσίασαν σημαντική διακύμανση για τους διαφορετικούς δότες περιφερικού αίματος.

Όσον αφορά τις μελέτες στο κυτταρογενετικό επίπεδο που έχουν αναφερθεί σε συνδυασμούς φυτοφαρμάκων που περιέχουν ατραζίνη, τα πορίσματά τους δεν θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντικά λόγω των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η μελέτη των επιπτώσεων της συνδυασμένης έκθεσης ατραζίνης και λινουρόν σε καλλιέργειες κυττάρων ανθρώπινου περιφερικού αίματος ή ποντικών, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει συνεργιστική δράση σε αυτές τις χημικές ουσίες όσον αφορά την επαγωγή χρωμοσωματικών αλλοιώσεων. Εντούτοις, όταν εξετάσαμε τον συνδυασμό της έκθεσης σε ατραζίνη και λινουρόν δεν προέκυψε καμία συνεργιστική ή προσθετική δράση, ενώ ούτε από την μεμονωμένη εξέτασή τους προέκυψε ότι προκαλούν χρωμοσωματικές αλλοιώσεις. Επιπρόσθετα σε καμία περίπτωση δεν υπήρξε σημαντική αύξηση στη συχνότητα ανταλλαγής αδελφών χρωματιδίων. Στη συνδυασμένη έκθεση η συχνότητα ανταλλαγών ήταν ελάχιστα υψηλότερη από ότι στη μεμονωμένη έκθεση. Τα αποτελέσματα από την συνδυασμένη έκθεση ήταν σημαντικά υψηλότερα από ότι στο control. Ο άλλος συνδυασμός, των φυτοφαρμάκων παρακουάτ και κουζαλοφόπ, σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων δεν έδειξε επίσης συνεργιστική ή προσθετική δράση.

#### **4.4 Γενοτοξική δράση Υδροκινόνης με τη μέθοδο ανάλυσης ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων στην G2 φάση**

Η γενοτοξικότητα και ιδιαίτερα η μεταλλαξιγόνος και καρκινογόνος δράση της υδροκινόνης που βρίσκεται σε πετρελαιοειδή και σε βενζινοειδή διερευνούνται και είναι το αντικείμενο πολλών μελετών για αρκετά χρόνια τώρα. Γενικά, από τα *in vivo* πειραματικά δεδομένα συμπεραίνεται ότι οι επιπτώσεις εξαρτώνται τόσο από τον τρόπο έκθεσης, όσο και από τη διάρκεια της έκθεσης και τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας. Σε πειράματα με ποντίκια έχει αναφερθεί ότι η ενδοπεριτονιακή χορήγηση της υδροκινόνης έχει γενοτοξική δράση και προκαλεί χρωμοσωμικές αλλοιώσεις στον μυελό των οστών. Εντούτοις, η έκθεση μέσω της τροφικής αλυσίδας δεν παρουσιάζει αυτές τις συνέπειες και οι μελέτες που αναφέρονται στις κυτταρογενετικές επιπτώσεις και χρωμοσωματικές αλλοιώσεις έχουν οδηγήσει σε αντιφατικά συμπεράσματα. Σε αρκετές εργασίες με ανθρώπινα λεμφοκύτταρα δεν παρατηρήθηκε η υδροκινόνη να έχει γενοτοξική δράση. Εντούτοις, έχει αναφερθεί η επαγωγή χρωμοσωματικών αλλοιώσεων, ανευπλοειδίας, μικροπυρήνων και ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων. Επίσης, από άλλες μελέτες εξάγεται το συμπέρασμα ότι η υδροκινόνη, ως μεταβολίτης του βενζολίου, προκαλεί αιματοτοξικότητα, μυελοτοξικότητα και λευχαιμία. Η καρκινογόνος δράση του ευρέως διαδεδομένου βενζολίου, πιθανότατα εξαρτάται από τη μετατροπή του σε φαινόλη και υδροκινόνη, με τη δεύτερη να οξειδώνεται σε υψηλά τοξική 1,4-βενζοκινόνη στον μυελό των οστών. Ο μηχανισμός όμως της καρκινογόνου δράσης της Υδροκινόνης δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Ενδεχομένως για την ερμηνεία των αντιφατικών αποτελεσμάτων που αναφέρονται στη γενοτοξική δράση της υδροκινόνης να πρέπει να ληφθεί υπόψη η διακύμανση στην ενδογενή ευαισθησία που παρατηρείται μεταξύ των μελών του πληθυσμού.

