
**GENOTYPISCHE EN FENOTYPISCHE VARIABILITEIT, INDIVIDUELE
SUSCEPTIBILITEITSFACTOREN EN INDUSTRIËLE GENOTOXISCHE/NEUROTOXISCHE
AGENTIA IN DE ARBEIDSGENEESKUNDE**

M. Kirsch-Volders (coördinator) - VUB
H. Veulemans - KUL
H.Thierens - RUG
L. de Ridder - RUG
D. Lison - UCL
P. Vielle - UCL
C. Laurent - ULg



Promotor: Prof. Dr. M. Kirsch-Volders

Wetenschappelijk medewerkers: Annie Tresp
Marlies De Boeck

Vrije Universiteit Brussel
Faculteit Wetenschappen
Vakgroep Biologie
Laboratorium voor Cellulaire Genetica

I. INLEIDING

I.1. Context en algemeen kader van het onderzoek

Het *in vivo* effect van een gegeven toxisch agens op cellulaire mechanismen, en de gevolgen hiervan op de menselijke gezondheid, hangen af van vele interacties tussen het agens en verscheidene niveaus van fysiologie. Vooral een chemisch toxisch agens zijn einddoel(en) bereikt, kan zijn systemische concentratie gemoduleerd worden door variërende absorptiesnelheden, en kan zijn chemische structuur gewijzigd worden door activatie- of detoxificatie-enzymen. Fysische mutagenen/carcinogenen kunnen differentieel geabsorbeerd worden door de weefsels die het doel van het lichaamsoppervlak scheiden. Eenmaal het agens zijn doel(en) bereikt heeft kunnen de geïnduceerde lesies rechtstreeks gefixeerd worden, hersteld worden, of getransformeerd worden tot een mutatie of functionele deficiëntie. Anderzijds kan het toxisch agens necrose induceren, of kunnen de beschadigde cellen geblokkeerd worden in een bepaald stadium van de celcyclus, en aangezet worden tot apoptose. De meeste genen die coderen voor proteïnes betrokken in de hierboven beschreven mechanismen vertonen interindividuele variabiliteit.

Variabiliteit doet zich voor op genetisch niveau (GENOTYPISCHE VARIATIES): individu's die drager zijn van één of meerdere allelen die leiden tot een sterker effect van het toxische agens, bijvoorbeeld door beter activatie, minder efficiënte repair capaciteit en/of afwezigheid van checkpoint controle, zullen mogelijk meer susceptibel zijn voor ziekte. Genen kunnen afwezig zijn, zoals in individu's homozygoot voor het niet-functionele allel van glutathion transferase klassen, of enzym activiteit onder de populatie kan verschillen in meerdere grootteordes, zoals voor cytochroom P4502D6 (Wormhoudt et al., 1999).

Naast genetische polymorfismen is de expressie van vele van deze genen ook variabel gereguleerd naargelang omgevingsfactoren (FENOTYPISCHE VARIATIES): eetgewoontes, beroepsblootstelling, levensstijl factoren, rookgewoontes, alcoholconsumptie, drugs, vasten, ... stimuleren of inhiberen de expressie van deze genen. Inductie van CYP2E1 activiteit bij chronische alcoholconsumptie van ethanol verhoogt bijvoorbeeld de activiteit van verschillende toxische agentia (Girre et al., 1994).

Naast susceptibiliteit voor ziektes zijn variabiliteitsfactoren ook belangrijk voor de interpretatie van verschillende biologische tests die gebruikt worden in arbeidsgeneeskunde om de intensiteit van de blootstelling, en dus het risico op een beroepsgebonden ziekte, te evalueren. Tot nu toe werden biologische monitoringmethodes en biologische grenswaarden toegepast in arbeidsgeneeskunde onder de veronderstelling dat individu's niet significant verschillen in hun capaciteit tot biotransformatie, wat niet het geval is. Het integreren van een meting van de variabiliteit in een biologisch monitoringprogramma zou een significante verbetering van de methode kunnen voorstellen, en dus leiden tot een betere inschatting van het risico op een beroepsgebonden ziekte.

De fascinerende vooruitgang die gemaakt werd in genoomanalyse en de identificatie van verschillende klassen genen die betrokken zijn in susceptibiliteit voor ziekte (o.a. kanker, neurologische aandoeningen, longziekten en reproductieve/ontwikkelingsstoornissen) wijzen nu op de mogelijkheid tot het identificeren van dragers van specifieke allelische combinaties of polymorfismen verbonden aan een verhoogd risico op arbeidsgebonden ziektes. De schatting van kankerrisico zou hierdoor kunnen evolueren van een probabiliteit berekend voor een gegeven populatie blootgesteld aan een gekend agens tot een meer geïndividualiseerde *health counselling*. Bij lage dosis blootstelling aan ioniserende stralen bijvoorbeeld zou

individuele radiosensitiviteit belangrijker kunnen zijn dan de dosis zelf wat betreft het kankerrisico. Potentiële toepassingen van variabiliteitsparameters voor biomonitoring van blootstelling hebben totnogtoe veel minder aandacht gekregen.

Deze potentiële nieuwe aanpak in arbeidsgeneeskunde, susceptibiliteitsanalyse genaamd, zou de bestaande methodes voor biomonitoring goed kunnen aanvullen. De technische capaciteit om zulke tests uit te voeren en de betrouwbaarheid van deze tests in termen van significantie voor de volksgezondheid moeten echter eerst onderzocht worden. De mogelijke implementatie van zulke tests in arbeidsgeneeskunde leidt ook tot belangrijke sociale en ethische vragen die een adequaat antwoord vereisen.

I.2. Doelstellingen van het onderzoek

Dit project had als doel het combineren van susceptibiliteitsbiomerkers met blootstellings- en effectbiomarkers die gevoelig, specifiek en predictief genoeg zijn om betrouwbare bepalingen uit te voeren.

De specifieke doelstellingen voor de VUB waren:

1. Op punt stellen van de technieken voor
 - 1.1. De genotypering van DNA-repairgenen (hOgg1, XRCC1, XRCC3) in samenwerking met UCL.
 - 1.2. de *DNA strand break repair* fenotype assay met behulp van de comet assay voor de inschatting van de snelheid en efficiëntie van *in vitro* DNA repair na challenging met een referentiemutagen (styreen oxide, ioniserende stralen) van gecultiveerde cellen afkomstig van verschillende donoren. Verschillen in *in vitro* repair zouden een indicatie kunnen zijn voor individuele gevoeligheid en voor adaptieve respons na chronische blootstelling.
2. Mechanistisch onderzoek naar de genotoxische effecten van hard metaalstof (WC-Co) als basis voor de keuze van adequate biomerkers.
3. Predictiviteit van genotypering (in het bijzonder van genen voor DNA repair) en *DNA strand break repair* fenotype voor genotoxische effecten bij biomonitoring van beroepsblootstelling aan mutagenen.
 - 3.1 Integratie van susceptibiliteitsparameters, naast de klassieke blootstellings- en effectparameters, voor het inschatten van het genotoxisch risico vanwege blootstelling aan styreen door middel van een biomonitoringstudie (in samenwerking met KUL en UCL).
 - 3.2 Integratie van susceptibiliteitsparameters naast de klassieke blootstellings- en effectparameters, voor het inschatten van het genotoxisch risico vanwege blootstelling aan kobalt door middel van een biomonitoringstudie (in samenwerking met UCL)
 - 3.3 Integratie van susceptibiliteitsparameters naast de klassieke blootstellings- en effectparameters, voor het inschatten van het genotoxisch risico vanwege blootstelling aan ioniserende stralen door middel van een biomonitoringstudie (in samenwerking met RUG)
4. Exploratorische benadering van de micro-array technologie voor de detectie van genexpressie van relevante genen na beroepsblootstelling, in samenwerking met UCL.

5. Studie van de ethische en wettelijke implicaties van het gebruik van susceptibiliteitstesten in de arbeidsgeneeskunde (in samenwerking met de juristen van de UCL).

II. THEORETISCH KADER

Waarom genotypering en fenotypering?

Genetische polymorfismen geven ons de mogelijkheid om interindividuele verschillen in susceptibiliteit voor blootstelling en ziekte te bestuderen, en te analyseren of het risico op kanker geassocieerd met een bepaalde omgevingsblootstelling verschilt in functie van functioneel verschillende genpolymorfismen. Biomerkers van susceptibiliteit zijn o.a. polymorfismen in drug/carcinogen metabolisatie, DNA repair capaciteit, genen die de celcyclus, celdood en immuunrespons controleren. De identificatie van susceptibiliteitsgenen zou dus kunnen leiden tot mogelijke preventieprogramma's die gericht zijn op "high-risk" individu's. Vanuit een theoretische standpunt wordt verwacht dat de variatie in individuele respons op eenzelfde concentratie genotoxicanten groter zal zijn bij lage dan bij hoge concentraties (saturatie effect). Daarom zou het bepalen van genetische susceptibiliteit belangrijk kunnen zijn om blootstellinglimieten (veiligheidsfactor) te definiëren op concentraties die voorkomen in beroepsblootstelling.

