ΝΕΑ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΥΨΗΛΩΝ ΔΟΣΕΩΝ ΙΟΝΤΙΖΟΥΣΑΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Καραχρήστου Ιωάννα, Παντελιάς Αντώνιος, Παντελιάς Γαβριήλ, Τερζούδη Γεωργία
Εργαστήριο Ακτινοπροστασίας: Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής,
Ινστιτούτο Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας,
ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Αγία Παρασκευή
e-mail: ikarachristou@rrp.demokritos.gr

Περίληψη

Σε περιπτώσεις έκθεσης σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες και ιδιαίτερα σε ραδιολογικά συμβάντα με πιθανή υπερέκθεση ατόμων του πληθυσμού, ενδέχεται η εκτίμηση δόσεων με χρήση φυσικών προσωπικών δοσιμέτρων να μην είναι επαρκής ή να μην είναι εφικτή. Στις περιπτώσεις αυτές η εκτίμηση της δόσης πραγματοποιείται με τη χρήση βιοδεικτών του ανθρώπινου σώματος (βιοδοσιμετρία) των οποίων οι αλλοιώσεις που επάγουν οι ακτινοβολίες σχετίζονται άμεσα με την απορροφουμένη δόση. Τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος χρησιμοποιούνται ευρέως ως βιοδοσίμετρα και η ανίχνευση και η καταμέτρηση των δικεντρικών χρωμοσωμάτων και δακτυλίων με κεντρομερίδιο, στην πρώτη μετάφαση μετά την έκθεση σε ακτινοβολία θεωρείται ακόμη και σήμερα ως η πιο αξιόπιστη κυτταρογενετική μέθοδος βιοδοσιμετρίας.

Κατά την εκτίμηση της απορροφουμένης δόσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας μεγαλύτερης από 6 Gy, με την κλασσική μέθοδο βιοδοσιμετρίας παρατηρείται η εμφάνιση σημείου κορεσμού στην καμπύλη δόσης απόκρισης, αλλά και πολύ μικρός αριθμός κυττάρων στη μετάφαση προς ανάλυση. Τα μειονεκτήματα αυτά επηρεάζουν αρνητικά την ακρίβεια και αξιοπιστία της κλασικής μεθοδολογίας που βασίζεται κυρίως στην ανίχνευση δικεντρικών χρωμοσωμάτων στη μετάφαση. Για το λόγο αυτό προτείνονται δύο διαφορετικές προσεγγίσεις εκτίμησης της απορροφούμενης δόσης μετά από έκθεση τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές δόσεις. Στην πρώτη προσέγγιση χρησιμοποιούνται ειδικοί μοριακοί ιχνηθέτες PNA για την επισήμανση των κεντρομεριδίων και των τελομεριδίων των χρωμοσωμάτων. Στη δεύτερη προσέγγιση χρησιμοποιείται ο χημικός παράγοντας της καφεΐνης, για την άρση του G2 σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου ώστε τα κύτταρα με αυξημένο αριθμό δικεντρικών χρωμοσωμάτων να μπορέσουν να απεγκλωβιστούν από τη G2 φάση, όπου έχουν σταματήσει και να φθάσουν στη μετάφαση για ανάλυση. Στη συνέχεια χρησιμοποιούνται και πάλι PNA ιχνηθέτες για την ακριβέστερη ποσοτικοποίηση του αυξημένου αριθμού χρωμοσωματικών αλλοιώσεων. Ως αποτέλεσμα της χρήσης των δύο αυτών προσεγγίσεων κατασκευάζεται καμπύλη δόσης-απόκρισης για δόσεις έως και 20 Gy. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν άτομα του πληθυσμού εκτίθενται σε υψηλές δόσεις, συνήθως σε περιπτώσεις ατυχήματος ή έκθεσης μέρους μόνο του ανθρώπινου σώματος. Οι δύο αυτές προσεγγίσεις συμβάλλουν ουσιαστικά στην ακριβέστερη ανάλυση των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων για την έγκυρη και πιο αξιόπιστη εκτίμηση απορροφούμένων δόσεων τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές δόσεις.

Λέξεις-Κλειδιά: βιοδοσιμετρία, απορροφούμενη δόση, δικεντρικά χρωμοσώματα.

Abstract

After an exposure to ionizing radiation and especially after an overexposure, where a large number of individuals may have been exposed, the estimation of the absorbed dose using physical dosimeters is possible to be doubtful or impossible. In such cases the estimation of the absorbed dose is obtained by biological methods. The biological methods are using the chromosomal aberrations of peripheral blood lymphocytes that are induced after the interaction of ionizing radiation with the cellular DNA. The conventional biodosimetry method is based on the interpolation of the frequency of dicentrics chromosomes and rings with centromeres scored in blood lymphocytes at metaphase to a pre established dose effect calibration curve. Nevertheless, the estimation of doses up to 6 Gy using the conventional method has disadvantages, like the saturation of the dose response curve and the small number of cell at metaphase that can be analyzed, reducing thus the precision of the dose estimation. In the present study to overcome the shortcomings of the conventional method we induced two different more accurate and reliable approaches for the estimation of the absorbed dose after high and low exposures. At the first approach fluorescence in situ hybridization (FISH) technique with centromeric/telomeric peptide nucleid acid probes (C/T PNA) in combination with conventional dicentric analysis is used. This approach improved the precision at the analysis of dicentric and polycentric chromosomes. At the second approach a modified protocol using a short co-treatment with caffeine and colcemid before lymphocyte harvesting is used, so that the lymphocytes released from the G2 block were predominantly included in the dicentric analysis. Additional the use of FISH technique with C/T probes enabled the identification and scoring accurately the frequency of dicentrics. The dose effect calibration curve is constructed for high doses without saturationand its use for cases of partial body high dose exposures is very important. These two new approaches contribute to a more accurate and reliable estimation of the absorbed dosein both low and high doses of ionizing radiation.

Keywords: biodosimetry, absorbed dose, dicentrics chromosomes

1. Εισαγωγή

Σε περιπτώσεις έκθεσης σε ιοντίζουσες ακτινοβολίες και ιδιαίτερα σε ραδιολογικά συμβάντα με πιθανή υπερέκθεση ατόμων του πληθυσμού, ενδέχεται η εκτίμηση δόσεων με χρήση φυσικών προσωπικών δοσιμέτρων να μην είναι επαρκής ή να μην είναι εφικτή. Στις περιπτώσεις αυτές η εκτίμηση της δόσης πραγματοποιείται με τη χρήση βιοδεικτών του ανθρώπινου σώματος (βιοδοσιμετρία) των οποίων οι αλλοιώσεις που επάγουν οι ακτινοβολίες σχετίζονται άμεσα με την απορροφουμένη δόση. Τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος χρησιμοποιούνται ευρέως ως βιοδοσίμετρα και η ανίχνευση και η καταμέτρηση των δικεντρικών χρωμοσωμάτων και δακτυλίων με κεντρομερίδιο, στην πρώτη μετάφαση μετά την έκθεση σε ακτινοβολία θεωρείται ακόμη και σήμερα ως η πιο αξιόπιστη κυτταρογενετική μέθοδος βιοδοσιμετρίας. Στην κλασσική κυτταρογενετική μεθοδολογία τα δικεντρικά χρωμοσώματα και οι δακτύλιοι οι οποίοι δημιουργούνται και η συχνότητα εμφάνισής τους ανά κύτταρο είναι συνάρτηση της απορροφούμενης δόσης. Χρησιμοποιώντας τις αλλοιώσεις αυτές ως δείκτη της έκθεσης, η απορροφούμενη δόση προσδιορίζεται μέσω πρότυπων καμπύλων αναφοράς. Ωστόσο, η κλασσική μέθοδος, όπως εφαρμόζεται σήμερα, εμφανίζει ορισμένα μειονεκτήματα, όπωστο κορεσμό του αριθμού των δικεντρικών χρωμοσωμάτων που παρουσιάζεται κατά την ανάλυση ύστερα από έκθεση σε απορροφούμενη δόση ιοντίζουσας ακτινοβολίας μεγαλύτερης από 6 Gy,αλλά και τον πολύ μικρό αριθμό κυττάρων στη μετάφαση προς ανάλυση.

Αποτέλεσματων μειονεκτημάτων αυτών είναι ηδυσκολία στην εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης, επηρεάζοντας τόσο την ακρίβεια όσο και την αξιοπιστία της μεθόδου. Για την υπέρβαση των μειονεκτημάτων της κλασσικής αυτής μεθοδολογίας βιοδοσιμετρίας χρησιμοποιήθηκαν δύο νέες πιο ευαίσθητες, αξιόπιστες και ακριβείς προσεγγίσεις, με αποτέλεσμα την εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης μετά από έκθεση τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές δόσεις καθώς και σε περιπτώσεις μερικής έκθεσης.