Η υδροκινόνη υπάρχει στο περιβάλλον ως αποτέλεσμα ανθρωπίνων επεμβάσεων και διαδικασιών, καθώς επίσης και σε φυτικά και ζωικά προϊόντα. Χρησιμοποιώντας κλασικές κυτταρογενετικές μεθόδους έχει διερευνηθεί η δράση της υδροκινόνης αλλά οι μελέτες περιορίζονται σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα και αναφέρονται σε πειραματόζωα και χαμηλές συγκεντρώσεις της χημικής αυτής ουσίας. Σε υψηλές συγκεντρώσεις όμως επηρεάζεται ο κυτταρικός κύκλος με αποτέλεσμα να έχουμε καθυστέρηση των κυττάρων στην G2 φάση και ενδεχομένως η κλασική κυτταρογενετική ανάλυση στη μετάφαση να υποεκτιμά την δράση της υδροκινόνης. Επιπλέον, οι επιπτώσεις της υδροκινόνης και οι χρωμοσωματικές αλλοιώσεις που έχουν αναφερθεί παρατηρήθηκαν κυρίως σε πειραματόζωα. Δεν έχει διευκρινισθεί εντούτοις εάν παρατηρούνται και σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος. Αν επιβεβαιωθεί η γενετοξική δράση της υδροκινόνης, αναμένεται ανάλογη δράση να έχουν και οι άλλοι μεταβολίτες του βενζολίου.

Για την περαιτέρω διερεύνηση των βιολογικών επιπτώσεων της υδροκινόνης στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες ανθρωπίνων λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος και μελετήθηκε η δράση της στο κυτταρογενετικό επίπεδο τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές συγκεντρώσεις της χημικής αυτής ουσίας. Εφαρμόζοντας τη νέα μεθοδολογία που αναπτύξαμε σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος υγιών δοτών, κατέστη δυνατή η απευθείας ανάλυση των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων και εκτίμηση των επαγομένων ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων (SCEs) τόσο σε κύτταρα στη μετάφαση, όσο και σε πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Οι συγκεντρώσεις Υδροκινόνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 2-100  $\mu\text{M}$  στις καλλιέργειες περιφερικού αίματος και περισσότερες από 40 μεταφάσεις λεμφοκυττάρων αναλύθηκαν για κάθε πειραματικό σημείο από δύο ανεξάρτητα πειράματα. Τα αποτελέσματα από αναλύσεις μεταφασικών κυττάρων που παρατίθενται στον Πίνακα 12 δείχνουν ότι η συχνότητα των (SCEs) ανά κύτταρο αυξάνει αυξανόμενης της συγκέντρωσης Υδροκινόνης. Ο αριθμός εντούτοις των SCEs ανά κύτταρο στη μετάφαση αυξάνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της Υδροκινόνης έως τη συγκέντρωση των 100  $\mu\text{M}$ . Η συγκέντρωση των 200  $\mu\text{M}$  Υδροκινόνης δεν επέτρεψε στα λεμφοκύτταρα να φθάσουν στη μετάφαση ώστε να καταστεί δυνατή η ανάλυση ανταλλαγών αδελφών χρωματιδίων στη μετάφαση. Τα κύτταρα είχαν σταματήσει σε σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στην G2 φάση αλλά με τη μέθοδο της πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης έγινε δυνατή η ανάλυση των SCEs απευθείας στην G2 φάση. Από την ανάλυση αποδείχθηκε ότι η συχνότητα των SCEs αυξάνεται αυξανόμενης της συγκέντρωσης ακόμη και σε επίπεδα που καθυστερούν τα κύτταρα στην G2 φάση, όπως δείχνουν και τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον Πίνακα 13.

#### **4.5 Συχνότητα ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων και πολυμορφισμός του γονιδίου της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης GSTT1**

Είναι γνωστό ότι η ενδογενής ευαισθησία στην επαγωγή μεταλλάξεων και καρκινογένεσης είναι διαφορετική από άτομο σε άτομο ακόμα και όταν τα άτομα αυτά εκτίθενται στους ίδιους παράγοντες. Επίσης, πιστεύεται ότι οι γονότυποι που χαρακτηρίζονται από μια διαφορετική επιδεκτικότητα σε μεταλλα-

ξιγόνους και καρκινογόνους παράγοντες χαρακτηρίζονται ταυτόχρονα και από πολυμορφισμούς και ελλείψεις κρίσιμων γονιδίων που σχετίζονται κυρίως με ένζυμα επιδιόρθωσης αλλοιώσεων στο DNA ή αποτοξικοποίησης γενοτοξικών περιβαλλοντικών παραγόντων. Δύο μέλη της οικογένειας τρανσφερασών της γλουταθειόνης, τα γονίδια GSTM1 και GSTT1, είναι προϊόντα γενετικού πολυμορφισμού και εμφανίζουν σε υψηλό ποσοστό γονότυπο με ομόζυγο έλλειμμα του φυσιολογικού γονιδίου. Το ποσοστό στον πληθυσμό με ομόζυγο έλλειμμα των φυσιολογικών γονιδίων GSTM1 και GSTT1 κυμαίνεται από 10 έως και 60% ανάλογα την εθνότητα και έχει αναφερθεί ότι η έλλειψη αυτή προδιαθέτει στην καρκινογένεση. Αυτό όμως δεν έχει διευκρινισθεί ακόμη και σήμερα και έχει διατυπωθεί η άποψη ότι είναι απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση του πιθανού αυτού συσχετισμού. Όπως είναι γνωστό, το ομόζυγο έλλειμμα του φυσιολογικού γονιδίου GSTT1 σχετίζεται με ελλιπή ικανότητα αποτοξικοποίησης γενοτοξικών παραγόντων και ενδεχομένως με ελλιπή επισκευαστική ικανότητα αλλοιώσεων του DNA μέσω του μηχανισμού του ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombinational repair). Ο επισκευαστικός αυτός μηχανισμός ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου στη φάση της σύνθεσης και αναδιπλασιασμού του DNA και πιστεύεται ότι κατά την κυτταρική διαδικασία επισκευής των αλλοιώσεων στο DNA με ομόλογο ανασυνδυασμό επάγονται οι ανταλλαγές των αδελφών χρωματιδίων (SCEs).

Στην παρούσα μελέτη ο πειραματικός σχεδιασμός επικεντρώθηκε στο να ελεγχθεί επίσης η υπόθεση ότι σε ένα γονότυπο με ομόζυγο έλλειμμα του φυσιολογικού γονιδίου GSTT1 αναμένεται να έχουμε αύξηση της συχνότητας ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων (SCEs) μετά από έκθεση σε γενοτοξικούς παράγοντες. Η ικανότητα μεταβολισμού καρκινογόνων χημικών ουσιών διαφέρει από άτομο σε άτομο και τα μέλη του πληθυσμού με μειωμένη ικανότητα αποτοξικοποίησης των χημικών μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων παραγόντων εμφανίζουν γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση. Ο συσχετισμός επομένως του ομόζυγου ελλείμματος του φυσιολογικού γονιδίου GSTT1 με την αύξηση της συχνότητας ανταλλαγής των αδελφών χρωματιδίων θα μπορούσε να συμβάλλει στην ανάπτυξη μιας απλής κυτταρογενετικής μεθόδου για έλεγχο του πληθυσμού με στόχο την ανίχνευση ατόμων με γενετική προδιάθεση στην μεταλλαξιγένεση και καρκινογένεση. Επιπλέον, ο συσχετισμός αυτός θα έδινε χρήσιμες πληροφορίες για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών επαγωγής των ανταλλαγών των αδελφών χρωματιδίων και των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων εν γένει. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά τον συσχετισμό αυτό. Τα αποτελέσματα της μελέτης που παρατίθενται στον πίνακα 14 δεν συνηγορούν προς την κατεύθυνση ενός θετικού συσχετισμού. 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. Εντούτοις, ο αριθμός των δοτών, που ανιχνεύτηκαν να είναι GSTT1(-) στα 31 άτομα που χρησιμοποιήσαμε, είναι σχετικά μικρός και συνεπώς η έρευνα συνεχίζεται προκειμένου ο έλεγχος να γίνει σε περισσότερους δότες με ελλειμματικό GSTT1 γονίδιο, πριν διατυπωθούν τα τελικά συμπεράσματα.





## 5

**ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ**

Μέρος των αποτελεσμάτων της μελέτης έχουν δημοσιευθεί υπό τη μορφή των παρακάτω επιστημονικών άρθρων:

1. Terzoudi G.I., S.I. Malik, K. Margaritis, K. Manola, W. Makropoulos and G.E. Pantelias. A new cytogenetic approach for the evaluation of mutagenic potential of chemicals that induce cell cycle arrest in the G2 phase. *Mutagenesis*, 18(6):539-543.
2. Malik S.I., G.I. Terzoudi, and G.E. Pantelias (2004). SCE analysis in G2 lymphocyte prematurely condensed chromosomes after exposure to high doses of atrazine: The non-significant increase in homologous recombinational events does not support its genotoxic mode of action. *Cytogenetic and Genome Research*, 104(1-4):315-9.
3. Hatzi V.I., G.I. Terzoudi, C. Paraskevopoulou, V. Makropoulos, D. P. Matthopoulos and G.E. Pantelias (2006). The use of premature chromosome condensation to study in interphase cells the influence of environmental factors on human genetic material. *Scientific World Journal*, Sep 25;6:1174-90.
4. Terzoudi G.I. and G.E. Pantelias (2006). Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualization after exposure to ionising radiation. *Radiation Protection Dosimetry*, 2006; Dec 14; Epub ahead of print.
5. Hatzi V.I., G.I. Terzoudi, G.E. Pantelias, C. Spiliopoulou, and V. Makropoulos (2007). The benzene metabolite hydroquinone enhances G2-chromosomal radiosensitivity by affecting the G2-checkpoint in irradiated lymphocytes. *International Journal of Oncology* 31(1):145-152.



## 6

## ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Τα αποτελέσματα που διεξήχθησαν από τα πειράματα στα πλαίσια του ερευνητικού αυτού προγράμματος, παρουσιάστηκαν σε τρία επιστημονικά συνέδρια υπό μορφή poster. Οι εργασίες αυτές είναι οι ακόλουθες:

1. Hatzi V.I., Terzoudi G.I., Malik S.I., Pantelias G.E. & Makropoulos V. “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.
2. Hatzi V.I., Terzoudi G.I., Malik S.I., Stavropoulou C., Pantelias G.E. & Makropoulos V. “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.
3. Χατζή Β.Ι., Τερζοΰδη Γ.Ι., Παντελιάς Γ.Ε. & Μακρόπουλος Β. “Κυτταρογενετική μελέτη συνδυασμένης δράσης υδροκινόνης και ιονίζουσας ακτινοβολίας σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος” 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Προαγωγής και Αγωγής Υγείας, Αθήνα 8-10 Δεκεμβρίου 2005.
4. Hatzi V.I., Terzoudi G.I., Pantelias G.E. & Makropoulos V. “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.
5. Hatzi V.I., Terzoudi G.I., Pantelias G.E., Spiliopoulou Ch., Makropoulos V. The benzene metabolite hydroquinone enhances G2-chromosomal radiosensitivity by inducing a less-efficient G2-M checkpoint in irradiated lymphocytes. Διεθνές Συνέδριο, «Επαγγελματικοί κίνδυνοι για τους εργαζόμενους στον τομέα της υγείας: προκλήσεις για την πρόληψη», Αθήνα, 4-6 Ιουνίου 2007.
6. Terzoudi G.I., Hatzi V.I., Makropoulos V., Pantelias G.E. The use of cytogenetic methodologies for biomonitoring and identification of hypersensitive individuals to genotoxic exposure. Διεθνές Συνέδριο, «Επαγγελματικοί κίνδυνοι για τους εργαζόμενους στον τομέα της υγείας: προκλήσεις για την πρόληψη», Αθήνα 4-6, Ιουνίου 2007.
7. Hatzi V.I., Terzoudi G.I., Makropoulos V., Pantelias G.E. Pre-irradiation-exposure glutaraldehyde increases G2-chromosomal radiosensitivity in human peripheral blood lymphocytes. Διεθνές Συνέ-

δριο, «Επαγγελματικοί κίνδυνοι για τους εργαζόμενους στον τομέα της υγείας: προκλήσεις για την πρόληψη», Αθήνα 4-6, Ιουνίου 2007.

Η εργασία αυτή βραβεύτηκε με το Δεύτερο Βραβείο καλύτερης εργασίας του Συνεδρίου.

## 7

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alsbeih G. & Raaphorst G.P. (1999) "Differential induction of premature chromosome condensation by calyculin A in human fibroblast and tumor cell lines" *Anticancer Res.* 19 (2A): 903-908.
- Bartsch H., Malaveile C., Barbin A. & Planche G. (1979) "Mutagenic and alkylating metabolites of halo-ethylenes, chlorobutadienes and dichlorobutenes produced by rodents or human liver tissue. Evidence for oxidant formation by P450-linked microsomal mono-oxygenases. *Arch. Toxicol.* 41, 249-277.
- Begg C.A., Sprong D., Balm A., Martin J.M.C. (2001) "Premature chromosome coindensation and cell separation studies in biopsies from head and neck tumors for radiosensitivity prediction" *Radiotherapy and Oncology* 62: 335-343.
- Bernardini S., Hirvonen A., Jarventaus H. & Norppa H. (2002) Influence of GSTM1 and GSTT1 genotypes on sister chromatid exchange induction by styrene in culture human lymphocytes. *Carcinogenesis* 23(5): 893-897.
- Bronzetti G., Zeiger e. & Frezza D. (1978) "Genetic activity of trichloroethylene in yeast" *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 1, 411-418.
- Darbre P.D., Aljarrah A., Miller W.R., Coldham N.G., Sauer M.J. & Pope G.S. (2004) "Concentrations of parabens in human breast tumours" *J. Appl. Toxicol.* 24 (1): 5-13.
- Harvey P.W. (2004) "Parabens, oestrogenicity, underarm cosmetics and breast cancer: A perspective on a hypothesis" *J. Appl. Toxicol.* 23 (5):285-288.
- Harvey P.W. & Everett D.J. (2004) "Significance of the detection of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) in human breast tumors". *J. Appl. Toxicol.*, 24 (1) :1-4.
- Ikeda M., Koizumi A., Watanabe T. Endo A., Sato K. (1980) "Cytogenetic and cytokinetic investigations on lymphocytes from workers occupationally exposed to tetrachloroethylene" *Toxicol. Lett.* Mar:5(3-4):251-6.
- Illing H.P.A., Mariscotti S.P. & Smith A.M. (1987) "Tetrachloroethylene (Tetrachloroethylene, Perchloroethylene) (Toxicity Review 17), Health and Safety Executive, London, HM Stationary Office.

- Maltoni C., Lefemine G. Cotti G. & Perino G. (1988) "long term carcinogenicity bioassays on trichloroethylene administered by inhalation to Sprague-Dawley rats and Swiss and B6C3F1 mice" *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 574, 316-342.
- Medeiros R., Soares R., Vasconcelos A., Schmitt F. & Lopes C. (2004) Glutathione S-transferase genotype GSTM1 as a predictor of elevated andiodenesis phenotype in patients with early onset breast cancer. *Angiogenesis* 7(1): 53-58.
- Nelson H.H., Weinckle J.K., Christiani D.C., Cheng T.J. & Kelsey K.T. (1995) Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis*, 16: 1243-1245.
- Nelson M.A. & Bull R.J. (1988) "Induction of strand breaks in DNA by trichloroethylene and metabolites in rat and mouse liver in vivo" *toxicol. Appl. Pharmacol.* 94, 45-54.
- Norppa H., Hirvonen A., Jarventaus H., Uuskula M., Tasa G., Ojajarvi A. & Sorsa M. (1995) Role of GSTT1 and GSTM1 genotypes in determining individual sensitivity to sister chromatid exchange induction by diepoxybutane in cultured human lymphocytes.
- Pantelias, G.E. (1986) Radiation-induced cytogenetic damage in relation to changes in interphase chromosome conformation. *Radiat Res.* 105, 341-350.
- Pantelias, G.E. and Maillie, H.D. (1983) A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol. *Somatic Cell Genet.* 9, 533-547.
- Pantelias G.E. & Mallie H.D. (1985) "Direct analysis of radiation-induced chromosome fragments and rings in unstimulated human peripheral blood lymphocytes by means of the premature chromosome condensation technique" *Mutation Res.* 149: 67-72.
- Pemble S., Schroeder K.R., Spencer S.R., Meyer D.J. Hallier E., Bolt H.M., Ketterer B. & Taylor J.B. (1994) Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochemical journal*, 300: 271-276.
- Pifer J.W. (1995) "Mortality study of employees engaged in the manufacture and use of hydroquinone" *International archives of Occupational and Environmental Health.* Vol. 67, no. 4, pp: 267-280.
- Shimada T., Swanson A.F., Leber P. & Williams G.M. (1985) "Activities of chlorinated ethane and ethylene compounds in the Salmonella/ rat microsome mutagenesis and rat hepatocyte/ DNA repair assays under vapour phase exposure conditions. *Cell. Boil. Toxicol.*, 1, 159-179.
- Sobti R.C., Sharma s., Joshi A., Jindal S.K. & Janmeja A. (2004) Genetic polymorphism of the CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer susceptibility in a north Indian populations. *Mol. Cell. Biochem.* 266 (1-2): 1-9.

- Strange 1998 R.C., Lear J.T., & Fryer A.A. (1998) Glutathione S-transferase polymorphism: influence on susceptibility to cancer.
- Terzoudi G.I. & Pantelias G.E. (1997) "Conversion of DNA damage into chromosome damage in response to cell cycle regulation of chromatin condensation after irradiation" *Mutagenesis*. Vol. 12 (4):271-276.
- Their R., Bruning T., Roos P.H., Rihs H.P., Golka K., Ko Y. & Bolt H.M. (2003) Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 206(3): 149-171.
- Tsutsida S. & Sato K. (1992) Glutathione transferases and cancer. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. Volume 27 (4,5): 337-384.
- Tuimala J., Szekely G., Gundy S., Hirvonen A. & Norppa H. (2002) Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity. *Carcinogenesis* 23(6) 1003-1008.
- Walles S.A.S. (1986) "Induction of single strand breaks in DNA of mice by trichloroethylene and tetrachloroethylene" *Toxicol. Lett.* 31, 31-35.
- White A.E., Takehisa S., Eger E.I., Wolff S. & Stevens W.C. (1979) "Sister chromatid exchanges induced by inhaled anaesthetics. *Anesthesiology*, 50, 426-430.

ΤΟ ΒΙΒΛΙΟ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΡΓΑΖΟΜΕΝΩΝ  
ΜΕ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΧΗΜΙΚΟΥΣ ΒΛΑΠΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

ΣΕΛΙΔΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΚΑΙ ΤΥΠΩΘΗΚΕ

ΑΠΟ ΤΟΝ

ΕΚΔΟΤΙΚΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΛΙΒΑΝΗ ΑΒΕ

Σόλωνος 96-98 – 106 80 Αθήνα

Τηλ.: 210 3600398, Φαξ: 210 3617791

<http://www.livanis.gr>

ΓΙΑ ΤΟ

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΙΝΑΙ Η Α' ΕΚΔΟΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΩΘΗΚΕ ΣΕ 1.000 ΑΝΤΙΤΥΠΙΑ