Tabel 1 geeft een overzicht van de voor- en nadelen van genotypering versus fenotypering. Genotypering heeft het voordeel technische makkelijk en goedkoop te zijn, is niet beïnvloedt door de omgeving, geeft duidelijke antwoorden maar is distaal t.o.v. de ziekte. Fenotypering is meer proximaal t.o.v. de ziekte en integreert effecten van verschillende genen en omgevingsfactoren, maar de methodologieën zijn nog niet allemaal gevalideerd en zijn nogal aan de dure kant. Voorbeeld van fenotypering zijn de *in vitro* challenging assays en microarrays (Touil et al., 2002; Ahsan and Rundle, 2003).

Zowel genotypering als fenotypering zijn dus belangrijk, en daarom werden deze ook beide gecombineerd in dit project.

Tabel 1: Enkele voor- en nadelen van genotypering versus fenotypering (Decordier et al., submitted)

	<u>Genetic polymorphisms</u>	<u>Functional/phenotype measures</u>
- Proximity to disease on causal chain	More distal	More proximal
- Expected relative strength of association	Weaker	Stronger
- Inductive or inhibitory effects of exposures	Not integrated into the measure	Integrated into the measure
- Epigenetic processes	Not integrated into the measure	Integrated into the measure
- Effects of post-transcriptional/translational alterations	Not integrated into the measure	Integrated into the measure
- Relative degree of measurement error	Lower	Higher
- Measures single gene processes	Yes	Yes
- Measures multi-gene processes	Yes, but with difficulty	Yes
- Temporal stability of measure	Stable	Less stable
- Modifiability and applicability for prevention trials	Not modifiable and not applicable	Modifiable and applicable

- Person-to-person transmission within family and applicability for family-based analysis	Transmission is determined by Mendel's law and is applicable	Less deterministic transmission and not applicable
- Ethical considerations	Higher	Lower
- Array-based simultaneous measurement of many genes/gene products	Challenging, because amplification of each gene is involved	More feasible, because individual amplification is not involved

DNA repair genen

Wanneer een cel genotoxische schade ondergaat, zijn er verschillende mogelijke uitkomsten: als de schade ernstig is, kan de cel sterven (door apoptose of necrose), de schade kan volledig hersteld worden via repair, of de repair kan onvoldoende/afwezig zijn, en leiden tot de vorming van mutaties die gefixeerd worden gedurende replicatie en/of de volgende mitose. Er bestaan verschillende DNA repair mechanismen: base excisie repair (BER), nucleotide excisie repair (NER), mismatch repair (MMR) en *double strand break* repair (DSBR).

Het menselijk Ogg1 gen bevindt zich op chromosoom 3p25, en codeert voor een DNA glycosylase die een rol speelt in BER door 8-hydroxyguanine (8-OH-G) te knippen uit DNA dat oxidatieve schade heeft ondergaan. 8-OH-G is een belangrijke vorm van oxidatieve DNA schade geïnduceerd door vrije radicalen. Het is zeer mutageen *in vitro* en *in vivo*, en veroorzaakt G:C tot T:A transversies, omdat het leidt tot het invoegen van cytosine en adenine nucleotides tegenover de lesie. Polymorfismen in het hOgg1 gen spelen mogelijk een rol bij het vermogen van de cel om 8-hydroxyguanine te herstellen.

XRCC1 speelt ook een belangrijke rol in BER. De XRCC1 proteïne vormt een complex met DNA ligase III en DNA polymerase β om 'gaps' ontstaan tijdens BER te herstellen. Het gen bevindt zich op chromosoom 19q13.2. XRCC1 mutante cellen vertonen een verhoogde gevoeligheid voor ioniserende straling, UV, waterstofperoxide en mitomycine C. Shen et al. identificeerden drie coderende polymorfismen in het XRCC1 gen op codons 194 (Arg naar Trp), 280 (Arg naar His) en 399 (Arg naar Gln) (Shen et al., 1998).

XRCC3 bevindt zich op chromosoom 14q32.3, en maakt deel uit van de Rad51 DNA repair genen familie. Het speelt een rol in de homologe recombinatie repair pathway door dubbelstrengige breuken (DSBR) te herstellen. XRCC3 mutante cellen vertonen een extreme gevoeligheid aan DNA crosslinking agentia, zoals MMC en cisplatin.

Ons laboratorium van de VUB was verantwoordelijk voor het valideren en uitvoeren van de genotypering van de DNA repair genen hOgg1, XRCC1 en XRCC3. De global repair fenotype assay werd voor deze genen ook door de VUB uitgevoerd in de biomonitoring studies voor styreen en ioniserende stralen.

Kobalt en zijn verbindingen

Blootstelling aan kobalt kan resulteren in negatieve effecten op verschillende organen of weefsels, waaronder het respiratorisch systeem, de huid, de hematopoïetische weefsels, het myocardium en de schildklier. Bovendien werden teratogene en carcinogene effecten waargenomen in experimentele systemen en/of in mensen.

Voor de algemene bevolking is voeding de voornaamste bron van blootstelling aan kobalt, aangezien kobalt een essentiële constituent is van vitamine B₁₂ (hydrocycobalamine).

Het carcinogeen potentiaal van kobalt en zijn verbindingen werd in 1991 geëvalueerd door het *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 1991). De algemene conclusie was dat kobalt en zijn verbindingen mogelijk carcinogeen zijn voor de mens (groep 2B).

Er werd een associatie aangetoond tussen beroepsblootstelling aan kobaltbevattend stof en longtoxiciteit, waaronder astmatische reacties, fibroserende alveolitis (“hardmetaalziekte”) en longkanker. Terwijl de astmatische symptomen veroorzaakt worden door gelijk welke kobalt species, wordt de ontwikkeling van kanker en fibroserende alveolitis voornamelijk toegeschreven aan de simultane blootstelling aan kobalt en wolframcarbide in arbeiders van de hard metaalindustrie (Lison, 1996; Moulin et al., 1998) en van de diamantnijverheid. Hard metaal bestaat gewoonlijk uit een mengsel van partikels van wolframcarbide (WC) en kobalt (Co) (96:4) en wordt geproduceerd voor zijn extreme hardheid en hoge resistentie eigenschappen. De exacte onderliggende mechanismen van het humaan kankerverwekkend vermogen aan hard metaalstof dienden nog opgehelderd te worden, maar simultane blootstelling aan kobalt en wolframcarbide bleek noodzakelijk. De demonstratie dat hard metaalpartikels grote hoeveelheden actieve zuurstofradicalen produceren, zowel direct als indirect door de inflammatoire reactie die ze induceren in de long en, in parallel, kobaltionen vrijlaten, kan een belangrijke mechanistische basis betekenen om hun humaan kankerverwekkend vermogen te verklaren (Lison et al., 1995). Actieve zuurstofradicalen zijn inderdaad zeer reactief en in staat om de integriteit van lipiden, proteïnen en DNA aan te tasten (Halliwell & Gutteridge, 1999). Bovendien kunnen kobaltionen binden op proteïnen die betrokken zijn bij essentiële cellulaire processen zoals DNA herstel, controle van de celcyclus en apoptose (Hartwig, 2001). Wat genotoxiciteit betreft, werd er voordien aangetoond dat het WC-Co partikelmengsel meer DNA schade en chromosoom-/genoommutaties veroorzaakt in humane lymfocyten *in vitro* dan zijn individuele componenten (Anard et al., 1997; Van Goethem et al., 1997). Er werd aangetoond dat Co(II) de incisie- en polymerisatiestap van nucleotide excisie DNA herstel kan inhiberen (Kasten et al., 1997), wat een co-mutageen potentieel suggereert. Er zijn geen data beschikbaar over het *in vivo* mutageen en/of carcinogeen vermogen van hardmetaalstof.

Een doel van dit deelproject was de mogelijke onderliggende (geno)toxische mechanismen na te gaan van het kankerverwekkende potentieel van het WC-Co mengsel. De relatie tussen inductie van initiële DNA schade, mutaties en overleving van cellen na behandeling met hard metaal in vergelijking met zijn individuele componenten werd geëvalueerd, zowel *in vitro* als *in vivo*.

III. METHODES

III.1. Validatie van methoden

Genotypering van repair genen

hOgg1

De techniek voor de bepaling van genotypen van DNA repairgenen werd op punt gesteld aan de UCL. Gina Plas, verbonden aan de VUB, is deze techniek gaan leren aan de UCL.

Een C-G mutatie in exon 7 van hOgg1 in 40% van de allelen wijzigt in het wild type genproduct een serine in een cysteine. Deze Ser/Cys en vooral Cys/Cys genotypen zouden gevoeliger zijn voor oxidatieve schade.

Voor de detectie van de polymorfismen maakt men gebruik van de “CAPS” techniek (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences). De eerste belangrijke stap is de keuze van het restrictie enzym (in het geval van het hOgg1 gen herkent het enzym Fnu4HI de GC↓CGC sequentie in de Cys-variant) en de primers (20 à 30 basen lang) aan weerszijden van het restrictiepolymorfisme.

Het betreffende DNA fragment wordt geamplificeerd door middel van de polymerase chain reactie (resultierend in een 234 bp PCR product) en vervolgens geïncubeerd met het restrictie enzym. Hierna volgt een elektroforese op agarosegel waarbij de detectie van de bekomen fragmenten gebeurt door kleuring van het DNA met ethidium bromide. Aan de hand van het aantal en de ligging van de banden kan men het genotype bepalen; in het geval van hOgg1 wordt de Cys-variant wel (164, 46 en 21 bp fragmenten) en de Ser-variant niet (213 en 21 bp fragmenten) geknipt door het Fnu4HI enzym.

XRCC1 en XRCC3

Voor de detectie van XRCC1 en XRCC3 polymorfismen werd besloten, met het oog op een uniforme werkwijze binnen het EU project, (Cancer Risk Biomarkers QLRT-2000-00628) de protocols van Prof. A. Hirvonen (FIOH, Helsinki) over te nemen. Het gaat hier om een modificatie van de werkwijze van Lunn et al. (1999). Hierbij wordt gebruik gemaakt van 2 multiplex PCR reacties, waarbij de eerste de polymorfismen van de codons 194 en 399 van XRCC1 detecteert, en de andere de analyse toelaat van het codon 280 van XRCC1, gecombineerd met het codon 241 van XRCC3.

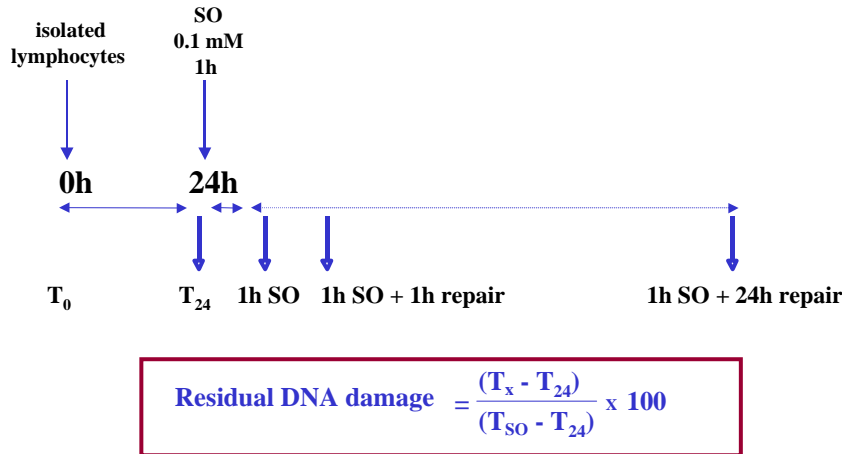
Voor de eerste analyse (XRCC1-194 en -399) gebeurt de digestie, na een Hot Start PCR, met MspI: dit enzym levert, naast een onveranderlijke band op 174 bp, voor de codon 194 polymorfismen Arg/Arg, Arg/Trp en Trp/Trp respectievelijk 21 bp en 292 bp; 21, 292 en 313 bp, en 313 bp digestieproducten. Voor codon 399 kan men het onderscheid maken tussen het niet verteerde 615 bp product van het Gln allel en de 221 bp en 374 bp digestieproducten van het Arg allel. Voor de analyse van de XRCC1-280 en XRCC3-241 polymorfismen wordt, na Hot Start PCR, een digestie uitgevoerd met RsaI en NlaIII. Een 140 bp digestieproduct kenmerkt het XRCC1 Arg allel, een 280 bp digestieproduct wijst op het His allel. Fragmenten van 335 en 233 bp kenmerken respectievelijk het XRCC3 Thr en Met allel. