



**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 ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

## **ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΡΚΙΝΩΝ**

**ΑΘΗΝΑ 2007**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ  
ΤΩΝ ΕΡΓΑΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.  
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΡΚΙΝΩΝ**

ISBN: 978-960-7678-79-9

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 καρκινογόνους παράγοντες - Μηχανισμοί ανάπτυξης επαγγελματικών καρκίνων**» το οποίο πραγματοποιήθηκε από το Ινστιτούτο Ραδιοϊσοτόπων & Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων 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. Γαβριήλ Παντελιάς**,  
Διευθυντής Ι/Ρ-ΡΠ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

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

**Δρ. Γεωργία Τερζούδη**, Ερευνήτρια Γ'  
**Δρ. Δρακούλης Γιαννουκάκος**, Ερευνητής Β'  
**Δρ. Ειρήνη Κωνσταντοπούλου**, Μεταδιδακτορικός Συνεργάτης  
**Δρ. Θόδωρος Αναγνωστόπουλος**, Μεταδιδακτορικός Συνεργάτης  
**Βασιλική Χατζή**, Υποψήφια Διδάκτορας  
**Κλειώ Μακρουγιαννάκη**, 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

ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	11
ΠΡΟΣΔΟΚΩΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	17
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	19
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	31
ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΕΥΡΩΠΑΪΚΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ. ....	47
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ .....	49
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ .....	51
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	53



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η γενοτοξική δράση χημικών παραγόντων του επαγγελματικού περιβάλλοντος αποτελεί τον τελευταίο καιρό σημαντικό πεδίο επιστημονικής έρευνας. Για την έγκαιρη γνώση και αντιμετώπιση της σχετικής δράσης απαιτείται η ανάπτυξη νέων διαγνωστικών μεθοδολογιών βιοπαρακολούθησης των εργαζομένων. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή και η διαλεύκανση των μηχανισμών δράσης μιας χημικής ουσίας σε επίπεδο DNA.

Η παρούσα μελέτη στόχο έχει την ανάπτυξη νέων μεθόδων βιολογικής παρακολούθησης εργαζομένων που εκτίθενται σε καρκινογόνους παράγοντες και περιγράφει μηχανισμούς ανάπτυξης επαγγελματικών καρκίνων, εμπλουτίζοντας κατ'αυτόν τον τρόπο την ελληνική βιβλιογραφία.

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





## 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια οι βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες επιπτώσεις της γενετοξικής δράσης χημικών παραγόντων του επαγγελματικού περιβάλλοντος βρίσκονται στο επίκεντρο ενδιαφέροντος Εθνικών και Διεθνών Οργανισμών Προστασίας Υγιεινής και Ασφάλειας των Εργαζομένων, οι οποίοι και αναδεικνύουν την αναγκαιότητα εκπόνησης εμπειριστατωμένων μελετών. Η γνώση και η κατανόηση της γενετοξικής δράσης των χημικών ουσιών συμβάλλει στην ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών βιοπαρακολούθησης εργαζομένων. Επίσης, αναμφισβήτητα συμβάλλει και στη διαλεύκανση των μηχανισμών δράσης σε μοριακό επίπεδο που σχετίζονται με την πρόκληση μεταλλάξεων σε κρίσιμα γονίδια σωματικών κυττάρων και στη διαδικασία καρκινογένεσης γενικότερα. Σε εμπειριστατωμένες μελέτες, για το σκοπό αυτό, το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στον μεταβολισμό των γενετοξικών (μεταλλαξιγόνων) ουσιών στον άνθρωπο, καθώς και στα αποτελέσματα που αυτές επιφέρουν, σε μοριακό (DNA), κυτταρογενετικό (χρωμοσώματα) και κυτταρικό επίπεδο. Έμφαση δίνεται σε καθοριστικούς για το αποτέλεσμα παράγοντες όπως είναι η συγκέντρωση της γενετοξικής ουσίας (δόση), η διάρκεια και η συχνότητα έκθεσης σε αυτήν, η οδός εισόδου στον οργανισμό, το φύλο, η ηλικία, οι διατροφικές συνήθειες (π.χ. μεταλλικά ιόντα, βιταμίνες, πρωτεΐνες, φάρμακα), το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ και η παθολογική του κατάσταση. Επιπρόσθετοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάζουν το αποτέλεσμα της δράσης γενετοξικών ουσιών και απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση είναι η ενδογενής ευαισθησία στους διάφορους μεταλλαξιγόνους παράγοντες του εργασιακού περιβάλλοντος, που ενδεχομένως διαφέρει από άτομο σε άτομο, καθώς και η γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση.

Επομένως, σημαντικό ρόλο στη διαφορετική απόκριση στους γενετοξικούς παράγοντες φαίνεται να παίζει το γενετικό υπόβαθρο (γενετικό προφίλ) των εκτιθέμενων ατόμων. Όσον αφορά το επαγγελματικό περιβάλλον, είναι ήδη γνωστό από *in vitro* και *in vivo* πειραματικά μοντέλα πως η συνεχής έκθεση εργαζομένων σε χημικούς γενετοξικούς παράγοντες αποτελεί ένα από τα βασικότερα αίτια πρόκλησης μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό και έναρξης διαδικασιών καρκινογένεσης. Πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη επαγγελματικών καρκίνων φαίνεται να διαδραματίζει η αλληλεπίδραση των φυσικών και χημικών γενετοξικών παραγόντων, στους οποίους εκτίθεται ο άνθρωπος στο εργασιακό του περιβάλλον, με το γενετικό προφίλ. Για τον λόγο αυτό, η επίδραση μίας τοξικής ένωσης μελετάται τόσο με βάση τις αλλαγές που επιφέρει στην αλληλουχία του DNA (μετάλλαξη) και κατ'επέκταση στο τελικό γονιδιακό προϊόν (πρωτεΐνη), όσο και στην πιθανή συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών και την απόκριση του οργανισμού σε μεταλλαξιγόνους παράγοντες. Αποτελέσματα μελετών έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι μεταλλάξεις σε γονίδια σωματικών κυττάρων αποτελούν αίτιο διαφόρων μορφών καρκίνου. Χαρακτηριστικά, η χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος (Lander et al 2001, Venter et al. 2001) έχει οδηγήσει τα τελευταία χρόνια σε μία εξαιρετικά σημαντική αύξηση τόσο της πληροφορίας που σχετίζεται με τη λειτουργία του ανθρώπινου γονιδιώματος σαν

σύνολο, όσο και με την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων στη λειτουργία των γονιδίων που το αποτελούν (Patrinos & Drell 2002, Samson 2003, Bolognezi 2003, Brennan 2003, Tired 2002).

Χρησιμοποιώντας ως βασικό εργαλείο την αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, βρίσκεται σε πλήρη εξέλιξη διεθνώς το Πρόγραμμα Περιβαλλοντικής Υγείας (Environmental Health Project, <http://www.niehs.nih.gov/envgenom>, <http://www.genome.utah.edu/>) στα πλαίσια του οποίου καταγράφονται στοιχεία που αφορούν την αλληλεπίδραση του περιβάλλοντος με το ανθρώπινο γονιδίωμα (Wakefield 2002). Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει την ανάγκη ανάπτυξης νέων μεθόδων βιοπαρακολούθησης της έκθεσης εργαζομένων στο εργασιακό τους περιβάλλον, καθώς και αποσαφήνισης των μοριακών μηχανισμών μεταλλαξιγόνου και καρκινογόνου δράσης, παραγόντων στους οποίους είναι δυνατόν να εκτεθούν οι εργαζόμενοι στο εργασιακό τους περιβάλλον.

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το αντικείμενο της προτεινόμενης μελέτης επικεντρώνεται στην ανάπτυξη μεθοδολογιών κυτταρογενετικής και μοριακής γενετικής για τη βιοπαρακολούθηση εκτιθέμενων εργαζομένων σε γενοτοξικούς και καρκινογόνους παράγοντες. Επιπλέον, η μελέτη επικεντρώνεται στην κατανόηση των μηχανισμών ανάπτυξης επαγγελματικών καρκίνων σε συσχετισμό με την προδιάθεση στην καρκινογένεση η οποία φαίνεται να σχετίζεται όχι μόνο με την επίδραση καρκινογόνων χημικών σε γνωστά γονίδια τα οποία συμβάλλουν στη διαδικασία καρκινογένεσης, αλλά και με το γενετικό προφίλ του κάθε ανθρώπου. Συγκεκριμένα, έγινε εμπειριστατωμένη διερεύνηση της δράσης εξωγενών γενοτοξικών παραγόντων στους εξής θεματικούς άξονες:

- (α) Επαγωγή χρωμοσωματικών αλλοιώσεων και δομικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου: Ανάλυση σε μεταφασικά και μεσοφασικά κύτταρα
- (β) Γονιδιακή έκφραση και ταυτοποίηση γενετικών πολυμορφισμών για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών προδιάθεσης στην καρκινογένεση
- (γ) Συσχετισμός γενετικών πολυμορφισμών με καρκινογένεση μετά από έκθεση σε γενοτοξικούς παράγοντες
- (δ) Συσχετισμός ακτινοευαισθησίας και γενετικής προδιάθεσης στην καρκινογένεση

### 2.1 Επαγωγή χρωμοσωματικών αλλοιώσεων και δομικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου: Ανάλυση σε μεταφασικά και μεσοφασικά κύτταρα

Ένα από τα αποτελέσματα της επίδρασης επιβλαβών παραγόντων του επαγγελματικού περιβάλλοντος είναι η πρόκληση βλαβών στα χρωμοσώματα των κυττάρων. Οι επαγόμενες χρωμοσωματικές αλλοιώσεις οδηγούν σε καθυστέρηση του κυτταρικού κύκλου ή ακόμη και σε κυτταρικό θάνατο (ασταθείς χρωμοσωματικές αλλοιώσεις). Εντούτοις, άλλες αλλοιώσεις είναι δυνατόν να διαφύγουν των μηχανισμών της κυτταρικής διαίρεσης, να μεταφερθούν σε επόμενες κυτταρικές διαιρέσεις και να αποτελέσουν έναν ανώμαλο κυτταρικό κλώνο με απρόβλεπτες συνέπειες εξέλιξης (σταθερές χρωμοσωματικές αλλοιώσεις). Οι δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες που παρατηρούνται ως αποτέλεσμα δράσης μεταλλαξιγόνων χημικών παραγόντων και ακτινοβολιών διακρίνονται γενικά σε δύο βασικές κατηγορίες σύμφωνα με την κατάταξη που υιοθετήθηκε για αυτές στο συνέδριο της Στοκχόλμης το 1978 και από αναλύσεις του Savage το 1975: (i) Χρωμοσωματικές Ανωμαλίες (Chromosomal aberrations) ή Χρωμοσωματικές Αναδιατάξεις (Chromosomal rearrangements) και στις (ii) Χρωματιδικές Ανωμαλίες (Chromatid type aberrations).

Έχουν περιγραφεί πολλοί διαφορετικοί τύποι δομικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών ανάμεσα στις οποίες συγκαταλέγονται τα χρωμοσωματικά ρήγματα (ή τελικά ελλείμματα), τα χρωμοσωματικά χάσματα (ή χρωμοσωματικές ασυνέχειες) και οι χρωμοσωματικές ανταλλαγές. Οι τελευταίες διακρίνονται (1) στις χρωμοσωματικές διανταλλαγές που λαμβάνουν χώρα μεταξύ διαφορετικών χρωμοσωμάτων και μπορεί να είναι (1α) ασύμμετρες (δικεντρικά, πολυκεντρικά χρωμοσώματα) ή (1β) συμμετρικές ανταλλαγές ή αμοιβαίες μετατοπίσεις και στις (2) χρωμοσωματικές ενδοανταλλαγές που λαμβάνουν χώρα στο ίδιο χρωμόσωμα και διακρίνονται (2α) σε ασύμμετρες ανταλλαγές (ενδιάμεσα χρωμοσωματικά ελλείμματα, δακτυλιωτές μορφές με ή χωρίς κεντρόμερος και (2β) συμμετρικές ανταλλαγές ή αναστροφές (περικεντρικές και παρακεντρικές αναστροφές).

Όσον αφορά τις χρωματιδικού τύπου δομικές ανωμαλίες ταξινομούνται σε τρεις βασικές κατηγορίες: (1) τα χρωματιδικά ρήγματα, (2) τα χρωματιδικά χάσματα και (3) τις χρωματιδικές ανταλλαγές. Οι τελευταίες μπορεί να είναι είτε (3α) διαχρωματιδικές ανταλλαγές (ασύμμετρες ή συμμετρικές ανταλλαγές μεταξύ χρωματίδων διαφορετικών χρωμοσωμάτων), είτε (3β) ενδοχρωματιδικές ανακατατάξεις (ασύμμετρες ή συμμετρικές) στον βραχίονα ενός χρωματιδίου.

Πέραν των δομικών χρωμοσωματικών και χρωματιδικών αλλοιώσεων, η έκθεση σε γενοτοξικούς ή / και χημικούς παράγοντες μπορεί να επιφέρει και ηπιότερες αλλαγές που χαρακτηρίζονται ως ανταλλαγές των αδελφών χρωματίδων (Sister Chromatid Exchanges, SCEs). Οι ανταλλαγές των αδελφών χρωματίδων θεωρούνται ως δείκτης τόσο της βλάβης του DNA, αλλά φαίνεται να σχετίζονται και με το φαινόμενο του μηχανισμού επιδιόρθωσης με ομόλογο ανασυνδυασμό (homologous recombination repair). Για τον λόγο αυτό, η μεθοδολογία ανάλυσης των SCEs σε μεταφασικά κύτταρα έχει χρησιμοποιηθεί σε ορισμένες περιπτώσεις για τον έμμεσο έλεγχο της γενοτοξικής δράσης μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων περιβαλλοντικών παραγόντων. Κυρίως όμως, η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και επιβεβαίωση έκθεσης σε μεταλλαξιγόνους και καρκινογόνους παράγοντες.

Στα πλαίσια του παρόντος θεματικού άξονα, διερευνάται η επίδραση των γενοτοξικών παραγόντων του εργασιακού περιβάλλοντος στο κυτταρογενετικό επίπεδο για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό των επαγόμενων χρωμοσωματικών αλλοιώσεων τόσο στη μετάφαση όσο και στη μεσόφαση και ιδιαίτερα στην G2-φάση του κυτταρικού κύκλου. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν κλασικές κυτταρογενετικές μέθοδοι σε συνδυασμό με νέες τεχνικές μοριακής κυτταρογενετικής. Απώτερος στόχος είναι η ανίχνευση και ταυτοποίηση ευαίσθητων περιοχών του γονιδιώματος, καθώς και η συσχέτιση των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων μετά από έκθεση σε συγκεκριμένους γενοτοξικούς παράγοντες με τη γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση. Συγκεκριμένα, επιλεγμένοι χημικοί και γενοτοξικοί παράγοντες, οι οποίοι έχουν ενοχοποιηθεί για καρκινογένεση τόσο σε πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο, δοκιμάστηκαν σε κυτταρικές καλλιέργειες *in vitro*. Στους παράγοντες αυτούς συγκαταλέγονται το βενζο[α]πυρένιο, το τριχλωροαιθυλένιο, η υδροκινόνη, η γλουταραλδεϋδη, η ατραζίνη κ.α., οι οποίοι έχουν ενοχοποιηθεί για την καρκινογόνο τους δράση σε πειραματόζωα ή ακόμη και στον άνθρωπο (Bronzetti G. Et al. 1978, Maltoni C. Et al. 1988, Nelson & Bull 1988, Pifer 1995).

## 2.2 Γονιδιακή έκφραση και ταυτοποίηση γενετικών πολυμορφισμών για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών προδιάθεσης στην καρκινογένεση

Στην ανάπτυξη επαγγελματικών καρκίνων σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει η αλληλεπίδραση των φυσικών και χημικών γενοτοξικών παραγόντων, στους οποίους εκτίθεται ο άνθρωπος στο εργασιακό περιβάλλον, με το γενετικό του προφίλ. Το γενετικό προφίλ σε συνδυασμό με την έκθεση ενός ατόμου σε γενοτοξικούς παράγοντες συγκαθορίζουν την επιδεκτικότητα ενός ατόμου σε τοξικές χημικές ουσίες. Ανάμεσα στα γονίδια τα οποία έχει δειχθεί πως σχετίζονται με την καρκινογένεση συγκαταλέγονται τα ογκογονίδια (oncogenes). Τα ογκογονίδια, όπως για παράδειγμα τα ογκογονίδια *sis*, *abi*, *fes*, *erbB*, *src*, *Ha-ras*, *ki-ras*, *N-ras*, *fos*, *myb*, *myc* και *N-myc* (Bishop 1991), προέρχονται από διαταραχή της λειτουργίας γονιδίων που υπάρχουν φυσιολογικά στο γονιδίωμα, τα πρωτοογκογονίδια. Ο καρκίνος σε γενετικό επίπεδο μπορεί να οφείλεται σε μετατροπή ενός πρωτοογκογονιδίου σε ογκογονίδιο. Παραδείγματα ενεργοποίησης ογκογονιδίων αποτελούν οι περιπτώσεις διαφόρων μορφών λευχαιμίας. Επιπλέον, καρκινογένεση είναι δυνατό να προκληθεί ως αποτέλεσμα καταστολής της λειτουργικότητας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Για παράδειγμα, για το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 400 μεταλλάξεις. Ανάμεσα στα χαρακτηριστικά παραδείγματα μορφών καρκίνου οφειλόμενα σε ογκοκατασταλτικά γονίδια συγκαταλέγονται: το οικογενές ρετινοβλάστωμα (γονίδιο RB1), το σύνδρομο Li-Fraumeni (γονίδιο p53), η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (γονίδιο APC), το σύνδρομο von Hippel Lindau (γονίδιο VHL), ο όγκος Wilms (γονίδιο WT1), το οικογενές μελάνωμα (γονίδιο CDKN2A), το σύνδρομο Gorlin (γονίδιο PTCH), ο κληρονομικός καρκίνος του παχέως εντέρου (γονίδια MSH2 και MLH1) και ο οικογενής καρκίνος του μαστού (γονίδια BRCA1 και BRCA2) (Gelehrter et al. 2003). Άλλα γονίδια τα οποία φαίνεται να σχετίζονται με τη διαδικασία της καρκινογένεσης κωδικοποιούν πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα ένζυμα του κυτταρικού μεταβολισμού, ένζυμα μεταβολισμού ξενοβιοτικών παραγόντων, πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSP) καθώς και πρωτεΐνες ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου (π.χ. κινάσες, κυκλίνες, MPK, Cdc2, Cdk1, πρωτεϊνικές οικογένειες CIP και INK που ρυθμίζουν τη μετάβαση από τη G0/G1 και τη G1/S αντίστοιχα) (Yoon et al. 2003).

Σε αυτόν τον θεματικό άξονα πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση ενός μεγάλου αριθμού γενετικών πολυμορφισμών σε κρίσιμα γονίδια τα οποία σχετίζονται με διάφορες μορφές καρκίνου, με απώτερο στόχο τον σχεδιασμό μοριακών δεικτών καρκινογένεσης. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μεθοδολογίες μοριακής γενετικής με απώτερο στόχο τον σχεδιασμό μοριακών δεικτών προδιάθεσης στην καρκινογένεση.

## 2.3 Συσχετισμός γενετικών πολυμορφισμών με καρκινογένεση μετά από έκθεση σε γενοτοξικούς παράγοντες

Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί πολυμορφισμοί γονιδίων οι οποίοι σχετίζονται με την καρκινογένεση. Οι πολυμορφισμοί αυτοί αφορούν περιοχές κρίσιμων γονιδίων που μπορεί να σχετίζονται:

- (α) με την κωδικοποίηση ενζύμων του μηχανισμού ελέγχου διαφόρων σταδίων του κυτταρικού κύκλου

- (β) με την έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA (π.χ. ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως το γονίδιο p53, RB, XRCC1 XRCC3, APE1) (Hu et al. 2001, Kim et al. 2004, Krupa & Blasiac 2004, Thacker & Zdzienicka 2004)
- (γ) με γονίδια τα προϊόντα των οποίων εμπλέκονται σε μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης αυξητικών παραγόντων (π.χ. ογκογονίδια) (Bishop 1991, Hunter 1991, Scmandt & Mills 1993), κυτοκινών και γονιδίων θερμικού σοκ (HSPs) (Feron et al. 2002, Rockett et al. 2002, Lee et al. 2003, Yoon et al. 2003), καθώς και
- (δ) με την κωδικοποίηση ενζύμων που συμμετέχουν στους μηχανισμούς βιομεταμόρφωσης τοξικών ουσιών (π.χ. γονίδια της οικογένειας των τρανσφερασών της γλουταθειόνης, GST) (Their et al. 2003). Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται σε γονίδια τα προϊόντα των οποίων σχετίζονται με τους μηχανισμούς βιομεταμόρφωσης ξеноβιωτικών ουσιών και με τη συσχέτιση γενετικών πολυμορφισμών (και ελλείψεων) γονιδίων που συμμετέχουν στους μηχανισμούς αποτοξικοποίησης ουσιών, με την ενδογενή ευαισθησία σε τοξικές ουσίες. Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης για παράδειγμα είναι μία οικογένεια κυτταροπλασματικών ενζύμων (GSTs) που εμπλέκονται στους μηχανισμούς βιομεταμόρφωσης (Φάση II) χημικών ουσιών και γενετοξικών παραγόντων χρησιμοποιώντας ως συνένζυμο τη γλουταθειόνη. Ένα από τα μέλη της οικογένειας των τρανσφερασών της γλουταθειόνης, το γονίδιο GSTT1, εμφανίζει γενετικό πολυμορφισμό μεταξύ των ατόμων. Συγκεκριμένα, το ομόζυγο έλλειμμα (αρνητικός γονότυπος, null) των γονιδίων GSTT1 κυμαίνεται από 10%-30% ανάλογα με την εθνότητα και σχετίζεται με ελλιπή ικανότητα αποτοξικοποίησης διαφόρων γενετοξικών παραγόντων όπως για παράδειγμα των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (π.χ. βενζο[α]πυρένιο) (Norppa et al. 1995, Strange 1998, Bernardini et al. 2002). Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες επικεντρώνονται στη συσχέτιση του πολυμορφισμού στο γονίδιο GSTT1 με την αγγειογένεση και διάφορες μορφές καρκίνου (π.χ. καρκίνου του μαστού και πνεύμονα) (Medeiros et al. 2004, Sobti et al. 2004).

## 2.4 Συσχετισμός ακτινοευαισθησίας με γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση

Βιβλιογραφικά δεδομένα συσχετίζουν την (G2) ακτινοευαισθησία με τη γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα γενετικής διαταραχής που χαρακτηρίζεται από ευαισθησία σε γενετοξικούς παράγοντες, όπως χημικές ουσίες και ιοντίζουσα ακτινοβολία, αποτελεί το σύνδρομο Αταξίας Τηλαγγειεκτασίας (AT, Ataxia Telangiectasia). Πρόκειται για μία αυτοσωματική υπολειπόμενη διαταραχή η οποία εκδηλώνεται στην παιδική ηλικία και αντιπροσωπεύει ένα ιδανικό μοντέλο μελέτης των μηχανισμών γονιδιωματικής αστάθειας, ευαισθησίας στην ιοντίζουσα ακτινοβολία και γενικά σε γενετοξικούς παράγοντες και καρκινογένεσης. Χαρακτηρίζεται από προοδευτικό εγκεφαλικό εκφυλισμό, ανοσοποιητική ανεπάρκεια, αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης λευχαιμίας ή λεμφώματος, ακτινοευαισθησία, γονιδιωματική αστάθεια και ελαττωματικά σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Υπολογίζεται ότι 1% του γενικού πληθυσμού είναι ετερόζυγοι για το γονίδιο ATM, αν και κλινικά είναι μη διακριτοί από τα φυσιολογικά άτομα, παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου κατά την ενηλικίωση και επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι σε οικογένειες με

ΑΤ οι ετερόζυγες γυναίκες είχαν 5 φορές αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού και η εμφάνισή του ήταν 6,6 φορές μεγαλύτερη σε γυναίκες άνω των 60 ετών. Το γονίδιο ATM εδράζεται στο χρωμόσωμα 11 στη θέση q22.23 και περισσότερες από 300 διαφορετικές μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ΑΤ διασκορπισμένες σε όλο το μήκος του γονιδίου. Το μεγάλο μέγεθος του γονιδίου, η πολυπλοκότητά του και η έλλειψη σημείων υψηλού κινδύνου για μεταλλάξεις, καθώς και ο περιορισμένος αριθμός των μεταλλάξεων που ανιχνεύει η δοκιμασία πρόωγου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης αποτελούν πρόβλημα στην έρευνα και στην ταυτοποίηση των ετερόζυγων ατόμων. Εναλλακτικές μέθοδοι ανίχνευσης των ετερόζυγων ατόμων μπορούν να αποτελέσουν επιγονιδιακές εκφράσεις, όπως η αυξημένη ευαισθησία σε γενοτοξικούς παράγοντες καθώς και η απορύθμιση παραγόντων του κυτταρικού κύκλου όπως ο MPF (Mitosis Promoting Factor).





## 3

## ΠΡΟΣΔΟΚΩΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η επίδραση των διαφόρων καρκινογόνων παραγόντων στη χρωμοσωματική ακεραιότητα και τη γονιδιακή έκφραση αναμένεται να αποκαλύψει ορισμένους από τους μηχανισμούς δράσης τους και θα δημιουργήσει νέα εργαλεία για τον έλεγχο έκθεσης και τοξικότητας διαφόρων ουσιών στους χώρους εργασίας.

Γενετικοί πολυμορφισμοί σε κρίσιμα γονίδια ή και μεταλλάξεις αυτών, ως αποτέλεσμα έκθεσης σε γενετοξικούς παράγοντες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώιμοι δείκτες καρκινογένεσης των εργαζομένων. Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών αναμένεται να συμβάλλουν:

(α) στην κατανόηση των μηχανισμών γενετοξικής δράσης χημικών και φυσικών περιβαλλοντικών παραγόντων που εκλύονται στο εργασιακό περιβάλλον

(β) στον εντοπισμό περιοχών γονιδιώματος ή και συγκεκριμένων γονιδίων που ευρίσκονται στα σημεία θραύσης ή αλλοιώσεων των χρωμοσωμάτων, ώστε στη συνέχεια να γίνει έλεγχος της γονιδιακής τους έκφρασης με χρήση μοριακών τεχνικών

(γ) στην αποτελεσματικότερη πρόληψη του επαγγελματικού καρκίνου, στην έγκαιρη διάγνωση νεοπλασματικών ασθενειών στους εργαζόμενους και επομένως στην αποτελεσματικότερη θεραπευτική τους αντιμετώπιση. Όσον αφορά τον έλεγχο γενετικού υπόβαθρου και προδιάθεσης στον καρκίνο, τα δεδομένα αυτά θα βοηθήσουν τους τοξικολόγους και άλλους επιστήμονες στην κατανόηση της ατομικής επιδεκτικότητας σε ασθένειες που εκδηλώνονται από περιβαλλοντολογικούς παράγοντες και ιδιαίτερα όσον αφορά τη γένεση επαγγελματικών καρκίνων. Ο απώτερος στόχος είναι να βοηθήσει τους ανθρώπους ώστε να αλλάξουν τρόπο ζωής, αλλά και τις βιομηχανίες ώστε να μειώσουν τους παράγοντες εκείνους που επηρεάζουν την υγεία των εργαζομένων.

Για την επίτευξη των ανωτέρω στόχων, στην παρούσα μελέτη αναπτύσσονται νέες μεθοδολογίες κυτταρογενετικής με στόχο την:

1. Ακριβέστερη ανίχνευση των δομικών χρωμοσωματικών αλλοιώσεων που επάγονται από περιβαλλοντικούς γενετοξικούς παράγοντες σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, έτσι ώστε να γίνεται καλύτερη αξιολόγηση της βλαπτικής δράσης γενετοξικών παραγόντων.

2. Ταυτοποίηση πολυμορφισμών κρίσιμων γονιδίων που φαίνεται να σχετίζονται με την καρκινογένεση καθώς και τη συσχέτιση μεταλλάξεων των γονιδιωματικών αυτών περιοχών μετά από έκθεση σε γενετοξικούς παράγοντες.

3. Αποσαφήνιση μηχανισμών καρκινογένεσης σχετιζόμενους με την ακτινοευαισθησία.



## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.1 Τεχνική λήψης δείγματος περιφερικού αίματος ασθενών υγιών δοτών

Το περιφερικό αίμα λαμβάνεται σε αυστηρά ασηπτικές συνθήκες. Τα δείγματα συλλέγονται με σύριγγα από τους δότες και μεταφέρονται σε σωλήνες που περιέχουν ηπαρίνη. Η μεταφορά των δειγμάτων περιφερικού αίματος πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και οι κυτταροκαλλιέργειες σε όλα τα πρωτογενή δείγματα πραγματοποιούνται άμεσα. Σε περιπτώσεις που πραγματοποιείται γονιδιακή ανάλυση τα δείγματα αίματος συλλέγονται σε EDTA. Προκειμένου να μελετηθούν οι μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1, BRCA2 και RET, χρησιμοποιήθηκε περιφερικό αίμα προερχόμενο από 167 ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού ή/και των ωοθηκών, 357 ασθενείς με σποραδικό καρκίνο του μαστού / ωοθηκών (χωρίς οικογενειακό ιστορικό) και 60 ασθενείς με σποραδικό ή κληρονομικό καρκίνο του θυρεοειδούς. Επιπλέον συλλέχθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος 150 υγιών ατόμων (normal controls). Η συλλογή των παραπάνω δειγμάτων έγινε σε συνεργασία με τον Καθηγητή Γ. Φούντζηλα του Ιατρικού τμήματος του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης στο Νοσοκομείο Παπαγεωργίου και με τον διευθυντή της ενδοκρινολογικής κλινικής του αντικαρκινικού νοσοκομείου Μεταξά.

### 4.2 Καλλιέργειες διεγερμένων λεμφοκυττάρων

Για την εκτίμηση της επικινδυνότητας των χημικών ουσιών στον άνθρωπο, έχουν χρησιμοποιηθεί κυτταρογενετικές μέθοδοι οι οποίες βασίζονται κυρίως στη συμβατική μεθοδολογία ανάλυσης των χρωμοσωμάτων στη μετάφαση. Ειδικότερα, σε κάθε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν 0,5 ml περιφερικού αίματος τεσσάρων υγιών δοτών σε 5 ml θρεπτικό υλικό Mc Coy's 5A (10% εμβρυϊκό ορό μόσχου, 1 ml γλουταμίνη, 1 ml αντιβιοτικών-πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη). Για την ανοσοδιέγερση των λεμφοκυττάρων σε καλλιέργειες ολικού αίματος χρησιμοποιήθηκε η μιτογόνος ουσία φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA, phytoheamagglutinin) η οποία δρα διεγερτικά στα διαφοροποιημένα T-λεμφοκύτταρα, προκαλώντας κυτταρικό βλαστικό μετασχηματισμό, βλαστογένεση και μιτογόνο αποτέλεσμα. Η διέγερση των λεμφοκυττάρων με μιτογόνους παράγοντες επιτρέπει τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου των διεγερμένων λεμφοκυττάρων και των μεταφασικών χρωμοσωμάτων. Οι καλλιέργειες επάξονται στους 37°C, παρουσία CO<sub>2</sub> (5%) για 72 ώρες. Στην παρούσα μελέτη γίνεται συνδυασμός μεθόδων κλασσικής κυτταρογενετικής με άλλες κυτταρογενετικές μεθόδους, με σκοπό την προτυποποίηση πειραματικών μοντέλων για τη βιολογική παρακολούθηση έκθεσης σε γενοτοξικούς παράγοντες.

#### 4.2.1 Καλλιέργεια διεγερμένων λεμφοκυττάρων με μιτογόνους παράγοντες για την ανάλυση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων στη μετάφαση (M)

Σε κάθε καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν 0,5 ml περιφερικού αίματος τεσσάρων υγιών δοτών σε 5 ml θρεπτικό υλικό Mc Coy's 5A (10% εμβρυϊκό ορό μόσχου, 1 ml γλουταμίνη, 1 ml αντιβιοτικών-πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη). Για την ανοσοδιέγερση των λεμφοκυττάρων σε καλλιέργειες ολικού αίματος, χρησιμοποιήθηκε η μιτογόνος ουσία φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA, phytoheamagglutinin) η οποία δρα διεγερτικά στα διαφοροποιημένα T-λεμφοκύτταρα, προκαλώντας κυτταρικό βλαστικό μετασχηματισμό, βλαστογένεση και μιτογόνο αποτέλεσμα. Η διέγερση των λεμφοκυττάρων με μιτογόνους παράγοντες επιτρέπει τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου των διεγερμένων λεμφοκυττάρων και των μεταφασικών χρωμοσωμάτων. Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C, παρουσία CO<sub>2</sub> (5%) για 72 ώρες.

#### 4.2.2 Καλλιέργεια διεγερμένων λεμφοκυττάρων για την ανάλυση επαγωγής ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων (SCEs, Sister Chromatid Exchanges) παρουσία BrdU

Για τη μελέτη της γενοτοξικότητας ουσιών που επιδρούν κατά τη φάση S (DNA Synthesis) του κυτταρικού κύκλου, καθώς επίσης και τη μελέτη της επαγόμενης καθυστέρησης της συχνότητας της κυτταρικής διαίρεσης, χρησιμοποιείται η μέθοδος επαγωγής ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων (SCEs, Sister Chromatid Exchanges). Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται ως σύστημα ελέγχου της μεταλλαξιγόνου δράσης χημικών ουσιών. Οι ανταλλαγές των αδελφών χρωματίδων ανιχνεύονται με διαφορετική χρώση κάθε χρωματίδας των μιτωτικών χρωμοσωμάτων, η οποία επιτυγχάνεται λόγω της παρουσίας ενός αναλόγου της θυμιδίνης, της **βρωμο-δεόξυ-ουριδίνης** (BrdU, 5-Bromo-2-Deoxyuridine) (10 mM) στο νεοσυντιθέμενο DNA για δύο διαδοχικούς κυτταρικούς κύκλους.

Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες επικεντρώνονται στη συσχέτιση του πολυμορφισμού στο γονίδιο GSTT1 με την αγγειογένεση και διάφορες μορφές καρκίνου (π.χ. καρκίνου του μαστού και του πνεύμονα) (Medeiros et al. 2004, Sobti et al. 2004). Για τον λόγο αυτό, εξετάστηκε εάν η ενδογενής ευαισθησία σε επίπεδο SCEs συσχετίζεται με πολυμορφισμό στο γονίδιο GSTT1. Έγινε σύγκριση του αριθμού των επαγόμενων αλλοιώσεων και των SCEs μεταξύ δοτών που φέρουν το γονίδιο GSTT1 (GSTT1+) με δότες που εμφανίζουν αρνητικό γονότυπο (GSTT1 null genotype, GSTT1-). Οι γενετικοί πολυμορφισμοί προσδιορίστηκαν μετά από απομόνωση γενετικού υλικού από περιφερικό αίμα και την εφαρμογή της μεθοδολογίας PCR (multiplex PCR). Επιπλέον, διερευνήθηκε εάν ο πολυμορφισμός στο γονίδιο GSTT1 επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό ανταλλαγής αδελφών χρωματίδων, μετά από έκθεση σε γενοτοξικό παράγοντα της οικογένειας των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων όπως το βενζο[α]πυρένιο (Bernardini et al. 2002, Medeiros et al. 2004, Nelson et al. 1995, Norppa et al. 1995, Sobti et al. 2004, Tsutsida & Sato 1992).

### 4.2.3 Καλλιέργεια διεγερμένων λεμφοκυττάρων για την ανάλυση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων με τη μέθοδο της πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης (PCC, *Premature Chromosome Condensation*) μέσω χρήσης καλικουλίνης

Για την εκτίμηση της επικινδυνότητας των χημικών ουσιών στον άνθρωπο, έχουν χρησιμοποιηθεί κυτταρογενετικές μέθοδοι οι οποίες βασίζονται στη συμβατική μεθοδολογία ανάλυσης των χρωμοσωμάτων στη μετάφαση. 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 των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων και των SCEs είναι ελαφρώς αυξημένη αναφορικά με μετρήσεις σε δείγματα μη εκτεθειμένα, η γενετοξική δράση χαρακτηρίζεται ως μηδαμινή μετά από έκθεση σε δόσεις μεγέθους τέτοιου ώστε να μη θεωρούνται κυτταροτοξικές. Εντούτοις, παρόλο που με τη χρήση υψηλότερων χημικών δόσεων θα μπορούσε να εξακριβωθεί αν η συχνότητα ανταλλαγής αδελφών χρωματίδων 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. Η προτεινόμενη σε αυτήν την εργασία κυτταρογενετική μεθοδολογία για την αξιολόγηση μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων παραγόντων ξεπερνά αυτή τη δυσκολία της συμβατικής μεθόδου, διότι καθιστά δυνατή την ανάλυση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματίδων και των αχρωμοσωματικών αλλοιώσεων στη μεσόφαση και ιδιαίτερα σε πρόωρα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα λεμφοκυττάρων στην G2 φάση του κυτταρικού τους κύκλου (G2-PCCs).

Για την απευθείας ανάλυση των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων στη φάση G2, η χημική ουσία **καλικουλίνη** (*Calycoulin-A*) προστίθεται στις καλλιέργειες περιφερικού αίματος (από 10 nM έως 100 nM) πριν τη μονιμοποίηση. Η καλικουλίνη, δρα ως παρεμποδιστής των φωσφατασών με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του DNA από τις φωσφορυλάσες και το πρόωρο πακετάρισμα του DNA. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται σύγκριση της συχνότητας και της μορφολογίας των πρόωρα συμπυκνωμένων κυττάρων παρουσία καλικουλίνης με τα δείγματα μάρτυρες (Alsbeih & Raaphorst 1999, Begg et al. 2001, Terzoudi et al. 2003).

Η PCC μεθοδολογία εφαρμόστηκε σε συνδυασμό με τις μεθοδολογίες κλασικής κυτταρογενετικής για ανάλυση των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων, καθώς και για ανάλυση του αριθμού των SCEs τόσο στη μετάφαση όσο και στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Μια επισκόπηση (review article) σχετικά με τη χρήση της χημικής ουσίας καλικουλίνη και γενικότερα την εφαρμογή της μεθοδολογίας της πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης (PCC, *Premature Chromosome Condensation*) στη μελέτη των επιπτώσεων επιβλαβών περιβαλλοντικών παραγόντων στο γενετικό υλικό δημοσιεύθηκε στο Επιστημονικό Περιοδικό “*The Scientific World Journal*” (Βλ. Παρ. 8, Δημοσίευση Αποτελεσμάτων).

#### 4.2.4 Καλλιέργεια και ακτινοβόληση λεμφοκυττάρων για την ανάλυση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων με τη μέθοδο της πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης με κυτταρική σύντηξη

Για την εφαρμογή και προτυποποίηση της μεθοδολογίας αυτής, συνδυάστηκε η μέθοδος ανάλυσης των ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων (SCE, Sister Chromatin Exchange) με τη χρήση της μεθοδολογίας της πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης (PCC, Premature Chromosome Condensation), που έχει αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Υγαιοφυσικής & Περιβαλλοντικής Υγιεινής (Ι.Π.Τ.Α., Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος), ώστε να καταστεί δυνατή η απευθείας ανάλυση της μεταλλαξιγόνου δράσης των υπό μελέτη τοξικών ουσιών στον άνθρωπο (Pantelias & Mallie 1985, Terzoudi & Pantelias 1997, Terzoudi et al. 2003).

Συγκεκριμένα, για την απευθείας ανάλυση των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων στη μεσόφαση, τα λεμφοκύτταρα απομονώνονται από το ολικό περιφερικό αίμα με τη μέθοδο καθίζησης σε φικόλη (Ficoll-Paque, Biochrom KG seromed, No. L6113) (Boyum, 1968) ως εξής: 5ml ολικού περιφερικού αίματος τοποθετούνται επάνω σε 5 ml φικόλης σε σωλήνες φυγοκέντρου των 12ml. Μετά από φυγοκέντρηση στις 1700 στροφές/min για 30 min συλλέγεται το ενδιάμεσο στρώμα που είναι εμπλουτισμένο σε λεμφοκύτταρα, τα οποία αφού πλυθούν δύο φορές με πλήρες θρεπτικό υλικό για ν' απομακρυνθεί η φικόλη και φυγοκεντρηθούν στις 1500 στροφές/min, μεταφέρονται σε σωλήνα καλλιέργειας με θρεπτικό υλικό McCoy's 5A και 10% FCS. Μετά την έκθεσή τους σε 1, 2 και 3 Gy ακτινοβολίας X, επωάζονται για 8 ώρες στους 37°C ώστε να γίνει η επεξεργασία των μοριακών (DNA) και χρωμοσωματικών αλλοιώσεων από τους επιδιορθωτικούς ενζυματικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Ακολούθως, με τη συντηξιγόνο ουσία πολυαιθυλενγλυκόλη (polyethylene-glycol, PEG) συντήκονται τα λεμφοκύτταρα με μιτωτικά CHO (Chinese Hamster Ovary) κύτταρα ώστε να επιτευχθεί πρόωρη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων τους (Pantelias and Maillie 1983). Τα μιτωτικά κύτταρα CHO συλλέγονται με εκλεκτική αποκόλληση από εκθετικές καλλιέργειες μετά από επίδραση κολσεμίδης με τελική συγκέντρωση 0,2 µg/ml για 3 ώρες και μεταφέρονται σε σωλήνα καλλιέργειας με στρογγυλό πυθμένα. Στον ίδιο σωλήνα μεταφέρονται πέντε φορές περισσότερα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα και το κυτταρικό μίγμα φυγοκεντρείται στις 800 στροφές/min για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και θρεπτικό υλικό χωρίς FCS προστίθεται στο μίγμα. Τα κύτταρα πλένονται σε θρεπτικό υλικό ώστε ν' απομακρυνθεί ο ορός από τις επιφάνειες τους και να διευκολυνθεί η σύντηξη. Μετά από άλλη μια φυγοκέντρηση το υπερκείμενο υλικό απομακρύνεται και ο σωλήνας καλλιέργειας τοποθετείται ανάποδα ώστε να αποστραγγιστεί το κυτταρικό ίζημα από το υγρό. Στη συνέχεια προστίθενται 0,20 ml διαλύματος πολυαιθυλενγλυκόλης (PEG 1500, Boehringer) και το κυτταρικό ίζημα εκτίθεται στο συντηξιγόνο αυτό για 1 λεπτό περίπου. Ο σωλήνας ανακινείται ελαφρά ώστε τα κύτταρα να επαναιωρηθούν με τη μορφή μικρών συσσωματωμάτων. Μέσα στα επόμενα 2 λεπτά προστίθενται σταγόνα-σταγόνα 2ml PBS (Phosphate Buffered Solution, Biochrom KG seromed, No. L1823) με ήπια ανάδευση. Το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 800 στροφές ανά λεπτό. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 0,7 ml McCoy's 5A με 10% FCS και 0,05 ml κολσεμίδη. Τέλος το κυτταρικό μίγμα επωάζεται στους 37°C σε ατμόσφαιρα 95% αέρα, 5% CO<sub>2</sub> και 100% υγρασία για 75 λεπτά. Η κυτταρική σύντηξη έχει επιτευχθεί από τα πρώτα κιόλας στάδια της επώασης, ενώ η πρόωρη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων των μεσοφασικών κυττάρων ολοκληρώνεται σε 75 λεπτά.

### 4.3 Απομόνωση DNA λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος

Το DNA λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος απομονώθηκε ακολουθώντας το πρωτόκολλο για τις στήλες απομόνωσης της MACHEREY-NAGEL (NucleoSpin Blood L). Τα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος προέρχονται από υγιείς δότες (control) καθώς και από ασθενείς πάσχουσες από καρκίνο του μαστού ή / και των ωοθηκών. Συνολικά απομονώθηκαν και συλλέχθηκαν περισσότερα από 600 δείγματα αίματος ασθενών και 180 δειγμάτων DNA υγιών ατόμων. Μέρος των απομονωμένων DNAs (100μg) εστάλησαν στο εργαστήριο της Καθηγήτριας Ογκολογίας Mary Claire King στο University of Washington - Seattle των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής, με την οποία ξεκινήσαμε συνεργασία για τη μελέτη νέων γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών σε Ελληνίδες ασθενείς.

### 4.4 Έκθεση κυτταρικών καλλιιεργειών διεγερμένων T-λεμφοκυττάρων σε γενετοξικούς παράγοντες

Ο έλεγχος της μεταλλαξιγόνου δράσης των τοξικών ουσιών εκτιμάται μετά από έκθεση των καλλιιεργειών στις υπό μελέτη ουσίες. Οι κυτταρικές καλλιιεργειες εκτίθενται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων (0,5-200 μM) επιλεγμένων χημικών παραγόντων όπως τριχλωροαιθυλένιο, υδροκινόνη, γλουταραλδεΐδη, βενζο[α]πυρένιο και ατραζίνη από 2-48 ώρες. Ως διαλύτης, για τις ουσίες αυτές, χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο διάλυμα PBS και οι ουσίες παρασκευάστηκαν πριν τη χρήση.

### 4.5 Έκθεση κυτταρικών καλλιιεργειών λεμφοκυττάρων σε ιοντίζουσα ακτινοβολία (G2-assay) για την ανίχνευση αυξημένης ευαισθησίας στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου (G2-έλεγχος ακτινοευαισθησίας)

Με στόχο την ανάπτυξη μεθοδολογίας ικανής να διακρίνει διαφορές στην ευαισθησία των ατόμων του πληθυσμού στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες, μελετήθηκε η ακτινοευαισθησία των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος φυσιολογικών δοτών στην G<sub>2</sub> φάση του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, καλλιιεργειες ολικού αίματος 72 ώρες μετά την έναρξη και την ενεργοποίησή τους με PHA (σύμφωνα με την παράγραφο II.1) εκτίθενται σε δόση 0,5Gy και 1Gy ακτινοβολίας-γ στους 4°C. Σε κάθε δόση ακτινοβολίας εκτίθενται τουλάχιστον δύο δείγματα κάθε δότη και παράλληλα καλλιιεργειες ολικού αίματος μη εκτιθέμενες σε ακτινοβολία-γ χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες. Τα δείγματα στη συνέχεια επωάζονται στους 37°C για 30 min ώστε τα κύτταρα που είχαν προετοιμαστεί για τη διαδικασία της μίτωσης να ολοκληρώσουν τη διαίρεσή τους, άλλωστε στη φάση αυτή δεν είναι δυνατόν να εκφράσουν ως χρωμοσωματικές αλλοιώσεις το αποτέλεσμα της ακτινοβολήσής τους. Μετά την επίδραση κολσε-

μίδης για μία ώρα τα λεμφοκύτταρα που ακτινοβολήθηκαν στην  $G_2$  φάση του κυτταρικού τους κύκλου συλλέγονται στη μετάφαση. Γίνονται μόνιμα παρασκευάσματα και τα λεμφοκύτταρα εξετάζονται ως προς τις αλλοιώσεις τύπου χρωματίδης που παρουσιάζουν. Οι αλλοιώσεις που συνήθως παρουσιάζονται είναι θραύσματα σε μία από τις δύο χρωματίδες ή χάσματα, ασυνέχειες των χρωματίδων και σπανιότερα ανταλλαγές μεταξύ χρωματίδων διαφορετικών χρωμοσωμάτων. Για την εκτίμηση των αλλοιώσεων αναλύονται 100 κύτταρα για κάθε πειραματικό σημείο. Τα κριτήρια της Sanford et al (1989) έχουν υιοθετηθεί για την αξιολόγηση των αλλοιώσεων, κατά συνέπεια στις μετρήσεις έχουν ληφθεί υπ' όψιν τα θραύσματα και όσες εκ των ασυνεχειών χρωματίδης είναι μεγαλύτερες από το πάχος αυτής.

Στην περίπτωση της υδροκινόνης και της γλουταραλδεϋδης-ουσίες που εμπεριέχονται στη σύσταση εμφανιστικών υγρών στα ακτινολογικά εργαστήρια- πραγματοποιήθηκαν κυτταρογενετικές μελέτες σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος υγιών δοτών μετά από συνεπίδραση υδροκινόνης σε συνδυασμό με ιοντίζουσα ακτινοβολία 1-3 Gy (ακτινοβολία- $\gamma$ ).

#### **4.6 Συλλογή και μονιμοποίηση κυττάρων καλλιέργειας και προετοιμασία χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων**

Στις καλλιέργειες των κυττάρων περιφερικού αίματος καθώς και στις συντήξεις λεμφοκυττάρων με μιτωτικά CHO κύτταρα προστίθενται 10ml υπότονου διαλύματος KCl 0.075 M για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στο διάστημα αυτό τα κύτταρα διογκώνονται. Αυτό συμβαίνει γιατί το διάλυμα αυτό ως υπότονο έχει χαμηλότερη τιμή ωσμωτικής πίεσης σε σχέση μ' αυτή που αναπτύσσεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Προκειμένου να επιτευχθεί εξίσωση των διαφορετικών πιέσεων, συλλαμβάνεται νερό από το κύτταρο με τη βοήθεια της ημιπερατής του μεμβράνης και έτσι το κύτταρο διογκώνεται χωρίς φυσικά να διαρραγεί η μεμβράνη του, ενώ ταυτόχρονα τα χρωμοσώματα απλώνονται και γίνονται ορατά σχεδόν χωρίς το ένα να επικαλύπτει το άλλο. Για να αποφευχθεί ο σχηματισμός κυτταρικών συσσωματωμάτων κατά τη μονιμοποίηση, το υπότονο διάλυμα KCl απομακρύνεται μετά από φυγοκέντρηση 5 λεπτών στις 1200 στροφές/min, εκτός από περίπου 0.5ml στα οποία και επαναιωρούνται τα κύτταρα. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιούνται σε μεθανόλη:οξικό οξύ 3:1 (v/v). Προστίθενται 10ml μονιμοποιητή (fixative) και, μετά από μια επιπλέον φυγοκέντρηση και απόχυση του πρώτου μονιμοποιητή, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 6ml φρέσκου μονιμοποιητή. Το κυτταρικό διάλυμα απλώνεται σε υγρές αντικειμενοφόρους πλάκες, η ποιότητα των χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων ελέγχεται με μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης και τα παρασκευάσματα φυλάσσονται στους  $-200^\circ\text{C}$ .



## 4.7 Χρώσεις κυτταρικών παρασκευασμάτων

Το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται για τη χρώση των κυτταρολογικών παρασκευασμάτων, τροποποιείται ανάλογα με το φαινόμενο που μελετάται.

### 4.7.1 Απλή χρώση με Giemsa

Η απλή χρώση των παρασκευασμάτων, επιτρέπει τη μελέτη των χρωμοσωματικών (π.χ. δικεντρικά χρωμοσώματα, δακτυλοειδή χρωμοσώματα) και χρωματιδικών (π.χ. χρωμοσωματικά θραύσματα στη μία ή/και στις δύο χρωματίδες) στο οπτικό μικροσκόπιο τόσο στη φάση της μετάφασης όσο και σε άλλες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Τα παρασκευάσματα, βάφονται σε χρώση Giemsa 4% για 15 λεπτά.

### 4.7.2 Χρώση ζώνωσης χρωμοσωμάτων (G-banding) για καρυοτυπική ανάλυση

Η χρώση ζωνοποίησης των κυτταρολογικών παρασκευασμάτων (G-banding), επιτρέπει τη μελέτη των μεταφασικών χρωμοσωμάτων και τον προσδιορισμό των ανευπλοειδιών και χρωμοσωματικών βλαβών, καθώς επίσης και την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού κύκλου με τον υπολογισμό του μιτωτικού δείκτη (M.I., Mitotic Index).

Η G-ζωνοποίηση των χρωμοσωμάτων προσφέρει ως πλεονέκτημα, έναντι της απλής χρώσης με Giemsa, την λεπτομερή ταξινόμηση των χρωμοσωμάτων (καρυότυπος) και τον ακριβέστερο εντοπισμό και χαρακτηρισμό των χρωμοσωματικών βλαβών. Δομικές επομένως ατυπίες που αφορούν δύο ή περισσότερα χρωμοσώματα και εμφανίζονται συνήθως σαν μετατοπίσεις ή ανταλλαγές χρωμοσωμικού υλικού που αφορούν το συνολικό γονιδίωμα ενός κυττάρου μπορούν να εντοπιστούν. Για τη δημιουργία G-χρωμοσωματικής ζωνοποίησης, τα κυτταρολογικά παρασκευάσματα, μετά από τεχνητή παλαίωση στους 80°C για 1 h, εκτίθενται για 40 sec-1 min σε τρυψίνη, ξεπλένονται σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,9% και χρωματίζονται με χρώση Giemsa (4%).

### 4.7.3 Χρώση για μελέτη του αριθμού ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων (SCEs)

Η διάκριση των μεταφάσεων του πρώτου κυτταρικού κύκλου (M1) μετά την έναρξη της καλλιέργειας από αυτές μετά τη συμπλήρωση δύο ή τριών κυτταρικών κύκλων γίνεται με βάση τη διαφορετική χρώση των αδελφών χρωματίδων και τις ανταλλαγές που παρουσιάζουν μεταξύ τους (Sister chromatid exchanges, SCE), εξαιτίας της παρουσίας του BrdU στο νεοσυντιθεμένο DNA και την τεχνική FPG (Fluorescence plus Giemsa staining). Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, τα δείγματα μετά την προετοιμασία τους με Hoechst 33258 (5 µg/ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα Sorensen's Phosphate Buffer (pH 6,8) εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία για 10 λεπτά αφού τοποθετηθούν σε θερμαινόμενη πλά-

κα στους 55°C. Στη συνέχεια, τα παρασκευάσματα ξεπλένονται με Sorensen's Phosphate Buffer και υπόκεινται σε χρώση με Giemsa (4%) Ακολουθεί ανάλυση στο οπτικό μικροσκόπιο. Για κάθε συγκέντρωση χημικού παράγοντα, σε κάθε δόση, μετρήθηκαν 50 μεταφάσεις με 46 χρωματοσώματα η κάθε μία και προσδιορίστηκε ο αριθμός των ανταλλαγών μεταξύ αδελφών χρωματιδίων (SCEs).

## 4.8 Υπολογισμός Μιτωτικού Δείκτη (M.I.) και Δείκτη Διπλασιασμού

### 4.8.1 Υπολογισμός Μιτωτικού Δείκτη (M.I., Mitotic Index)

Η εκτίμηση της πιθανής κυτταροτοξικής δράσης της κάθε ουσίας πραγματοποιήθηκε με κριτήριο τον Μιτωτικό Δείκτη (MI, Mitotic Index), δηλαδή το ποσοστό (%) των κυττάρων που βρίσκονται σε διαίρεση. Για τον υπολογισμό του Μιτωτικού Δείκτη, μετρήθηκαν 2000 κύτταρα για κάθε συγκέντρωση της ουσίας που εξετάστηκαν σε κάθε δόση και καταγράφηκε ο αριθμός των κυττάρων σε διαίρεση με 46 χρωματοσώματα. Ο υπολογισμός του Μιτωτικού Δείκτη πραγματοποιήθηκε με βάση τον τύπο:

$$MI = \text{Αριθμός Κυττάρων σε Διαίρεση} / \text{Συνολικό Αριθμό Κυττάρων} \times 100$$

Οι συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών που μελετήθηκαν σε καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων υγιών δοτών ήταν από 0,01 mM έως 50 μM.

### 4.8.2 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:  $RI = \text{Replication Index}$

$M_1, M_2, M_3 =$  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 δόση ήταν 2000 μεταφάσεις με 46 χρωμοσώματα.

## 4.9 Μεθοδολογία multiplex-PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι μία ενζυμική 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 απαιτεί την παρουσία του ενζύμου DNA πολυμεράσης που χρησιμοποιεί το μονόκλωνο τμήμα DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου και ενός ζεύγους ολιγονουκλεοτιδικών μορίων (εκκινητή, primer) για την έναρξη της σύνθεσης του DNA. Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές υβριδίζονται σε συμπληρωματικές θέσεις των δύο αλυσίδων, στα άκρα του υπό ενίσχυση τμήματος DNA και η σύνθεση συμπληρωματικών ακολουθιών, πραγματοποιείται με τη βοήθεια θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq DNA polymerase). Η αντίδραση που πραγματοποιείται περιλαμβάνει τρία επαναλαμβανόμενα στάδια: (1) Τη θερμική μετουσίωση του DNA (90-95°C) (2) Τον υβριδισμό των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) στις συμπληρωματικές ακολουθίες DNA (~ 55°C) και (3) Τον πολυμερισμό (σύνθεση) συμπληρωματικών ακολουθιών με τη δράση της DNA πολυμεράσης (72°C υπό την παρουσία dNTPs και  $Mg^{2+}$ ). Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 2% ώστε να διαπιστωθεί η διαφορετική ή όχι ηλεκτροφορητική κινητικότητα των προϊόντων.

Η multiplex-PCR διαφέρει ως προς τη συμβατική PCR μεθοδολογία στη χρήση περισσότερων του ενός ζεύγους εκκινητών (primers) με σκοπό την ενίσχυση (πολλαπλασιασμό) πολλών γονιδιωματικών περιοχών στην ίδια αντίδραση. Στην παρούσα μελέτη, η εν λόγω μεθοδολογία χρησιμοποιείται για τους εξής σκοπούς:

### 4.9.1 Για προσδιορισμό GSTT1 γονοτύπου

Η μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του GSTT1 γονοτύπου σε 40 διαφορετικούς δότες. Πρόκειται για μία *in vitro* ενζυμική μέθοδο ενίσχυσης μίας συγκεκριμένης ακολουθίας DNA για τη διεκπεραίωση της οποίας απαιτείται η παρουσία δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers). Το γονιδιωματικό DNA απομονώθηκε από κύτταρα περιφερικού αίματος σύμφωνα με το πρωτόκολλο *DNA Isolation Kit* (Puregene). Πολυμορφισμοί (παρουσία ή απουσία) στο γονίδιο GSTT1 προσδιορίστηκαν με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών για το γονίδιο GSTT1. Στην ίδια αντίδραση, πραγματοποιήθηκε παράλληλα ενίσχυση του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Το γονίδιο της β-σφαιρίνης, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας για την αντίδραση. Το μέγεθος των προϊόντων PCR είναι 480bp για το γονίδιο GSTT1 και 345bp για το γονίδιο της β-σφαιρίνης. Το προϊόν της β-σφαιρίνης εντοπίζεται σε κάθε αντίδραση. Το προϊόν του γονιδίου GSTT1 εμφανίζεται στην πηκτή αγαρόζης μόνο στις περιπτώσεις δοτών που φέρουν το γονίδιο στο γενετικό τους υλικό. Οι δότες στους οποίους απουσιάζει η χαρακτηριστική ζώνη στα 450bp χαρακτηρίζονται ως αρνητικοί (GSTT1 null genotype, GSTT1-). Για το συγκεκριμένο πείραμα, απαιτήθηκε η απομόνωση DNA και η εφαρμογή της αντίδρασης PCR σε 40 διαφορετικούς δότες. Κάθε αντίδραση PCR επαναλήφθηκε δύο φορές.

## 4.9.2 Για ταυτοποίηση μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA1 και BRCA2

Η μελέτη ξεκίνησε από δύο γνωστά για το εργαστήριό μας ογκοκατασταλτικά γονίδια τα *BRCA1* και *BRCA2*. Σχεδιάστηκαν primers οι οποίοι καλύπτουν όλα τα εξώνια και των δύο γονιδίων με σκοπό τον πολλαπλασιασμό τους μέσω της polymerase chain reaction (PCR). Συνολικά σχεδιάστηκαν 30 ζευγάρια primers για το *BRCA1* και 45 για το *BRCA2*. Στη συνέχεια απομονώθηκε DNA από αίμα 167 ατόμων με ιστορικό καρκίνου του μαστού. Τα εξώνια των παραπάνω γονιδίων πολλαπλασιάστηκαν μέσω της PCR και ανιχνεύονται, χρησιμοποιώντας την τεχνική του sequencing, για την πλήρη καταγραφή όλων των σημειακών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs). Το όργανο που χρησιμοποιείται είναι το ABI 310 Genetic Analyser.

## 4.9.3 Για μελέτη σημειακής μετάλλαξης G1738R του γονιδίου BRCA1

Όσον αφορά το γονίδιο *BRCA1*, η σημειακή μετάλλαξη G1738R έχει ανιχνευθεί στο εν λόγω γονίδιο σε 14 οικογένειες παγκοσμίως από τις οποίες οι έντεκα είναι Ελληνικής καταγωγής. Από τις οικογένειες αυτές οι οκτώ έχουν ανιχνευθεί στο εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος. Το αξιοσημείωτο είναι ότι οι δύο από τις έντεκα οικογένειες είναι οικογένειες Ελλήνων ομογενών στην Αυστραλία, οι μεταλλάξεις των οποίων έχουν ανιχνευθεί στο εργαστήριο του Dr Alexander Dobrovic στο Peter MacCallum Cancer Centre στην Αυστραλία. Το γεγονός αυτό έχει θέσει υποψίες ότι η G1738R είναι μια ιδρυτική μετάλλαξη (founder mutation) στον Ελληνικό πληθυσμό.

Το εργαστήριό μας ανέλαβε τον συντονισμό της διερεύνησης της συχνότητας και της φύσης της μετάλλαξης αυτής (ιδρυτικής ή όχι), με σκοπό τη διευκόλυνση της ανίχνευσης της γενετικής προδιάθεσης για καρκίνο του μαστού/ ωοθηκών στον Ελληνικό πληθυσμό. Δείγματα DNA από τους ασθενείς αυτούς αλλά και από συγγενείς τους ζητήθηκαν από τα εργαστήρια των A Dobrovic στην Αυστραλία και Γ Νασιούλα στο Κέντρο Μοριακής Βιολογίας του Νοσοκομείου Υγεία. Επίσης σχεδιάστηκαν primers για πολλαπλασιασμό με PCR χρωμοσωμικών τμημάτων που περιέχουν τους πολυμορφισμούς (microsatellite markers) D17S855, D17S1323, D17S1322, D17S250, D17S800, D17S579 οι οποίοι περιβάλλουν την G1738R. Η μελέτη των απλότυπων (haplotypes) των ασθενών αυτών και η σύγκρισή τους με απλότυπους μη ασθενών (normal controls) θα οδηγήσει στην κατανόηση της φύσης της μετάλλαξης αυτής.

Πρόσφατες μελέτες ενοχοποιούν μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* ως υπεύθυνες για προδιάθεση στον καρκίνο του προστάτη στους άντρες (Breast Cancer Linkage Consortium 1999). Δύο δείγματα αρρένων ασθενών με καρκίνο του προστάτη βρέθηκαν πρόσφατα να φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA2* στο εργαστήριό μας. Η ερευνητική μας ομάδα συμμετέχει σε μια Πανευρωπαϊκή μελέτη προδιάθεσης στον καρκίνο του προστάτη (The IMPACT Study) με επικεφαλής την Dr R. Eeles. Η έναρξη αυτής της μελέτης ταυτίστηκε με την συνάντηση όλων των επιστημονικών αντιπροσώπων των συμμετεχόντων χωρών στο Λονδίνο στις 3 και 4 Φεβρουαρίου. Στην παραπάνω συνάντηση το εργαστήριό μας ανέλαβε την υποχρέωση να συλλέξει και να απομονώσει δείγ-

ματα DNA από ασθενείς πάσχοντες από καρκίνο του προστάτη Πανελληνίως και να μελετήσει το γονίδιο BRCA2 στους ασθενείς αυτούς.

#### **4.9.4 Για μελέτη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου RET**

Το σύνδρομο Multiple Endocrine Neoplasia type 2 (MEN2) οφείλεται σε μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο RET το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι υπεύθυνες για εμφάνιση καρκίνου του θυρεοειδούς και σε μερικές περιπτώσεις και των επινεφριδίων. Η έγκαιρη ανίχνευση των μεταλλάξεων αυτών σε ασθενείς ή συγγενείς τους οδηγεί σε θυρεοειδεκτομή στους φορείς των μεταλλάξεων και τελικά στην πλήρη αντιμετώπιση του καρκίνου. Οι υγιείς συγγενείς μη-φορείς εμπίπτουν στατιστικά στην πιθανότητα του γενικού πληθυσμού για ανάπτυξη καρκίνου του θυρεοειδούς.

Σε σύνολο 60 οικογενειών ασθενών με μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς αναλύθηκαν τα εξώνια 8, 10, 11, 13, 14, 158 και 16. Τα εξώνια αυτά είναι τα μοναδικά στα οποία, με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, έχουν καταγραφεί μεταλλάξεις που προκαλούν MEN2. Στα εξώνια, αυτά ανιχνεύθηκαν οι παθογόνες μεταλλάξεις V804L, G533C, Y791F.



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της μελέτης αφορούν δύο βασικές κατευθύνσεις. Η πρώτη κατεύθυνση (Ενότητα Α.) αναφέρεται στην ανάπτυξη ευαίσθητων και αξιόπιστων κυτταρογενετικών μεθοδολογιών για την ανίχνευση της γενοτοξικής δράσης πιθανών καρκινογόνων ουσιών με σκοπό τη βιοπαρακολούθηση εργαζομένων που εκτίθενται σε χημικούς μεταλλαξιγόνους παράγοντες (Ενότητα 5Α). Η δεύτερη κατεύθυνση (Ενότητα Β.) αναφέρεται στην κατανόηση της δράσης γενοτοξικών παραγόντων με απώτερο στόχο τη διαλεύκανση των μηχανισμών ανάπτυξης επαγγελματικών καρκίνων. Για τον σκοπό αυτό, γίνεται εμπειρισταωμένη μελέτη συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με τη διαδικασία καρκινογένεσης. Στόχος είναι να αναδειχθεί ο ρόλος των κρίσιμων αυτών γονιδίων στους εμπλεκόμενους μοριακούς μηχανισμούς ώστε να μελετηθεί η συμβολή του γενετικού προφίλ των εργαζομένων και της ενδογενούς ευαισθησίας και προδιάθεσής στην καρκινογένεση στην ανάπτυξη των επαγγελματικών καρκίνων.

### 5.1 Ανάπτυξη και προτυποποίηση μεθόδων βιοπαρακολούθησης έκθεσης εργαζομένων σε γενοτοξικούς και καρκινογόνους παράγοντες

Η συνεχής έκθεση εργαζομένων σε χημικούς γενοτοξικούς παράγοντες αποτελεί ένα από τα βασικότερα αίτια πρόκλησης βλαβών στα χρωμοσώματα των κυττάρων. Οι σοβαρότερες από αυτές τις βλάβες οδηγούν σε καθυστέρηση του κυτταρικού κύκλου ή/και κυτταρικό θάνατο, ενώ άλλες μεταφέρονται σε πολλές επόμενες κυτταρικές διαιρέσεις. Μέχρι σήμερα, για τη μελέτη των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων μετά από έκθεση σε βλαπτικούς γενοτοξικούς παράγοντες, χρησιμοποιούνται κυτταρογενετικές αναλύσεις που βασίζονται στην ανάλυση των χρωμοσωμάτων στη μετάφαση. Ωστόσο, η κλασική μέθοδος ανάλυσης των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων και των ανταλλαγών των αδελφών χρωματίδων (SCEs) στη μετάφαση εμφανίζει 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 SCEs 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 SCEs, και μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις σε μεγαλύτερο βαθμό από τη χημική ουσία που εξετάζουμε, είναι η συγκέντρωση αυτής καθ' αυτής της βρωμοδεοξουριδίνης που χρησιμοποιείται απαραίτητως στη μεθοδολογία για την ανίχνευση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματίδων.

### 5.1.1 Μεθοδολογία για την εκτίμηση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων και ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων (SCEs) στη μετάφαση και στην G2-φάση του κυτταρικού κύκλου

Η νέα μεθοδολογία που αναπτύχθηκε επιτρέπει την ανάλυση του αριθμού τόσο των επαγόμενων χρωμοσωματικών αλλοιώσεων, όσο και των SCEs ανεξάρτητα σε μεταφασικά και σε συμπυκνωμένα χρωμοσώματα της G2 φάσης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε ένα απλό πρωτόκολλο (βλ. Υλικά και Μέθοδοι 4.2.γ και 4.7.γ) για την ανάλυση των SCEs σε λεμφοκύτταρα της G2-φάσης. Η επαγωγή πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης γίνεται με τη χρήση της καλικουλίνης-A, ενός ισχυρού αναστολέα των φωσφατασών τύπου 1 και 2A. Η παρατήρηση των ανταλλαγών των αδελφών χρωματίδων είναι εφικτή στα χρωμοσώματα της G2 φάσης. Με τη νέα μέθοδο ελέγχθηκε και αξιολογήθηκε η γενεοτοξική δράση ευρέως διαδεδομένων χημικών παραγόντων του επαγγελματικού περιβάλλοντος, όπως είναι το τριχλωροαιθυλένιο, η ατραζίνη και η υδροκινόνη και αξιολογήθηκε η γενεοτοξική τους δράση με στόχο την κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους στο κύτταρο.

#### ΤΡΙΧΛΩΡΟΑΙΘΥΛΕΝΙΟ

Το τριχλωροαιθυλένιο 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. Απουσία εποξειδικών σταθεροποιητών είναι μεταλλαξιγόνο 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 καθώς προκαλεί με αυξημένες συχνότητες όγκους του ήπατος και του πνεύμονα. Σε αρουραίους το τριχλωροαιθυλένιο προκάλεσε αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης αδενοκαρκινωμάτων 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. Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική ελάττωση του Μιτωτικού Δείκτη μετά από έκθεση των κυττάρων σε διάφορες δόσεις τριχλωροαιθυλενίου, ενώ σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες ή ίσες των 10 mM και 1mM αντίστοιχα αποδείχθηκε κυτταροτοξικό. Στη μετάφαση όσο και στη φάση του κυτταρικού κύκλου απουσία και παρουσία μεταβολικής ενεργοποίησης δεν παρατηρήθηκαν χρωμοσωματικές αλλοιώσεις, ούτε όμως και στατιστικώς σημαντική αύξηση των ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων συγκριτικά με τα δείγματα μάρτυρες. Ωστόσο, με την εφαρμογή της μεθόδου της πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης (PCC) παρατηρήθηκε και στους 6 δότες που μελετήθηκαν μία μικρή αύξηση των αλλοιώσεων (χρωματιδικού τύπου) στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου (παρουσία καλικουλίνης) η οποία όμως χαρακτηρίστηκε ως στατιστικώς μη-σημαντική.

#### ΑΤΡΑΖΙΝΗ

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 γενεοτοξικότητα της συγκεκριμένης ουσίας. Καθώς υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι η ατραζίνη προκαλεί βλάβες στο DNA, η εκτίμηση της μεταλλαξιγόνου δράσης της ατραζίνης έχει γίνει τόσο σε *in vitro*, όσο και σε *in vivo* μελέτες με το σύστημα των SCEs, ενός ευαίσθητου δείκτη της επιδιορθωτικής ικανότη-



τας του κυττάρου με ομόλογο ανασυνδυασμό. Με την κλασική μεθοδολογία, η εκτίμηση της συχνότητας των ανταλλαγών των αδελφών χρωματίδων δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σε υψηλές δόσεις της ουσίας γιατί τα κύτταρα σταματούν στην G2 φάση και δεν προχωρούν στη μετάφαση. Η δυσκολία της εκτίμησης της δράσης της ατραζίνης σε υψηλές συγκεντρώσεις ξεπεράστηκε με τη χρήση της προτεινόμενης κυτταρογενετικής μεθόδου, που προτυποποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης για την ανάλυση των SCEs στην G2 φάση, κατά την καλλιέργεια ανθρώπινων λεμφοκυττάρων *in vitro*. Τα ερευνητικά αποτελέσματα για την επίδραση της ατραζίνης σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος υγιών δοτών δημοσιεύθηκαν στο Επιστημονικό Περιοδικό Cytogenetic Genome Research υπό μορφή εργασίας με τίτλο “SCEs analysis in G2 lymphocyte prematurely condensed chromosomes after exposure to atrazine: the non-dose-dependent increase in homologous recombinational events does not support its genotoxic mode of action”. (Βλ. Παρ. 8, Δημοσιεύσεις σε Επιστημονικά Περιοδικά).

### 5.1.2 Μεθοδολογία για την εκτίμηση της συνδυασμένης δράσης επιβλαβών χημικών παραγόντων με ιοντίζουσα ακτινοβολία

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον γύρω από τη συνεπίδραση χημικών παραγόντων του επαγγελματικού περιβάλλοντος με άλλους γενετοξικούς και καρκινογόνους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως είναι η ιοντίζουσα ακτινοβολία συνεχώς αυξάνει. Δεδομένου ότι η ιοντίζουσα ακτινοβολία αποτελεί έναν ισχυρό κίνδυνο τόσο για πρόκληση γενετικών βλαβών, όσο και για δημιουργία καρκινογένεσης, η εφαρμογή μίας μεθοδολογίας για την ανίχνευση της συνεπίδρασης της ιοντίζουσας ακτινοβολίας με άλλους βλαπτικούς παράγοντες μπορεί να αποκαλύψει νέα στοιχεία για την επικινδυνότητα μίας ουσίας. Για τον λόγο αυτό, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στη μελέτη χημικών ουσιών που εμπριέχονται στη σύσταση των εμφανιστικών υγρών ακτινογραφιών, όπως είναι η υδροκινόνη και η γλουταραλδεΐδη. Για τη μελέτη της συνεργιστικής δράσης χημικών παραγόντων με ιοντίζουσα ακτινοβολία, αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε μία νέα μεθοδολογία βιολογικής παρακολούθησης που περιλαμβάνει συνδυασμό της μεθοδολογίας G2-ακτινοευαισθησίας (G2-assay) και της πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης (PCC). Με τον συνδυασμό των δύο αυτών μεθοδολογιών, γίνεται εφικτή η μελέτη της συνδυασμένης δράσης χημικών παραγόντων με ιοντίζουσα ακτινοβολία και ο συσχετισμός αυτής με την ακτινοευαισθησία του υπό-μελέτη εκτιθέμενου εργαζόμενου. Πιο συγκεκριμένα, με τη μεθοδολογία της G2-ακτινοευαισθησίας (G2-assay), καθίσταται εφικτός ο καθορισμός των επιπέδων ακτινοευαισθησίας του υπό μελέτη εκτιθέμενου ατόμου και βασίζεται στην ακτινοβόληση λεμφοκυττάρων στην G2-φάση του κυτταρικού τους κύκλου (βλ. Υλικά και Μέθοδοι 4.5). Στην παρούσα μελέτη, υγιείς δότες εκτέθηκαν σε χημικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται ευρέως σε επαγγελματικά περιβάλλοντα στα οποία γίνεται χρήση ιοντίζουσας ακτινοβολία. Οι ουσίες αυτές είναι η υδροκινόνη και η γλουταραλδεΐδη.

#### ΥΔΡΟΚΙΝΟΝΗ (HQ)

Η υδροκινόνη είναι μια καρκινογόνος ουσία που εντοπίζεται στη φύση στο πετρέλαιο, τη βενζίνη και τον καπνό του τσιγάρου και είναι γνωστό ότι προκαλεί μυελοτοξικότητα και λευχαιμία στον άνθρωπο. Εντούτοις δεν έχει ακόμα διευκρινισθεί ο μηχανισμός της καρκινογόνου δράσης της. Κλινικές παρατηρήσεις μετά από μελέτες καρκινογένεσης σε πειραματόζωα έχουν αποδείξει, πέρα από κάθε αμφιβολία, την αιτιολογική σχέση μεταξύ του βενζολίου και της λευχαιμίας.

Οι κυτταρογενετικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν βασίστηκαν τόσο στη συμβατική μεθοδολογία ανάλυσης των χρωμοσωμάτων στη μετάφαση, όσο και στη μελέτη των χρωμοσωμάτων στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου μέσω πρόκλησης πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης (PCC, prematurely condensed chromosomes) παρουσία της ουσίας καλικουλίνη. Η τεχνική ανάλυσης των PCCs συνδυάστηκε με έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία (1Gy, ακτινοβολία-γ) προκειμένου να διευκρινιστεί η πιθανή συνεργιστική δράση της με την HQ. Επιπλέον, μελετήθηκε ο πιθανός ρόλος της υδροκινόνης στην ευαισθητοποίηση λεμφοκυττάρων μετά από ραδιοβλάβη. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αξιολογήθηκαν με γνώμονα την επίδραση της ουσίας στον μιτωτικό δείκτη, τον δείκτη διπλασιασμού, τις επαγόμενες χρωμοσωματικές αλλοιώσεις και τον αριθμό των SCEs τόσο στη μετάφαση όσο και στην G2-φάση του κυτταρικού κύκλου, μετά από συνεπίδραση ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η υδροκινόνη προκαλεί ελάττωση του μιτωτικού δείκτη (M.I.) με την αύξηση της συγκέντρωσης της ουσίας στην καλλιέργεια. Χαρακτηρίστηκε κυτταροτοξική σε καλλιέργειες ολικού αίματος σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 0,5 mM. Σε περιπτώσεις συνεπίδρασης της υδροκινόνης με ιοντίζουσα ακτινοβολία (1-3 Gy), 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 τόσο στη μετάφαση, όσο και στην G2-φάση του κυτταρικού κύκλου. Συνεπίδραση υδροκινόνης με ιοντίζουσα ακτινοβολία (1 Gy) αυξάνει ακόμη περισσότερο τον αριθμό των χρωματιδικού τύπου αλλοιώσεων αλλά και των SCEs. Η υδροκινόνη προκαλεί ελάττωση της τιμής του R.I., γεγονός που φανερώνει την επίδρασή της στον κυτταρικό κύκλο. Σε συγκεντρώσεις υδροκινόνης μεγαλύτερες ή ίσες των 30μM, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση ( $p < 0,05$ ) του χρωματιδικού τύπου αλλοιώσεων ενώ δεν καταγράφηκαν χρωμοσωματικού τύπου αλλοιώσεις (βλ. δικεντρικά). Μετά από συνεπίδραση μη-γενετοξικής δόσης υδροκινόνης με ιοντίζουσα ακτινοβολία (1 Gy) στην G2-φάση του κυτταρικού κύκλου παρατηρήθηκε πολλαπλασιαστική δράση και αύξηση του αριθμού των αλλοιώσεων (χρωματιδικού αλλά και χρωμοσωματικού τύπου) γεγονός που όπως αποδείχθηκε με τη χρήση της μεθοδολογίας PCC οφείλεται στην επίδραση της υδροκινόνης στον κυτταρικό κύκλο. Αποτελέσματα των πειραμάτων που αφορούν τη χημική ουσία υδροκινόνη παρουσιάστηκαν σε 3 επιστημονικά συνέδρια (βλ. Παρ. 8). Επιπλέον, τα αποτελέσματα των μελετών που αφορούν την υδροκινόνη και τη συνδυασμένη δράση αυτής με ιοντίζουσα ακτινοβολία, θα δημοσιευθούν υπό μορφή ερευνητικής εργασίας με τίτλο “The benzene metabolite hydroquinone enhances G2-chromosomal radiosensitivity by affecting the G2-M-checkpoint in irradiated lymphocytes” στο Επιστημονικό Περιοδικό International Journal of Oncology (βλ. Παρ. 8, Δημοσιεύσεις σε Επιστημονικά Περιοδικά).

### ΓΛΟΥΤΑΡΑΛΔΕΪΔΗ

Η γλουταραλδεΐδη, όπως και η υδροκινόνη, είναι μία χημική ουσία που απαντάται στη σύσταση των εμφανιστικών υγρών στα ακτινολογικά εργαστήρια. Για τον λόγο αυτό, η δράση της γλουταραλδεΐδης, μελετήθηκε με τη νέα προτεινόμενη μεθοδολογία συνδυασμού του test G2-assay μετά από έκθεση των κυτταροκαλλιιεργειών σε ένα εύρος δόσεων της υπό μελέτης ουσίας. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν πως η γλουταραλδεΐδη προκαλεί μικρή ελάττωση του M.I. με την αύξηση της συγκέντρωσης της ουσίας στην καλλιέργεια. Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες ή ίσες των  $10^{-4}$ M, η γλουταραλδεΐδη εμφανίζει κυτταροτοξικότητα. Σε πειράματα συνεπίδρασης γλουταραλδεΐδης και υδροκινόνης παρατηρήθηκε συνεργιστική (αθροιστική) δράση τόσο σε επίπεδο χρωμοσωματικών αλλοιώσεων, όσο και σε επίπεδο SCEs. Σε ορισμένους δότες, αλλά όχι σε άλλους, παρατηρήθηκε πολλα-

πλασιαστική δράση μετά από επίδραση της γλουταραλδεϋδης σε συνδυασμό με ιοντίζουσα ακτινοβολία (1 Gy). Με βάση τα αποτελέσματα πιθανολογείται πως το φαινόμενο αυτό σχετίζεται με την ακτινοευαισθησία του κάθε δότη. Η γλουταραλδεϋδη, απουσία μεταβολικής ενεργοποίησης στις καλλιέργειες, δε φαίνεται να προκαλεί αλλοιώσεις στη φάση της μετάφρασης ως προς τα δείγματα μάρτυρες. Η γλουταραλδεϋδη φαίνεται να παρουσιάζει αθροιστική δράση μετά από συνεπίδραση με υδροκινόνη και πολλαπλασιαστική δράση μετά συνεπίδραση με ιοντίζουσα ακτινοβολία.

## 5.2 Μηχανισμοί ανάπτυξης επαγγελματικών καρκίνων

Εκτός από την έκθεση των εργαζομένων σε επιβλαβείς γενετοξικούς παράγοντες, σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη επαγγελματικών καρκίνων φαίνεται να διαδραματίζει η αλληλεπίδραση των γενετοξικών παραγόντων, στους οποίους εκτίθεται ο εργαζόμενος, με το γενετικό του προφίλ. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη διαπίστωση ότι τα γενετικά χαρακτηριστικά συγκαθορίζουν, σε συνδυασμό με την επίδραση του εξωτερικού περιβάλλοντος, την επιδεκτικότητα ενός ατόμου σε επιβλαβείς χημικές ουσίες. Δεδομένου ότι ο αριθμός των γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με την καρκινογένεση είναι πολύ μεγάλος, στην παρούσα μελέτη το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στην ταυτοποίηση κρίσιμων γονιδιωματικών περιοχών που σχετίζονται με διάφορους τύπους καρκίνου όπως αυτούς του μαστού και των ωοθηκών (γονίδια *BRCA1*, *BRCA2*), του θυρεοειδούς και των επινεφριδίων (γονίδιο *RET*) καθώς και με άλλα γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση, όπως τα γονίδια μηχανισμού βιομεταμόρφωσης επιβλαβών χημικών παραγόντων (γονίδιο *GSTT1*). Δεδομένου ότι γενετικοί πολυμορφισμοί στα γονίδια αυτά φαίνεται να σχετίζονται με επαγγελματικούς καρκίνους, η ταυτοποίηση των γονιδιωματικών περιοχών καθίσταται αναγκαία και μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο ως ένα ισχυρό μέτρο πρόληψης των εργαζομένων στη δημιουργία ανάπτυξης επαγγελματικών καρκίνων.

### 5.2.1 Προδιάθεση στην καρκινογένεση και συσχετισμός με το γενετικό υπόβαθρο: ταυτοποίηση κρίσιμων γονιδίων που σχετίζονται με την καρκινογένεση ως μέτρο πρόληψης επαγγελματικών καρκίνων

#### 5.2.1.1 Γονίδια σχετιζόμενα με καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών *BRCA1* / *BRCA2*

Πρόσφατες μελέτες ενοχοποιούν μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* ως υπεύθυνες για προδιάθεση στον καρκίνο όχι μόνο του μαστού και των ωοθηκών στις γυναίκες, αλλά και του προστάτη στους άντρες (Breast Cancer Linkage Consortium 1999). Στην παρούσα μελέτη, με τη χρήση της μεθοδολογίας multiplex-PCR ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν μία πληθώρα πολυμορφισμών και μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1* / *BRCA2* ασθενών με καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών (Πίνακας 1). Επιπλέον, καταγράφηκαν οι παθογόνες μεταλλάξεις που ταυτοποιήθηκαν στα γονίδια αυτά (Πίνακας 2) καθώς και και μη-κατηγοριοποιημένα μεταλλάγματα που ταυτοποιήθηκαν στα γονίδια *BRCA1* & *BRCA2* (Πίνακας 3). Όσον αφορά το γονίδιο *BRCA1*, η σημειακή μετάλλαξη G1738R έχει ανιχνευθεί στο εν λόγω γονίδιο σε 14 οικογένειες παγκοσμίως από τις οποίες οι έντεκα είναι Ελληνικής καταγωγής. Από τις οικογένειες αυτές οι οκτώ έχουν ανιχνευθεί στο ερ-

γαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος. Η ταυτοποίηση των γονιδιωματικών αυτών περιοχών, σε συνδυασμό με άλλες μοριακές μεθόδους δύναται να συμβάλλουν στην πρόληψη και πρόγνωση διαφόρων μορφών καρκίνου του επαγγελματικού περιβάλλοντος.

### Πίνακας 1

**Φαινότυποι και μεταλλάξεις που ταυτοποιήθηκαν σε ασθενείς με καρκίνο μαστού / ωοθηκών στα γονίδια BRCA1 / BRCA2**

	Patient no.	Total no. of BrCa cases (age of onset)	No. of OvCa cases (age of onset)	Gene/exon	Mutation	Effect	Comments/other cancers
Families with >3 cases	285, 286	4 (25, 46, 52, 65)		<i>BRCA1</i> /exon20	G1738R	1738Gly>Arg	One case of prostate cancer, two cases of gastric cancer
	280		4 (45, 53, 60, 80)	<i>BRCA1</i> /exon20	5382insC	ter 1829	
Families with 3 cases	125	3 (42, 45, 50)		<i>BRCA1</i> /exon20	G1738R	1738Gly>Arg	
	193	3 (35, 62, xx)		<i>BRCA1</i> /exon20	G1738R	1738Gly>Arg	
	287	2 (46, >65)	1 (32)	<i>BRCA1</i> /exon20	G1738R	1738Gly>Arg	
Families with 2 cases	89	1 (xx)	1 (40)	<i>BRCA1</i> /exon20	G1738R	1738Gly>Arg	One case of stomach cancer
	151	1 (<40)	1 (<50)	<i>BRCA1</i> /exon20	G1738R	1738Gly>Arg	
	276	1 (27)	1 (55)	<i>BRCA1</i> /exon20	G1738R	1738Gly>Arg	
	344, 345	1 (37)	1 (50)	<i>BRCA1</i> /exon20	5382insC	ter 1829	proband's father of Russian descent
	244	1 (36)	1 (63)	<i>BRCA2</i> /exon11	5950delCT	ter 1480	
	347, 348	2 (49, xx)		<i>BRCA2</i> /exon13	7235G>A	Splice site	
No family history	230	1 (40)		<i>BRCA1</i> /exon11	R1203X	ter 1203	patient was adopted
	211	1 (48)	1 (48)	<i>BRCA1</i> /exon11	3896delT	ter 1263	Br & OvCa in the same patient, one case of lung cancer, patient's mother of Russian descent
	272	1 (40)	1 (52)	<i>BRCA1</i> /exon20	Δexon20	Δexon20	Br & OvCa in the same patient
	294	1 (72)	1 (68)	<i>BRCA1</i> /exon20	G1738R	1738Gly>Arg	Br & OvCa in the same patient
	290	1 (66)	1 (61)	<i>BRCA1</i> /exon20	R1751X	ter 1751	Br & OvCa in the same patient

							the same patient
	296	1 (48)	1 (56)	<i>BRCA1</i> /exon20	5382insC	ter 1829	Br & OvCa in the same patient
	332	1 (28)	1 (31)	<i>BRCA1</i> /exon24	Δexon24	Δexon24	Br & OvCa in the same patient, Hodgkin, gastric (possibly colon), endometrial, bladder cancers
	335	1 (xx)		<i>BRCA2</i> /exon2	G4X	ter 4	
	349	1 (33)		<i>BRCA2</i> /exon11	codon1185 del10	ter 1205	
	135	1 (28)		<i>BRCA2</i> /exon11	4637delTA	ter 1480	

**Πίνακας 2**  
**Παθογόνες μεταλλάξεις που ταυτοποιήθηκαν στα γονίδια *BRCA1* / *BRCA2***

Gene/exon	Nucleotide	Codon	Base change	AA change	Designation	Mutation type	Mutation effect	Times in BIC	Times observed in Greek families
<i>BRCA1</i> /exon11	1623	502	del TTTAAA	ter 505	1623del5	F	F	25	1
<i>BRCA1</i> /exon11	3099	994	delT	ter 999	3099delT	F	F	1	1
<i>BRCA1</i> /exon11	3277	1053	insG	ter 1059	3277insG	F	F	1	1
<i>BRCA1</i> /exon11	3726	1203	C to T	ter 1203	R1203X	N	N	21	1
<i>BRCA1</i> /exon11	3741	1208	insA	ter 1218	3741insA	F	F	2	1
<i>BRCA1</i> /exon11	3896	1259	delT	ter 1263	3896delT	F	F	3	1
<i>BRCA1</i> /exon20	-	-	-	Δexon20	Δexon20	R	R	-	1
<i>BRCA1</i> /exon20	5331	1738	G to A	Gly to Arg	G1738R	M	UV	10	8
<i>BRCA1</i> /exon20	5370	1751	C to T	ter 1751	R1751X	N	N	23	3
<i>BRCA1</i> /exon20	5382	1756	insC	ter 1829	5382insC	F	F	838	12

<i>BRCA1</i> /exo n23	5586	1823	G to A	Δexon23- 24	<b>5586G</b> > <b>A</b>	S	S	3	2
<i>BRCA1</i> /exo n24	-	-	-	Δexon24	Δexon24	R	R	-	1
<i>BRCA2</i> /exo n2	238-240	4	gga	ter 4	G4X	N	N	-	1
<i>BRCA2</i> /exo n10	2024	599	del5	Stop 599	2024del5	F	F	10	2
<i>BRCA2</i> /exo n11	3034	936	del4 (AAAC)	Stop 958	<b>3034del4</b>	F	F	20	1
<i>BRCA2</i> /exo n11	3058	944	delA	Stop 959	<b>3058delA</b>	F	F	-	1
<i>BRCA2</i> /exo n11	xxx	1185	del10	ter 1205	cod1185de l10	F	F	-	1
<i>BRCA2</i> /exo n11	4147	1307	delG	Stop 1334	4147delG	F	F	1	2
<i>BRCA2</i> /exo n11	4637	1470	delTA	ter 1480	4637delT A	F	F	1	1
<i>BRCA2</i> /exo n11	5950	1908	delCT	ter 1909	5950delC T	F	F	40	1
<i>BRCA2</i> /exo n11	6024	1932	delTA	ter 1943	6024delT A	F	F	4	1
<i>BRCA2</i> /exo n11	6631	2135	del5 (AACTT)	ter 2137	6631del5	F	F	12	1
<i>BRCA2</i> /exo n13	7235	2336	G to A	Δexon13	7235G>A	S	S	16	1

### Πίνακας 3

*Πολυμορφισμοί και μη-κατηγοριοποιημένα μεταλλάγματα που ταυτοποιήθηκαν στα γονίδια BRCA1 & BRCA2*

Gene/exon	Nucleotide	Codon	Base change	AA change	Designation	Mutation type	Mutation effect	Times in BIC
<i>BRCA1</i> /5' UTR	1802 <sup>a</sup>	5' UTR	C to G		1802C>G <sup>b</sup>	P	P	-
<i>BRCA1</i> /5	IVS4	-	C to A		IVS4-19C>A <sup>b</sup>	IVS	UV	-
<i>BRCA1</i> /6	IVS6	-	G to A		IVS6+7G>A	S	UV	7
<i>BRCA1</i> /6	IVS6	-	AC to CA		IVS6+26AC>	IVS	UV	-

					CA			
<i>BRCA1/8</i>	IVS7	-	C to T		IVS7-34 C>T <sup>b</sup>	P	P	6
<i>BRCA1/8</i>	IVS8	-	A to T		IVS8+140A>T	P	P	-
<i>BRCA1/9</i>	IVS8	-	delT		IVS8-57delT <sup>b</sup>	P	P	10
<i>BRCA1/9</i>	686	189	T to C	Asp to Asp	D189D <sup>b</sup>	P	P	-
<i>BRCA1/9</i>	710	197	C to T	Cys to Cys	C197C <sup>b</sup>	P	P	28
<i>BRCA1/9</i>	IVS8	-	A to T		IVS9+146A>T	P	P	-
<i>BRCA1/11</i>	1186	356	A to G	Gln to Arg	Q356R <sup>b</sup>	M	P	29
<i>BRCA1/11</i>	xxxx	524	xxxx	Ala to Val	A524V	UV	UV	-
<i>BRCA1/11</i>	2196	693	G to A	Asp to Asn	D693N <sup>b</sup>	P	P	6
<i>BRCA1/11</i>	2201	694	C to T	Ser to Ser	S694S <sup>b</sup>	P	P	11
<i>BRCA1/11</i>	2430	771	T to C	Leu to Leu	L771L <sup>b</sup>	P	P	22
<i>BRCA1/11</i>	2731	871	C to T	Pro to Leu	P871L <sup>b</sup>	M	P	20
<i>BRCA1/11</i>	3232	1038	C to T	Glu to Gly	E1038G <sup>b</sup>	M	P	10
<i>BRCA1/11</i>	3238	1040	G to A	Ser to Asn	S1040N	M	UV	25
<i>BRCA1/11</i>	3537	1140	A to G	Ser to Gly	S1140G	M	UV	27
<i>BRCA1/11</i>	3667	1183	A to G	Lys to Arg	K1183R <sup>b</sup>	M	P	30
<i>BRCA1/11</i>	3878	1253	T to G	Ser to Ser	S1253S <sup>b</sup>	P	P	-
<i>BRCA1/13</i>	4427	1436	T to C	Ser to Ser	S1436S <sup>b</sup>	P	P	25
<i>BRCA1/14</i>	IVS13	-	C to T		IVS13-10C>T	UV	UV	18
<i>BRCA1/16</i>	4956	1613	A to G	Ser to Gly	S1613G <sup>b</sup>	M	P	32
<i>BRCA1/16</i>	4962	1615	G to A	Ala to Thr	A1615T <sup>b</sup>	M	UV	-
<i>BRCA1/16</i>	5012	1631	T to C	Ser to Ser	S1631S <sup>b</sup>	P	P	-
<i>BRCA1/16</i>	5075	1652	G to A	Met to Ile	M1652I <sup>b</sup>	M	UV	20
<i>BRCA1/17</i>	IVS17	-	G to A		IVS16-68G>A <sup>b</sup>	P	P	3
<i>BRCA1/17</i>	IVS17	-	G to A		IVS16-92G>A <sup>b</sup>	P	P	3
<i>BRCA1/18</i>	IVS17	-	C to T		IVS17-53C>T <sup>b</sup>	UV	UV	-
<i>BRCA1/18</i>	IVS18		G to A		IVS18+65G>A <sup>b</sup>	P	P	1
<i>BRCA1/20</i>	5375	1752	A to C	Ala to Ala	A1752A <sup>b</sup>	P	P	-
<i>BRCA1/20</i>	IVS20	-	ins12		IVS20+48ins12	UV	UV	27
<i>BRCA1/21</i>	IVS21	-	G to A		IVS21+78G>A	UV	UV	1

<i>BRCA1/23</i>	5553	1812	C to G	Pro to Ala	P1812A	M	UV	-
<i>BRCA1/24</i>	5616	1833	G to A	Val to Met	V1833M <sup>b</sup>	M	UV	1
<i>BRCA1/24</i>	5685	1856	C to T	Pro to Ser	P1856S <sup>b</sup>	UV	UV	-
<i>BRCA2/5'</i> UTR	203	5' UTR	G to A		203G>A <sup>b</sup>	P	P	10
<i>BRCA2/2</i>	282	18	C to T	Arg to Arg	R18R <sup>b</sup>	P	P	-
<i>BRCA2/3</i>	426	66	A to G	Gln to Gln	Q66Q	P	P	-
<i>BRCA2/4</i>	IVS4	-	A to C		IVS4+67A>C	UV	UV	-
<i>BRCA2/5</i>	IVS5	-	T to C		IVS5+26T>C <sup>b</sup>	UV	UV	-
<i>BRCA2/8</i>	IVS8	-	C to T		IVS8+56C>T <sup>b</sup>	UV	UV	3
<i>BRCA2/9</i>	xxxx	245	xxxx	Arg to Lys	R245K	M	UV	-
<i>BRCA2/10</i>	1093	289	A to C	Asn to His	N289H <sup>b</sup>	M	P	7
<i>BRCA2/10</i>	1342	372	C to A	His to Asn	N372H <sup>b</sup>	M	P	6
<i>BRCA2/10</i>	1593	455	A to G	Ser to Ser	S455S	P	P	7
<i>BRCA2/10</i>	IVS10	-	delT		IVS10+12del T <sup>b</sup>	P	P	2
<i>BRCA2/11</i>	IVS11	-	C to T		IVS10-73C>T	P	P	-
<i>BRCA2/11</i>	2457	743	T to C	His to His	H743H	P	P	2
<i>BRCA2/11</i>	3147	973	G to A	Ser to Ser	S973S	P	P	1
<i>BRCA2/11</i>	xxxx	988	T to C	Asp to Asp	D988D	P	P	-
<i>BRCA2/11</i>	3199	991	A to G	Asn to Asp	N991D <sup>b</sup>	M	UV	2
<i>BRCA2/11</i>	3624	1132	A to G	Lys to Lys	K1132K	P	P	8
<i>BRCA2/11</i>	3744	1172	G to A	Ser to Ser	S1172S	P	P	2
<i>BRCA2/11</i>	xxxx	1205	xxxx	Ser to Ser	S1205S	P	P	-
<i>BRCA2/11</i>	4035	1269	T to C	Val to Val	V1269V <sup>b</sup>	P	P	3
<i>BRCA2/14</i>	7470	2414	A to G	Ser to Ser	S2414S	P	P	10
<i>BRCA2/15</i>	7821	2531	xxxx	Val to Val	V2531V	P	P	-
<i>BRCA2/15</i>	xxxx	2536	xxxx	Pro to Pro	P2536P	P	P	-
<i>BRCA2/17</i>	IVS16	-	T to C		IVS16-14T>C			11
<i>BRCA2/18</i>	IVS17	-	T to C		IVS17- 12T>C <sup>b</sup>	P	P	1
<i>BRCA2/22</i>	9079	2951	G to A	Ala to Thr	A2951T	P	P	39
<i>BRCA2/25</i>	9533	3102	C to G	Ala to Gly	A3102G	xx	xx	-
<i>BRCA2/27?</i> ?	IVS??		A to C		IVS27 107A>C	xx	xx	-

a Polymorphism within the beta-promoter sequence of BRCA1 (accession number U37574).

b Previously published mutations by us are also included in order to give a complete figure of the observed mutations in Greek population for future use as markers.



Μέρος των αποτελεσμάτων αυτών δημοσιεύθηκαν στα περιοδικά Cancer Research, European Journal of Cancer, International Journal of Cancer, ενώ έχει ολοκληρωθεί η συγγραφή του άρθρου σχετικά με τη μετάλλαξη G1738R του γονιδίου BRCA1. Δύο επιπλέον άρθρα βρίσκονται υπό προετοιμασία σχετικά με τη μετάλλαξη 5382insC και τη στατιστική μελέτη όλων των παραπάνω μεταλλάξεων. Τα παραπάνω αποτελέσματα έχουν παρουσιαστεί σε μία σειρά συνεδρίων (Βλ. Παρ. 7, Παρουσιάσεις σε Επιστημονικά Συνέδρια).

### 5.2.1.2 Γονίδια σχετιζόμενα με καρκίνο του θυρεοειδούς (γονίδιο RET)

Το σύνδρομο Multiple Endocrine Neoplasia type 2 (MEN2) οφείλεται σε μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο RET το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι υπεύθυνες για εμφάνιση καρκίνου του θυρεοειδούς και σε ορισμένες περιπτώσεις και καρκίνου των επινεφριδίων. Στην παρούσα μελέτη σε σύνολο 60 οικογενειών ασθενών με μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς αναλύθηκαν τα εξώνια 8, 10, 11, 13, 14, 15 και 16. Τα εξώνια αυτά είναι τα μοναδικά στα οποία, με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, έχουν καταγραφεί μεταλλάξεις που προκαλούν MEN2. Στα εξώνια αυτά ανιχνεύθηκαν οι παθογόνες μεταλλάξεις V804L, G533C(1597G>T), Y791F και άλλες σε διάφορες οικογένειες. Αξίζει ιδιαίτερα να σημειωθεί ότι η μετάλλαξη G533C ταυτοποιήθηκε σε 8 μη σχετιζόμενες οικογένειες με ιστορικό καρκίνου του θυρεοειδούς. Επομένως πρόκειται για μία παθογόνο μετάλλαξη ιδιαίτερος συχνή στον ελληνικό πληθυσμό και έχει αναφερθεί παγκοσμίως μόνο μια φορά (Da Silva AM et al, 2003). Για να μελετηθεί περαιτέρω η 1597G>T συλλέχθηκαν δείγματα 56 συγγενών των οικογενειών αυτών. Χρησιμοποιώντας την τεχνική του DNA sequencing οι απλότυποι των ασθενών αυτών μελετήθηκαν και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλοι οι ασθενείς που φέρουν την 1597G>T έχουν τον ίδιο απλότυπο επαληθεύοντας την αρχική υπόθεση. Η έγκαιρη ανίχνευση των μεταλλάξεων αυτών σε ασθενείς ή συγγενείς τους οδηγεί σε θυρεοειδεκτομή στους φορείς των μεταλλάξεων και τελικά στην πλήρη αντιμετώπιση του καρκίνου. Οι υγιείς συγγενείς μη-φορείς εμπίπτουν στατιστικά στην πιθανότητα του γενικού πληθυσμού για ανάπτυξη καρκίνου του θυρεοειδούς.

Τα παραπάνω αποτελέσματα σχετικά με τη μετάλλαξη G533C έχουν δημοσιευθεί στο περιοδικό Clinical Endocrinology – Oxford. Μία δημοσίευση σχετικά με τη V804L έχει υποβληθεί στο European Journal of Endocrinology και μία τρίτη είναι υπό συγγραφή (βλέπε υποσημειώσεις τέλος κειμένου).

### 5.2.2 Προδιάθεση στην καρκινογένεση και ρόλος γονιδίων μηχανισμού βιομεταμόρφωσης (αποτοξικοποίησης) χημικών παραγόντων

Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται σε γονίδια τα προϊόντα των οποίων σχετίζονται με τους μηχανισμούς βιομεταμόρφωσης ξеноβιοτικών ουσιών και με τη συσχέτιση γενετικών πολυμορφισμών (και ελλείψεων) γονιδίων που συμμετέχουν στους μηχανισμούς αποτοξικοποίησης ουσιών, με την ενδογενή ευαισθησία σε τοξικές ουσίες. Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs), αποτελούν ένα τέτοιο παράδειγμα (Their et al. 2003). Ένα από τα μέλη της οικογένειας των τρανσφερασών της γλουταθειόνης, το γονίδιο GSTT1 εμφανίζει γενετικό πολυμορφισμό μεταξύ των ατόμων. Συγκεκριμένα, το ομόζυγο έλλειμμα (αρνητικός γονότυπος, null) των γονιδίων GSTT1 κυ-

μαίνεται από 10%-30% ανάλογα με την εθνότητα και σχετίζεται με ελλιπή ικανότητα αποτοξικοποίησης διαφόρων γενετοξικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (π.χ. βενζο[α]πυρένιο) (Norppa et al. 1995, Strange 1998, Bernardini et al. 2002). Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες επικεντρώνονται στη συσχέτιση του πολυμορφισμού στο γονίδιο GSTT1 με την αγγειογένεση και διάφορες μορφές καρκίνου (π.χ. καρκίνου του μαστού και πνεύμονα) (Medeiros et al. 2004, Sobti et al. 2004). Για τον λόγο αυτό, εξετάστηκε εάν η ενδογενής ευαισθησία σε επίπεδο χρωμοσωματικών αλλοιώσεων και ανταλλαγών αδελφών χρωματίδων (SCEs, Sister Chromatid Exchanges) συσχετίζεται με τον πολυμορφισμό στο γονίδιο GSTT1. Συγκεκριμένα έγινε σύγκριση του αριθμού των επαγόμενων αλλοιώσεων και των SCEs μεταξύ δοτών που φέρουν το γονίδιο GSTT1 (GSTT1+) με δότες που εμφανίζουν αρνητικό γονότυπο (GSTT1 null genotype, GSTT1). Οι γενετικοί πολυμορφισμοί προσδιορίστηκαν μετά από απομόνωση γενετικού υλικού από περιφερικό αίμα και την εφαρμογή της μεθοδολογίας PCR (multiplex PCR). Επιπλέον, διερευνήθηκε εάν ο πολυμορφισμός στο γονίδιο GSTT1 επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό ανταλλαγής αδελφών χρωματίδων μετά από έκθεση σε γενετοξικό παράγοντα της οικογένειας των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, όπως το βενζο[α]πυρένιο (Bernardini et al. 2002, Medeiros et al. 2004, Nelson et al. 1995, Norppa et al. 1995, Sobti et al. 2004, Tsutsida & Sato 1992).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν πως με τη χρήση της μεθοδολογίας PCR βρέθηκαν 34 δότες οι οποίοι φέρουν το γονίδιο GSTT1 και 6 οι οποίοι εμφανίζουν αρνητικό γονότυπο ως προς το GSTT1. Τα αποτελέσματα, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**. 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. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων μεταξύ δοτών GSTT1+ και GSTT1- σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος που είχαν υποστεί έκθεση σε βενζο[α]πυρένιο 0.01mM. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι δε παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στον αριθμό των χρωμοσωματικών αλλοιώσεων/κύτταρο μεταξύ των αρνητικών και των θετικών ως προς το γονίδιο GSTT1 δοτών. 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 με τη μέθοδο της πρόωρης χρωμοσωματικής συμπύκνωσης (PCC) παρουσία καλικουλίνης. Μέρος των αποτελεσμάτων αυτής της μελέτης παρουσιάστηκε σε Ευρωπαϊκό Επιστημονικό Συνέδριο (35th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society – Environment and Human Genetic Disease-Causes, mechanisms and effects), που πραγματοποιήθηκε στην Κω τον Ιούλιο του 2005. (Βλ. Παρ. 7).

**Πίνακας 4**

Από 40 υγιείς δότες που μελετήθηκαν οι 6 παρουσιάζουν αρνητικό φαινότυπο ως προς το GSTT1 γονίδιο. Μετά από σύγκριση της μέσης τιμής του αριθμού των SCEs (μέτρηση 50 κυττάρων σε κάθε δότη) δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δοτών με αρνητικό και θετικό φαινότυπο ως προς το γονίδιο GSTT1.

Donor	GSTT1 genotype	Mean Value of SCEs/Cell $\pm$ SD
1	+	7,40 $\pm$ 0,7
2	-	8,47 $\pm$ 1,1
3	+	7,60 $\pm$ 0,8
4	+	6,80 $\pm$ 0,7
5	+	5,10 $\pm$ 0,9
6	+	7,60 $\pm$ 0,8
7	+	8,10 $\pm$ 1,1
8	+	6,50 $\pm$ 0,9
9	+	7,45 $\pm$ 0,8
10	+	6,32 $\pm$ 0,9
11	+	6,97 $\pm$ 0,7
12	+	7,80 $\pm$ 0,9
13	-	<b>6,50<math>\pm</math>0,8</b>
14	+	5,70 $\pm$ 0,7
15	+	5,56 $\pm$ 0,9
16	-	7,35 $\pm$ 1,0
17	+	6,52 $\pm$ 0,9
18	+	6,18 $\pm$ 0,8
19	+	8,14 $\pm$ 0,9
20	+	5,52 $\pm$ 0,7
21	+	6,20 $\pm$ 0,9
22	-	<b>5,60<math>\pm</math>0,9</b>
23	-	<b>6,20<math>\pm</math>0,8</b>
24	+	4,69 $\pm$ 0,6
25	+	5,12 $\pm$ 0,9
26	+	6,59 $\pm$ 0,8
27	+	5,80 $\pm$ 0,7
28	+	5,90 $\pm$ 0,7
29	+	6,20 $\pm$ 0,8
30	+	6,20 $\pm$ 0,9
31	-	<b>6,53<math>\pm</math>0,5</b>
32	+	5,80 $\pm$ 0,2
33	+	6,97 $\pm$ 0,8
34	+	5,50 $\pm$ 0,6
35	+	5,20 $\pm$ 0,9
36	+	5,58 $\pm$ 0,7
37	+	6,36 $\pm$ 1,0
38	+	7,00 $\pm$ 0,9
39	+	5,81 $\pm$ 0,8
40	+	7,10 $\pm$ 0,9

### 5.3 Γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση και μηχανισμοί ακτινοευαισθησίας

Από βιβλιογραφικά δεδομένα είναι γνωστός ο συσχετισμός της (G2) ακτινοευαισθησίας με τη γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα γενετικής διαταραχής που χαρακτηρίζεται από ευαισθησία σε γενοτοξικούς παράγοντες όπως χημικές ουσίες και ιοντίζουσα ακτινοβολία αποτελεί το σύνδρομο Αταξίας Τηλαγγειεκτασίας (AT, Ataxia Telangiectasia). Υπολογίζεται ότι 1% του γενικού πληθυσμού είναι ετερόζυγοι για το γονίδιο ATM, αν και κλινικά είναι μη διακριτοί από τα φυσιολογικά άτομα, και παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου κατά την ενηλικίωση. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι σε οικογένειες με AT οι ετερόζυγες γυναίκες είχαν 5 φορές αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού και η εμφάνισή του ήταν 6,6 φορές μεγαλύτερη σε γυναίκες άνω των 60 ετών. Το γονίδιο ATM εδράζεται στο χρωμόσωμα 11 στη θέση q22.23 και περισσότερες από 300 διαφορετικές μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε ασθενείς με AT διασκορπισμένες σε όλο το μήκος του γονιδίου. Το μεγάλο μέγεθος του γονιδίου, η πολυπλοκότητά του και η έλλειψη σημείων υψηλού κινδύνου για μεταλλάξεις, καθώς και ο περιορισμένος αριθμός των μεταλλάξεων που ανιχνεύει η δοκιμασία πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης αποτελούν πρόβλημα στην έρευνα και στην ταυτοποίηση των ετερόζυγων ατόμων. Εναλλακτικές μέθοδοι ανίχνευσης των ετερόζυγων ατόμων μπορούν να αποτελέσουν επιγονιδιακές εκφράσεις, όπως η αυξημένη ευαισθησία σε γενοτοξικούς παράγοντες, καθώς και η απορύθμιση παραγόντων του κυτταρικού κύκλου όπως ο MPF (Mitosis Promoting Factor).

Με σκοπό την ανίχνευση των ετερόζυγων AT ατόμων καθώς και τη μελέτη των μηχανισμών ευαισθησίας σε γενοτοξικούς παράγοντες και ενδεχομένως σε παράγοντες του επαγγελματικού περιβάλλοντος και τη γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση, ελέγχθηκε (1) αν είναι δυνατή η ανίχνευση ετερόζυγων AT ατόμων που εκτίθενται σε γενοτοξικούς παράγοντες στο επαγγελματικό τους περιβάλλον με βάση τη ευαισθησία που εκφράζουν μετά από έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία *in vitro* των λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος και (2) οι μηχανισμοί στους οποίους υπόκειται η αυξημένη ευαισθησία σε γενοτοξικούς παράγοντες ατόμων με προδιάθεση στην καρκινογένεση.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την πιθανή συσχέτιση υπερευαισθησίας στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες και σε γενοτοξικούς παράγοντες και τη γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση. Η γνώση των γενετικών παραγόντων που καθορίζουν την αυξημένη ευαισθησία στην ιοντίζουσα ακτινοβολία είναι δυνατόν να αποτελέσει το απαραίτητο βιολογικό υπόβαθρο για την ανάπτυξη μεθοδολογιών, ώστε να ανιχνεύονται μέλη που εκτίθενται επαγγελματικά σε γενοτοξικούς παράγοντες με υπερευαισθησία στην έκθεση σε αυτούς και ενδεχομένως με γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση. Θα διαπιστώνεται επομένως κατά πόσον ο εν λόγω εργαζόμενος ανήκει σε κάποια ομάδα του πληθυσμού υψηλής επικινδυνότητας.

Συγκεκριμένα, εξετάστηκε αν οι διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA ή η κατάργηση του σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στην G2-φάση και η είσοδος των κυττάρων στη μίτωση παίζουν σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς ευαισθησίας των AT ατόμων και γενετικής προδιάθεσης στην καρκινογένεση.

κινογένεση. Για τον σκοπό αυτό αναλύθηκαν οι χρωμοσωματικές αλλοιώσεις στη μετάφαση σε λεμφοκύτταρα ΑΤ ομοζυγωτών, ετεροζυγωτών και μαρτύρων μετά από ακτινοβολία στην G2-φάση του κυτταρικού κύκλου και συγκρίθηκαν με αυτές που αναλύονται απευθείας στην G2-φάση χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία της Πρόωρης Χρωμοσωματικής Συμπύκνωσης. Η ανάλυση των χρωματιδικών αλλοιώσεων στη G2-φάση επιτεύχθηκε με τη χρήση της καλικουλίνης-A, ενός ειδικού αναστολέα των πρωτεϊνικών φωσφατασών τύπου 1 και 2 A που μπορεί να επάγει πρόωρη χρωμοσωματική συμπύκνωση σε πολλούς τύπους κυττάρων με μεγάλη ικανότητα. Μελετήθηκε επιπλέον η σπουδαιότητα της ενεργότητας του συμπλέγματος cdk1/cyclinB, έναν παράγοντα-κλειδί για τη μετάβαση των κυττάρων από τη G2-φάση στη μίτωση και τη μετατροπή των αλλοιώσεων στο DNA σε χρωμοσωματικές αλλοιώσεις. Για τον σκοπό αυτό συγκρίθηκε η ενεργότητα του MPF (Mitosis Promoting Factor) σε τρεις λεμφοβλαστικές σειρές με διαφορετικό καθεστώς του ATM (ATM<sup>-/-</sup>, ATM<sup>+/-</sup>, control).

Τα πειραματικά αποτελέσματα στο χρωμοσωματικό επίπεδο των μηχανισμών, που καθορίζουν τη διακύμανση της ευαισθησίας σε γενοτοξικούς παράγοντες τόσο στο κυτταρικό επίπεδο, όσο και μεταξύ ατόμων με διαφορετικό καθεστώς του ATM, συμβάλλουν στην ανάπτυξη μιας μεθόδου για την ανίχνευση αυξημένης ευαισθησίας σε γενοτοξικούς παράγοντες ατόμων του πληθυσμού. Η μέθοδος βασίζεται στην ακτινοευαισθησία της G2-φάσης του κυτταρικού κύκλου λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος και η εφαρμογή της σε δείγματα περιφερικού αίματος απέδειξε ότι είναι αρκετά ευαίσθητη για την ανίχνευση διαφορετικής ακτινοευαισθησίας μεταξύ των δοτών αυτών και την ταξινόμηση τους με βάση την ευαισθησία της G2 φάσης των λεμφοκυττάρων.

Τα αποτελέσματα διερεύνησης των μηχανισμών που διέπουν την αυξημένη ακτινοευαισθησία και γενετική προδιάθεση στην καρκινογένεση υποδεικνύουν ότι η επεξεργασία των αλλοιώσεων που επάγονται από την ακτινοβολία στην G2 φάση σε κρίσιμα για την επιβίωση του κυττάρου βιομόρια, όπως το DNA και η αποτελεσματικότητα των επιδιορθωτικών μηχανισμών του κυττάρου, είναι δυνατόν να εκφράζονται σε διαφορετικό βαθμό σε διαφορετικά άτομα του πληθυσμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση διαφορετικής ευαισθησίας σε γενοτοξικούς παράγοντες ατόμων που εκτίθενται στο επαγγελματικό περιβάλλον και ενδεχομένως διαφορετικής γενετικής προδιάθεσης στην καρκινογένεση.

Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών, δημοσιεύθηκαν υπό μορφή εργασίας στο περιοδικό Cancer Research (Βλ. Παρ. 8, Δημοσίευση σε Επιστημονικό Περιοδικό).



## 6

## ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΕΥΡΩΠΑΪΚΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

- International Collaborative Group on hereditary breast-ovarian cancer modifier genes. Coordinated by David Goldgar and Olga Sinilnikova, International Association for Research in Cancer – Lyon, FR.
- Identification of new genes related to breast cancer predisposition. Coordinated by Mary-Claire King, American Cancer Society Professor, University of Washington School of Medicine Seattle
- Breast Cancer Linkage Consortium – BCLC Coordinated by Peter Devilee, Univ. of Leiden NL,
- International Collaborative Group on Hereditary Breast Ovarian Cancer - ICG-FBOC. Coordinated by Gareth Evans, Academic Unit of Medical Genetics and Regional Genetics Service, St Mary's Hospital, Manchester and Diana Eccles Princess Anne Hospital, Wessex Clinical Genetics Service, Southampton, UK
- The 5382insC BRCA1 mutation study group. Coordinated by William Foulkes, Department of Human Genetics, McGill University, Canada
- Identification of Men with a genetic predisposition to ProstAte Cancer: Targeted screening in BRCA1/2 mutation carriers and controls (The IMPACT Study) Coordinated by Dr Ros Eeles, Institute of Cancer Research, Royal Marsden NHS Trust, Sutton, UK.
- Population specific panels of DNA markers for detection of moderate risk of breast and colon cancers and their market application. Coordinator Jan Lubinski. Pomeranian Medical University – Poland and 14 more partners.





## ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Τα αποτελέσματα που διεξήχθησαν από τα πειράματα στα πλαίσια του ερευνητικού αυτού προγράμματος παρουσιάστηκαν στα παρακάτω επιστημονικά συνέδρια.

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., Τερζούδη Γ.Ι., Παντελιάς Γ.Ε. & Μακρόπουλος Β. Κυτταρογενετική μελέτη συνδυασμένης δράσης υδροκινόνης και ιοντίζουσας 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 on SCEs and chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes. 28th International Congress on Occupational Health, Milan, Italy, June 2006.
5. Konstantopoulou I., Ladopoulou A., Armaou S., Nikolopoulos G., Yannoukakos D.. Hereditary breast/ovarian cancer in Greece BRCA1 & BRCA2 genes mutation analysis. 5th Congress of the Balkan Union of Oncology, 14-17/10/2005, Belgrade, Serbia & Montenegro. Invited lecture.
6. N. Mytakidis, E. Vassiliou, V. Liakos, L. Papagrigoriou, F. Hadzimarkou, I. Kostoglou-Athanasίου, G. Koutsodontis, A. Ladopoulou, T. Bei, D. Yannoukakos & P. Kaldrymidis. Mutation at codon 804 detected in a Greek kindred by screening of the RET gene in patients with medullary thyroid carcinoma. 8th European Congress of Endocrinology, 1-5/4/2006 Glasgow, UK.
7. N. Mytakidis, M. Zachariou, T. Anagnostopoulos, E. Vassiliou, D. Thomas, Tertipi, T. Rampias, I. Konstantopoulou, P. Natsis, D. Yannoukakos & P. Kaldrymidis. A rare RET gene mutation is found in two apparently unrelated Greek kindreds with familial medullary thyroid carcinoma. 8th European Congress of Endocrinology, 1-5/4/2006 Glasgow, UK.

8. S. Armaou, I. Konstantopoulou, E. Razis, I. Boukovinas, N. Xenidis, G. Fountzilias, D. Yannoukakos. Detection of two novel genomic rearrangements in BRCA1 gene in Greek breast/ovarian cancer families using quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments. EUROPEAN HUMAN GENETICS CONFERENCE 2005, Amsterdam May 6-9.
9. T Anagnostopoulos, I. Konstantopoulou, A. Ladopoulou, MA Young, A Dobrovic, D Yannoukakos. Worldwide investigation of a BRCA1 founder mutation related to breast/ovarian cancer predisposition, found in greek population. 20th IUMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists (FAOBMB) Congress. Kyoto, Japan 16-23/06/2006. Young Scientists' Award to T. Anagnostopoulos
10. T Anagnostopoulos, I Konstantopoulou, G Nasioulas, A Dobrovic, MA Young, G Mitchell, G Fountzilias, D Yannoukakos. Worldwide investigation of a BRCA1 founder mutation causing breast-ovarian cancer found exclusively in the Greek population. 11th International Congress of Human Genetics. Brisbane, Australia. August 6 - 10 2006
11. Armaou S, Konstantopoulou I, Anagnostopoulos T, Razi E, Boukovinas I, Xenidis N, Fountzilias G, Yannoukakos. Novel Genomic Rearrangements in the BRCA1 Gene detected in Greek breast/ovarian cancer patients. Breast Cancer Linkage Consortium 6-7 Sept. 2006 and Eric K Fernström Symposium Cancer and Genetics 7 - 9 September 2006, Lund, Sweden.
12. Hamel N, Foretova L, Narod SA, Tihomirova L, Zajac V, Ciernikova S, Armaou S, Yannoukakos D, Greenwood C, Foulkes WD. Investigating the origins of the BRCA1 mutation c.5385dupC. American Society of Human Genetics Annual Meeting. 9-13th Oct 2006 New Orleans, USA.
13. 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.
14. 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.
15. 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 Συνέδριο, «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 που παρουσιάστηκε στο εν λόγω συνέδριο.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Μέρος των αποτελεσμάτων που διεξήχθησαν από τα πειράματα στα πλαίσια του ερευνητικού αυτού προγράμματος δημοσιεύτηκαν υπό τη μορφή άρθρου στα παρακάτω επιστημονικά περιοδικά.

1. Malik S.I., Terzoudi G.I., Pantelias G.E. SCEs analysis in G2 lymphocyte prematurely condensed chromosomes after exposure to atrazine: the non-dose-dependent increase in homologous recombinational events does not support its genotoxic mode of action. *Cytogenetic Genome Research* (2004) 104(1-4):315-9.

2. Hatzi V.I., Terzoudi G.I., Pantelias G.E., Spiliopoulou C. & Makropoulos V. The benzene metabolism hydroquinone, enhances G2-chromosomal by affecting the G2-M-checkpoint in irradiated lymphocytes. *International Journal of Oncology* 31(1):145-152.

3. Hatzi V.I., Terzoudi G.I., Paraskevopoulou C., Makropoulos V. Matthopoulos D.P. & Pantelias G.E. The use of Premature Chromosome Condensation to study the influence of environmental factors on human genetic material in interphase cells. *The Scientific World Journal* (2006) 25(6):1174-90.

4. Terzoudi GI, Manola KN, Pantelias GE, Iliakis G. Checkpoint abrogation in G2 compromises repair of chromosomal breaks in ataxia telangiectasia cells. *Cancer Research* (2005) 65(24):11292-6.

5. Pyrpasopoulos S, Ladopoulou A, Papanikolaou Y, Vorgias C, Yannoukakos D, Nounesis G. Thermal Unfolding Intermediate of the BRCT Tandem Repeat Region of Human Tumour Suppressor Gene Product BRCA1. *Biophysical Chemistry* (2005), 114, 1-12.

6. Hughes DJ, Ginolhac SM, Coupier I, Corbex M, Bressac-de-Paillerets B, Chompret A, Bignon YJ, Uhrhammer N, Lasset C, Giraud S, Hardouin A, Berthet P, Peyrat JP, Fournier J, Nogues C, Lidereau R, Muller D, Fricker JP, Longy M, Toulas C, Guimbaud R, Maugard C, Olschwang S, Yannoukakos D, Durocher F, Moisan AM, Simard J, Mazoyer S, Lynch HT, Szabo C, Lenoir GM, Goldgar DE, Stoppa-Lyonnet D, Sinilnikova OM. Common BRCA2 variants and modification of breast and ovarian cancer risk in BRCA1 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (2005) Jan;14(1):265-7.

7. Hughes D, Ginolhac S, Coupier I, Barjhoux L, Gaborieau V, Bressac-de-Paillerets B, Chompret A, Bignon YJ, Uhrhammer N, Lasset C, Giraud S, Sobol H, Hardouin A, Berthet P, Peyrat JP, Fournier

J, Nogues C, Lidereau R, Muller D, Fricker JP, Longy M, Toulas C, Guimbaud R, Yannoukakos D, Mazoyer S, Lynch HT, Lenoir GM, Goldgar DE, Stoppa-Lyonnet D, Sinilnikova OM. Breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers and polyglutamine repeat length in the AIB1 gene. *International Journal of Cancer* (2005) 117(2):230-3.

8. Chenevix-Trench G, Healey S, Lakhani S, Waring P, Cummings M, Brinkworth R, Deffenbaugh A.M, Burbidge L.A, Pruss D, Judkins T, Scholl T, Bekessy A, Marsh A, Lovelock P, Wong M, Tesoriero A, Southey M, Hopper J. L, Yannoukakos D, Brown M, kConFab Investigators, Easton D, Tavtigian S.V, Goldgar D, and Spurdle A.B. Genetic and histopathological evaluation of BRCA1 and BRCA2 DNA sequence variants of unknown clinical significance. *Cancer Research* (2006) Feb 15;66(4):2019-27.

9. Kaldrymides P, Mytakidis N, Anagnostopoulos T, Vassiliou M, Tertipi A, Zahariou M, Rampias T, Koutsodontis G, Konstantopoulou I, Ladopoulou A, Bei, Yannoukakos D. A Rare RET Gene Exon 8 Mutation is Found in two Greek Kindreds with Familial Medullary Thyroid Carcinoma: Implications for Screening. *Clinical Endocrinology (Oxf)* (2006) May; 64(5):561-6.

10. Armaou S, Konstantopoulou I, Anagnostopoulos T, Razi E, Boukovinas I, Xenidis N, Fountzilias G, King MC, Yannoukakos D. Novel Genomic Rearrangements in the BRCA1 Gene detected in Greek breast/ovarian cancer patients. *European Journal of Cancer* (2007) 43: 443-453.

11. Nikolopoulos G, Pyrpassopoulos S, Thanassoulas A, Vlassi M, Vorgias C, Yannoukakos D, Nounesis G. Thermal Unfolding Intermediates of Human BRCA1 BRCT-Domain Variants. Submitted *Biochimica Biophysica Acta* (2007) 1774: 772-80.

12. Mytakidis N, Konstantopoulou I, Tertipi A, Thomas D, Marinos G, Rampias T, Koutsodontis G, Anagnostopoulos T, Ladopoulou A, Bei T, Stylianakis A, Magiakou MA, Chrousos GP, Diamanti-Kandarakis E, Yannoukakos D, Kaldrymides P. Mutation at codon 804 in the RET Proto-oncogene and Familial Medullary Thyroid Carcinoma in a Greek Kindred. Submitted *European Journal of Endocrinology*

13. Anagnostopoulos T, Pertesi M, Konstantopoulou I, Armaou S, Nasioulas G, Dobrovic A, Young MA, Mitchell G, Fountzilias G, Yannoukakos D. Investigation of a BRCA1 founder mutation related to breast/ovarian cancer predisposition, found in the Greek population. In preparation

14. Yannoukakos D, Armaou S, Anagnostopoulos T, Athanasopoulos P, Pertesi M, Thodi G, Koutsodontis G, Konstantopoulou I, Fountzilias G. BRCA1 gene mutation 5382insC is a major breast cancer predisposing allele in Greece. In preparation

15. Konstantopoulou I, Rampias T, Anagnostopoulos T, Koutsodontis G, Armaou S, Nikolopoulos G, Ladopoulou A, Nounesis G, Stylianakis A, Skarlos D, Gaki V, Fountzilias G, Bei T, Yannoukakos D. Most BRCA1 & BRCA2 mutations in Greek hereditary breast/ovarian cancer patients are clustered at the 3' end of BRCA1: a population-specific hierarchical mutation screening protocol. *Breast Cancer Research* (2007) Apr24.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bernardini S., Hirvonen A., Jarventaus H. & Norppa H. Influence of GSTM1 and GSTT1 genotypes on sister chromatid exchange induction by styrene in culture human lymphocytes. *Carcinogenesis* (2002) 23(5): 893-897.
- Bishop J.M. Molecular themes in oncogenesis. 1991 *Cell*, 64, 235-248.
- Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res.* (2003) Jun;543(3):251-72.
- Brennan P. Gene-environment interaction and aetiology of cancer: what does it mean and how can we measure it? *Carcinogenesis*. 2002 Mar;23(3):381-7.
- Bronzetti G., Zeiger e. & Frezza D. Genetic activity of trichloroethylene in yeast. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* (1978) 1, 411-418.
- Feron V.J., Cassee F.r., Groten J.P., van Vliet P.W., van Zorge J.A. International Issues on human health effects pf exposure to chemical mixtures. *Environ. Health Perspect.* (2002) 110, 6: 893-899.
- Gelehrter T.D., Collins F.S. & Ginsburg D. *Principles of Medical Genetics*, 2nd ed. (2003) Williams & Wilkins, USA.
- Hu J.J., Smith T.r., Miller M.s., Mohrenweiser W., Golden A. & Case L.D. Amino aced substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis* (2001) 22(6): 917-922.
- Hunter T. Cooperation between oncogenes, (1991) *Cell*, 64, 249-270.
- Kelada SN, Eaton DL, Wang SS, Rothman NR, Khoury MJ. The role of genetic polymorphisms in environmental health. *Environ Health Perspect.* (2003) Jun;111(8):1055-64.
- Kim J.C., Roh S.A., Koo K.H., Ka I.H., Kim H.C., Yu C.S., Lee K.H., Kim J.S., Lee H.I. & Bodmer W.F. Genotyping possible polymorphic variants of human mismatch repair genes in healthy Korean individuals and sporadic colorectal cancer patients. *Fam. Cancer* (2004) 3(2): 129-137.
- Krupa R & Blasiak J. An association of polymorphism of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 with colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* (2004) 23(2): 285-294.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordtsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, Szustakowski J, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. (2001) Feb 15;409(6822):860-921.

Lee M., Kwon J., Kim S.N., Kim J.E., Koh W.S., Kim E.J., Chung M.K., Han S.S., Song C.W. "cDNA microarray gene expression profiling of hydroxyurea, paclitaxel and p-anisidine, genotoxic compounds with differing tumorigenicity results". *Environ Mol Mutagen* (2003) 42 (2): 91-97.

Maltoni C., Lefemine G. Cotti G. & Perino G. Long term carcinogenicity bioassays on trichloroethylene administered by inhalation to Sprague-Dawley rats and Swiss and B6C3F1 mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1988) 574, 316-342.

Medeiros R., Soares R., Vasconcelos A., Schmitt F. & Lopes C. Glutathione S-transferase genotype

- GSTM1 as a predictor of elevated angiogenic phenotype in patients with early onset breast cancer. *Angiogenesis* (2004) 7(1): 53-58.
- Nelson H.H., Weinckle J.K., Christiani D.C., Cheng T.J. & Kelsey K.T. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis* (1995) 16: 1243-1245.
- Nelson M.A. & Bull R.J. Induction of strand breaks in DNA by trichloroethylene and metabolites in rat and mouse liver in vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1988) 94, 45-54.
- Norppa H., Hirvonen A., Jarventaus H., Uuskula M., Tasa G., Ojajarvi A. & Sorsa M. Role of GSTT1 and GSTM1 genotypes in determining individual sensitivity to sister chromatid exchange induction by diepoxybutane in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis* (1995) 16(6):1261-1264.
- Pantelias, G.E. and Maillie, H.D. A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol. (1983) *Somatic Cell Genet.* 9, 533-547.
- Pantelias G.E. & Mallie H.D. 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.* (1985) 149: 67-72.
- Patrinos A, Drell D. The times they are a-changin'. *Nature* (2002) Jun 6;417(6889):589-90.
- Pifer J.W. Mortality study of employees engaged in the manufacture and use of hydroquinone. *International archives of Occupational and Environmental Health.* (1995) 67(4), 267-280.
- Rockett J.C., Kavlock R.J., Lambright C.R., Parks L.G., Schmid J.E., Wilson V.S., Wood C., Dix D.J. DNA arrays to monitor gene expression in rat blood and uterus following 17beta-estradiol exposure: biomonitoring environmental effects using surrogate tissues *Toxicol Sci* (2002) 69 (1): 49-59.
- Samson LD. On the 50th anniversary of solving the structure of DNA. *Environ Health Perspect.* (2003) May;111(6):A329-31.
- Savage J.R. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J Med Genet.* (1976) 13(2):103-122.
- Scmandt R. & Mills G.B. Genomic components of carcinogenesis. *Clin. Chem.* (1993) 39, 2375-2385.
- Sobti R.C., Sharma s., Joshi A., Jindal S.K. & Janmeja A. Genetic polymorphism of the CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer susceptibility in a north Indian populations. *Mol. Cell. Biochem.* (2004) 266 (1-2): 1-9.
- Terzoudi G.I. & Pantelias G.E. Conversion of DNA damage into chromosome damage in response to

- cell cycle regulation of chromatin condensation after irradiation. *Mutagenesis* (1997) 12 (4):271-276.
- Terzoudi G.I., Malik S.I., Pantelias G.E., Margaritis K. Manola K. & Makropoulos W. A new cytogenetic approach for the evaluation of mutagenic potential of chemicals that induce cell cycle arrest in the G2 phase. *Mutagenesis* (2003) 18 (6):539-543.
- Thacker J., Zdzienicka M.Z. The XRCC genes: expanding roles in DNA double-strand break repair. *DNA Repair* (2004) 3(8-9):1081-1090.
- Their R., Bruning T., Roos P.H., Rihs H.P., Golka K., Ko Y. & Bolt H.M. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* (2003) 206(3): 149-171.
- Their R., Bruning T., Roos P.H., Rihs H.P., Golka K., Ko Y. & Bolt H.M. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. *Int. J. Hyg. Environ. Health* (2003) 206(3): 149-171.
- Tiret L. Gene-environment interaction: a central concept in multifactorial diseases. *Proc Nutr Soc.* (2002) Nov;61(4):457-63.
- Tsutsida S. & Sato K. Glutathione transferases and cancer. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* (1992) 27 (4,5): 337-384.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nuskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J,



Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science*. (2001) Feb 16;291(5507):1304-51.

Wakefield J. Environmental genome project: focusing on differences to understand the whole. *Environ Health Perspect*. (2002) Dec;110(12):A757-9.

Yoon B.I., Li G.X., Kitada K., Kawasaki Y., Igarashi K., Kodama Y., Inoue T., Kobayashi K., Kanno J., Kim D.Y., Inoue T., Hirabayashi Y. Mechanism of benzene induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. *Environ. Health Perspect*. (2003) 111 (11): 1411-1420.



ΤΟ ΒΙΒΛΙΟ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΡΓΑΖΟΜΕΝΩΝ  
ΜΕ ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΡΚΙΝΩΝ

ΣΕΛΙΔΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΚΑΙ ΤΥΠΩΘΗΚΕ

ΑΠΟ ΤΟΝ

ΕΚΔΟΤΙΚΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΛΙΒΑΝΗ ΑΒΕ

Σόλωνος 98 – 106 80 Αθήνα

Τηλ. : 210 3661200 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 ΑΝΤΙΤΥΠΑ