2. Μεθοδολογία

2.1 Κλασσική Μέθοδος Βιοδοσιμετρίας

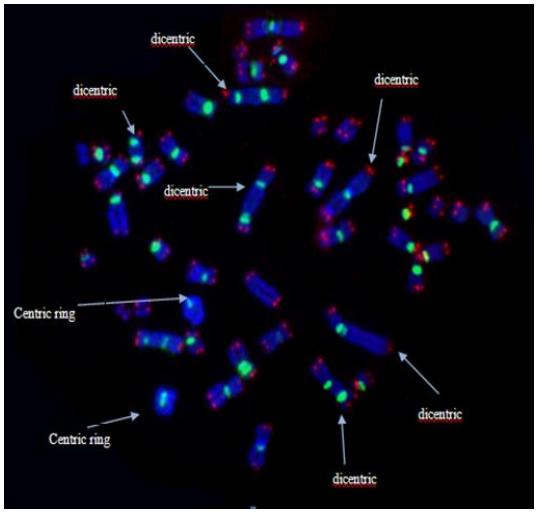
Δείγμα περιφερικού αίματος από υγιείς δότες λαμβάνεται και τοποθετείται σε σύριγγες με ηπαρίνη. Ακολουθεί η ακτινοβόληση των δειγμάτων με πηγή κοβαλτίου (^{60}Co) GammaCell 220 Irradiator (Atomic Energy of Canada Ltd, Ottawa, Canada) σε θερμοκρασία δωματίου και με ρυθμό δόσης 33cGy/min για δόσεις μέχρι 20Gy. Για κάθε καλλιέργεια χρησιμοποιείται 0,5ml περιφερικού αίματος και 5ml θρεπτικού υλικού, εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκού ορού μόσχου, 1% γλουταμίνη (Glu), 1% αντιβιοτικά και 1% φυτοαιμαγλουτινίνη. Το όλο πείραμα γίνεται σε ειδική τράπεζα στείρου αέρα κατακόρυφης ροής. Οι σωλήνες καλλιέργειας τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο, σε θερμοκρασία 37°Cκαι σε ατμόσφαιρα 95% αέρα, 5%CO_2και 100% υγρασία. Μετά από 47h από την επώαση των κυττάρων και για 3 ώρες προστίθεται κολσεμίδιο με τελική συγκέντρωση 0.1 μg/ml. Όταν ολοκληρωθεί ο χρόνος καλλιέργειας τα κύτταρα φυγοκεντρούνται, αποχύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 10ml υπότονου διαλύματος KCl 0.075M. Στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρούνται πάλι για 10 min, αποχύνεται το υπερκείμενο και ακολουθεί η διαδικασία μονιμοποίησης, χρησιμοποιώντας τρία μέρη μεθανόλης και ένα μέρος οξικό οξύ (μεθανόλη:οξικό οξύ 3:1 ν/ν) στο αιώρημα που έχει απομείνει. Η διαδικασία μονιμοποίησης επαναλαμβάνεται για τρεις φορές. Στη συνέχεια τα κύτταρα στρώνονται σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Ακολουθεί η εφαρμογή απλής χρώσης με διάλυμα Giemsa. Γίνονται μόνιμα παρασκευάσματα με την επικόλληση καλυπτρίδας με Entelan medium.Η ανάλυση των χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων πραγματοποιείται σε οπτικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με τη βοήθεια του ημιαυτόματου συστήματος ανάλυσης εικόνας IKAROS (Metasystems). Καταμετρήθηκαν τα δικεντρικά χρωμοσώματα και δακτύλιοι με κεντρομερίδιο σε 100 μεταφάσεις (Σχήμα 1) και στη συνέχεια κατασκευάστηκε η καμπύλης αναφοράς δόσης – απόκρισης.

Σχήμα 1. Μετάφαση ύστερα από χρώση με Giemsa όπου διακρίνονται έναδικεντρικό χρωμόσωμα με το ακεντρικό θραύσμα και ένας δακτύλιος με κεντρομερίδιο. Το σύνολο των κεντρομεριδίων (συσφίξεις) των χρωμοσωμάτων είναι 46.

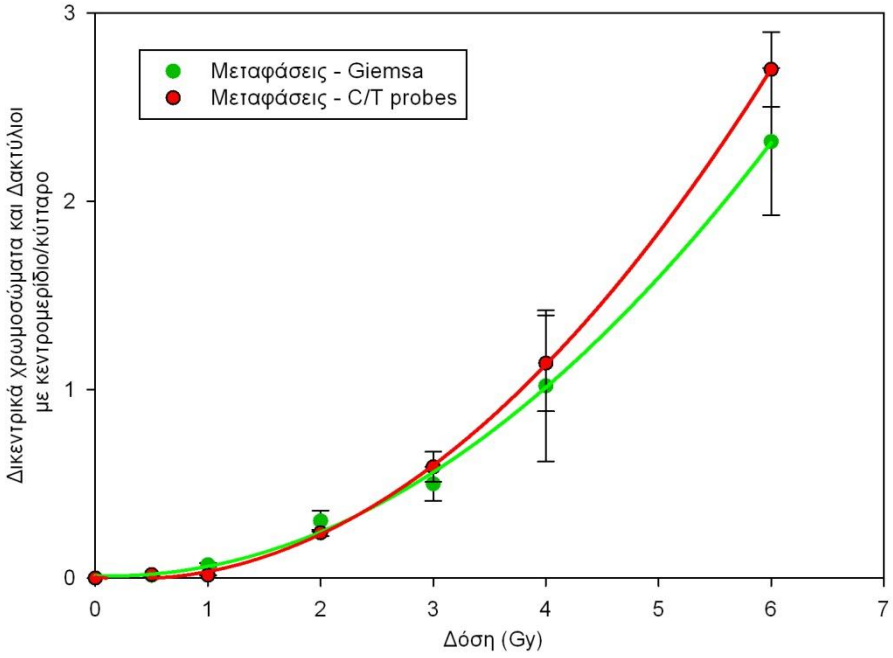
2.2 Χρήση ειδικών μοριακώνιχνηθετών PNA για την επισήμανση των κεντρομεριδίων-τελομερών των χρωμοσωμάτων (C/TPNAProbes)

Για την απευθείας παρατήρηση και ποσοτικοποίηση με σαφήνεια των δικεντρικών χρωμοσωμάτων και δακτυλίων χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί μοριακοί ιχνηθέτες για την επισήμανση των κεντρομεριδίων και των τελομεριδίων των χρωμοσωμάτων (pancentromeric και pantelomeric peptide nucleic acids (PNA) probes). Συγκεκριμένα εφαρμόστηκε η τεχνική Q-FISH όπου για τον εντοπισμό των κεντρομεριδίων χρησιμοποιήθηκεFAM-labeled PNA ειδικός ιχνηθέτης και για τον εντοπισμό των τελομεριδίων χρησιμοποιήθηκεCy3-labeled PNA ειδικός ιχνηθέτης. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είχε ως εξής: αρχικά τα χρωμοσωμικά παρασκευάσματα τοποθετούνται σε θερμαντική πλάκα στους 60^{o}C για μια ώρα, στη συνέχεια ξεπλένονται σε διάλυμα PBSγια 15 λεπτά και μονιμοποιούνται σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 4% για 2 λεπτά. Ακολουθούν 5λεπτα ξεπλύματα για 3 φορές σε διάλυμα PBS. Στη συνέχεια τοποθετείται πάνω στα κύτταρα προθερμασμένο στους 37^{o}C και για 3 λεπτά διάλυμα πεπσίνης. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλένονται ξανά 3 φορές με διάλυμα PBS και ξαναμονιμοποιούνται με φορμαλδεΰδη. Ακολουθεί αφυδάτωση ξεπλένοντας τα κύτταρα σε αιθανόλη με συγκέντρωση 70%, 90%, 100%και στέγνωμα σε συνθήκες δωματίου. Στη συνέχεια πάνω στα κύτταρα εφαρμόζονται οι ειδικοί ιχνηθέτες και οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται πάνω σε θερμαντική πλάκα στους 80^{o}C και για 3min, ώστε να επιτευχθεί η αποδιάταξη του DNA και ύστερα τοποθετούνται χωρίς φώς σε συνθήκες δωματίου για 2 ώρες ώστε να γίνει ο υβριδισμός. Η απομάκρυνση των ιχνηθετών γίνεται με ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων πλακών σε διάλυμα από 70% Formamide, 1% Tris 1M pH7.2, 1% BSA, 10%, H_2O για 2 φορές από 15 λεπτά και σε διάλυμα TBS/Tween 0.08%για 3 φορές από 5 λεπτά. Για την ανάλυση οι αντικειμενοφόρες πλάκες βάφονται με DAPI (1μg/ml).Η ανάλυση των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού με τη βοήθεια του ημιαυτόματου συστήματος ανάλυσης εικόνας ISIS (Metasystems). Καταμετρήθηκαν τα δικεντρικά χρωμοσώματα και δακτύλιοι με

κεντρομερίδιο σε 100 μεταφάσεις (Σχήμα 2) και στη συνέχεια κατασκευάστηκε η καμπύλης αναφοράς δόσης – απόκρισης(Σχήμα 3).



Σχήμα 2. Μετάφαση ύστερα από εφαρμογή της μεθόδου FISHσε συνδυασμό με ειδικούς μοριακούς ιχνηθέτες για την επισήμανση των κεντρομεριδίων και τελομεριδίων των χρωμοσωμάτων. Με τα βέλη διακρίνονται τα δικεντρικά χρωμοσώματα και τα ακεντρικά θραύσματα που τα συνοδεύουν.

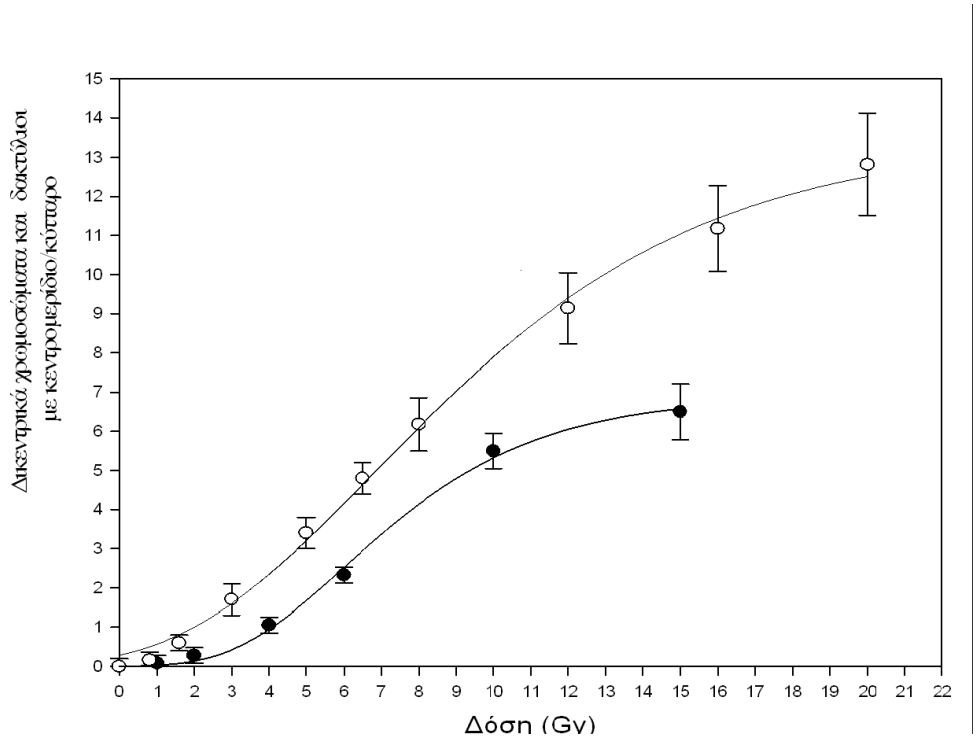


Σχήμα 3. Καμπύλη αναφοράς δόσης απόκρισης με την χρήση της κλασσικής κυτταρογενετικής μεθόδου (Μεταφάσεις –Giemsa) και της κλασσικής κυτταρογενετικής μεθόδου σε συνδυασμό με τη χρήση ειδικών μοριακών ιχνηθετών (Μεταφάσεις – C/Tprobes).

2.3 Κατασκευή καμπύλης απορροφούμενης δόσης-απόκρισης για υψηλές δόσεις ύστερα από προσθήκη του παράγοντα της καφεΐνης.

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς για δόσεις μέχρι 20Gyχρησιμοποιήθηκε η κλασσική κυτταρογενετική μέθοδος, με τη διαφορά ότι τα λεμφοκύτταρα επωάστηκαν για

55 h και 3h πριν από την λήξη του χρόνου επώασης (στις 52h) προστέθηκε καφεΐνη σε τελική συγκέντρωση 4 mM και κολσεμίδιο (Σχήμα 4) . Με την προσθήκη του παράγοντα της καφεΐνης επιτεύχθηκεη ανάλυση όλων των λεμφοκυττάρων ακόμη και εκείνων που λόγω των υψηλών δόσεων στις οποίες εκτέθηκαν είχαν σταματήσει στο G2 σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και δεν μπήκαν στην επόμενη φάση αυτού, τη μετάφαση. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν και πάλι PNA ιχνηθέτες για την επισήμανση των κεντρομεριδίων-τελομερών των χρωμοσωμάτων ώστε να προσδιοριστούν με μεγαλύτερη ακρίβεια ο αριθμός των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων.



Σχήμα 4. Καμπύλες απορροφούμενης δόσης απόκρισης για υψηλές δόσεις χρησιμοποιώντας τον παράγοντα της καφείνης και κολσεμίδιο 3h πριν τηνλήξη της καλλιέργειας στις 55 h (ο) και με την κλασσική κυτταρογενετικήμέθοδο (•).

2.4 Εκτίμηση ποσοστού έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία και της απορροφούμενης δόσης ύστερα από την προσθήκη του παράγοντα της καφεΐνης στην καλλιέργεια.

Για να εκτιμήσουμε το ποσοστό αίματος που εκτέθηκε σε ακτινοβολία πραγματοποιήσαμε in vitro προσομοίωση μερικής έκθεσης του περιφερικού αίματος. Συγκεκριμένα περιφερικό αίμα ακτινοβολημένο σε δόση ιοντίζουσας ακτινοβολίας 8Gy, αναμίχθηκε με μη ακτινοβολημένο περιφερικό αίμα ώστε να έχουμε ποσοστά έκθεσης5%, 10%, 20%, 50% και 100% ακτινοβολημένου αίματος. Οι καλλιέργειες χωρίστηκαν στα δύο και στις μισές ακολουθήθηκε η κλασσική κυτταρογενετική μέθοδος, ενώ στις υπόλοιπες 3 ώρες πριν ολοκληρωθούν οι 50 ώρες καλλιέργειας προστέθηκε καφεΐνη σε τελική συγκέντρωση 4mM και κολσεμίδιο. Εφαρμόστηκε χρώση με Giemsa και κατά την ανάλυση καταμετρηθήκαν τα λεμφοκύτταρα που έφεραν κάποια αλλοίωση και τα λεμφοκύτταρα που δεν εμφάνιζαν αλλοιώσεις. Από το λόγο τους υπολογίστηκε το ποσοστό των κυττάρων που εκτέθηκαν σε ιοντίζουσα ακτινοβολία. Επιπλέον, στα λεμφοκύτταρα που έφεραν αλλοιώσεις, που είχαν δηλαδή ακτινοβοληθεί καταμετρήθηκαν τα δικεντρικά χρωμοσώματα και οι κεντρικοί δακτύλιοι και έγινε η

εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης με τη βοήθεια των καμπυλών αναφοράς του Σχήματος 4. Τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις εμφανίζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Αποτελέσματα αναλύσεων μερικής έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία με την κλασσική κυτταρογενετική μέθοδο και τη μέθοδο κατά την οποία 3 h πριν την λήξη της καλλιέργειας προστίθεται καφεΐνη.

Κλασσική Κυτταρογενετική Μέθοδος

% αίματος που ακτινοβολήθηκε	**αλλοιωμένα / μη αλλοιωμένα λεμφοκύτταρα**	**% αίματος που εκτιμήθηκε ότι ακτινοβολήθηκε**	**Δικεντρικά +κεντρικοί Δακτύλιοι/ αλλοιωμένα κύτταρα**	**Εκτιμούμενη Δόση (Gy)**
5	0/100	0.00	0.00	0.00
10	2/152	1.30	1.50	3.62±0.40
20	2/98	2.00	1.00	3.6±0.40
50	7/102	6.50	3.50	5.97±0.60
100	45/2	96.00	3.93	7.85±0.80

Μέθοδος κατά την οποία 3hπριν την λήξη της καλλιέργειας προστέθηκε καφεΐνη

% αίματος που ακτινοβολήθηκε	**αλλοιωμένα / μη αλλοιωμένα λεμφοκύτταρα**	**% αίματος που εκτιμήθηκε ότι ακτινοβολήθηκε**	**Δικεντρικά +κεντρικοί Δακτύλιοι/ αλλοιωμένα κύτταρα**	**Εκτιμούμενη Δόση (Gy)**
5	12/140	7.80	4.75	8.40±1.20
10	9/87	9.40	4.00	7.22±1.10
20	8/34	19.05	4.38	7.67±1.20
50	45/41	52.30	4.50	7.87±0.90
100	100/0	100.00	4.75	8.40±0.80

3. Συμπεράσματα – Πρόταση

Η ανάλυση των μεταφάσεων και η συχνότητα εμφάνισης των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων στα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος χρησιμοποιείται εδώ και χρόνια στη βιολογική δοσιμετρία για την εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης. Συγκεκριμένα, η καταμέτρηση των δικεντρικών χρωμοσωμάτων και η αναγωγή τους με τη βοήθεια καμπυλών αναφοράς απορροφούμενης δόσης-απόκρισης, σε απορροφούμενη δόση θεωρείται ως σήμερα η καλύτερη και πιο αξιόπιστη μέθοδος. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η κλασσική κυτταρογενετική μέθοδος και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς αναλύοντας χρωμοσωματικά παρασκευάσματα, βαμμένα με απλή χρώση Giemsa (Σχήμα 1) και ύστερα από υβριδισμό με ειδικούς μοριακούς ιχνηθέτεςPNAγια την επισήμανση των κεντρομεριδίων και τελομερών των χρωμοσωμάτων (Σχήμα 2).Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους (Σχήμα 3)παρατηρήθηκε μια μικρή μετατόπιση προς τα πάνω της καμπύλης αναφοράς ύστερα από υβριδισμό των παρασκευασμάτων, στις υψηλές δόσεις

καθιστώντας τη μέθοδο πιο ευαίσθητη. Αυτό οφείλεται στη χρήση των ειδικών μοριακών ιχνηθετών των κεντρομεριδίων και τελομεριδίων των χρωμοσωμάτων, με τους οποίους τα δικεντρικά και πολύκεντρικά χρωμοσώματα καθώς και τα ακεντρικά θραύσματα που τα συνοδεύουν ήταν πιο ευδιάκριτα από ότι εάν είχε εφαρμοστεί απλή χρώση Giemsa.

Κατά την ανάλυση των μεταφάσεων για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς παρατηρήθηκε ότι, σε υψηλές δόσεις ο αριθμός των λεμφοκυττάρων προς ανάλυση ήταν μειωμένος σημαντικά, εμφανίζοντας κορεσμό δικεντρικών χρωμοσωμάτων και η καμπύλη δεν μπορούσε να κατασκευαστεί για δόσεις μεγαλύτερες των 6Gy. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι τα λεμφοκύτταρα που έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολία, λόγω των αυξημένων αλλοιώσεων που φέρουν στα χρωμοσώματά τους, καθυστερούν στον κυτταρικό κύκλο και ιδιαίτερα στο G2 σημείο ελέγχου. Αυτό οδηγεί στην δημιουργία χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων με χαμηλό μιτωτικό δείκτη και έχει ως αποτέλεσμα η απορροφούμενη δόση να υποεκτιμάται. Επίσης, στην καμπύλη αναφοράς της απορροφούμενης δόσης – απόκρισης εμφανίζεται σημείο κορεσμού. Για να αποφευχθεί αυτό χρησιμοποιήθηκε η χημική ουσία καφεΐνη. Με την προσθήκη της καφεΐνης απελευθερώθηκαν τα λεμφοκύτταρα που έφεραν δικεντρικά χρωμοσώματα και δακτυλίους με κεντρομερίδιο από το G2 σημείο ελέγχου, έφτασαν στη μετάφαση, συμπεριελήφθησαν και αυτά πλέον στην ανάλυση, κατασκευάζοντας την καμπύλη αναφοράς απορροφούμενης δόσης- απόκρισης όπως φαίνεται στο Σχήμα 4. Η προσέγγιση με την χρήση καφεΐνης για 3 ώρες εφαρμόστηκε και στην περίπτωση των μερικών εκθέσεων καθώς τόσο υψηλές δόσεις είναι συχνές συνήθως μόνο σε εκθέσεις μέρους του σώματος. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 ύστερα από προσθήκη της καφεΐνης κατέστη δυνατό να εκτιμηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια και το ποσοστό του σώματος του ανθρώπινου οργανισμού που έχει εκτεθεί, αλλά και η απορροφούμενη δόση.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής έδειξαν ότι και με τις δύο προσεγγίσεις (χρήση καφεΐνης και μοριακών ιχνηθετών) η εκτίμηση της απορροφούμενης δόσης γίνεται με μεγαλύτερη ευκολία και ακρίβεια σε σχέση με την κλασσική κυτταρογενετική μεθοδολογία.

4. Βιβλιογραφία

IAEA, "*Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual*.", Technical Reports Series, No 405,2001, Vienna:IAEA.

IAEA, "*Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies",*2011, Vienna:IAEA.

Karachristou, I., Karakosta, M., Pantelias, A., Hatzi, V. I., Karaiskos, P., Dimitriou, P., Pantelias, G. and Terzoudi, G. I., "*Triage biodosimetry using centromeric/telomeric PNA probes and Giemsa staining to score dicentrics or excess fragments in non-stimulated lymphocyte prematurely condensed chromosomes*", Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen., 793, 107-14, 2015.

Karachristou I., Karakosta M., Pantelias A., Hatzi V., Pantelias G., Thanassoulas A., Karaiskos P., Dimitriou P., Terzoudi G.I., "*Biodosimetry for High-Dose Exposures Based on Dicentric Analysis in Lymphocytes Released from the G2-Block by Caffeine*."Radiat Prot Dosimetry., 171(1) pp1-8, doi: 10.1093/rpd/ncw151, 2016.

M'Kacher, R., Maalouf, E. E., Ricoul, M., Heidingsfelder, L., Laplagne, E., Cuceu, C., Hempel, W. M., Colicchio, B., Dieterlen, A. and Sabatier, L., "*New tool for biological dosimetry: Reevaluation and automation of the gold standard method following telomere and centromere staining*", Mutat Res., 770, 45-53,2014.

M'Kacher, R., El Maalouf, E., Terzoudi, G., Ricoul, M., Heidingsfelder, L., Karachristou, I., Laplagne, E., Hempel, W. M., Colicchio, B., Dieterlen, A. et al., "*Detection and automated scoring of dicentric chromosomes in nonstimulated lymphocyte prematurely condensed chromosomes after telomere and centromere staining.*" Int J Radiat Oncol Biol Phys., 91(3), 640-9, 2015.

Pantelias, G. E. and Terzoudi, G. I., "*A standardized G2-assay for the prediction of individual radiosensitivity*", Radiother Oncol. 101(1), 28-34, 2011.

Pujol, M., Barrios, L., Puig, P., Caballin, M. R. and Barquinero, J. F., "*A New Model for Biological Dose Assessment in Cases of Heterogeneous Exposures to Ionizing Radiation*", Radiat Res, 2016.

Pujol, M., Barquinero, J. F., Puig, P., Puig, R., Caballin, M. R. and Barrios, L., "*A new model of biodosimetry to integrate low and high doses*", PLoS One. 9(12), e114137, 2014.

Pujol, M., Puig, R., Caballin, M. R., Barrios, L. and Barquinero, J. F., "*The use of caffeine to assess high dose exposures to ionising radiation by dicentric analysis*", Radiat Prot Dosimetry, 149(4), 392-8, 2012.

Tanzarella, C., De Salvia, R., Degrassi, F., Palitti, F., Andersson, H. C., Hansson, K. and Kihlman, B. A., "*Effect of post-treatments with caffeine during G2 on the frequencies of chromosome-type aberrations produced by X-rays in human lymphocytes during G0 and G1.*", Mutagenesis. 1(1), 41-4, 1986.

Terzoudi, G. I., V. I. Hatzi, et al.. "*Chromatin dynamics during cell cycle mediate conversion of DNA damage into chromatid breaks and affect formation of chromosomal aberrations: biological and clinical significance.*" Mutat Res 711(1-2), 174-86, 2010.

Terzoudi, G. I., Hatzi, V. I., Barszczewska, K., Manola, K. N., Stavropoulou, C., Angelakis, P. and Pantelias, G. E., "*G2-checkpoint abrogation in irradiated lymphocytes: A new cytogenetic approach to assess individual radiosensitivity and predisposition to cancer*", Int J Oncol. 35(5), 1223-30, 2009.

Terzoudi, G. I. and Pantelias, G. E., "*Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualisation after exposure to ionising radiation*", Radiat Prot Dosimetry, 122(1-4), 513-20, 2006.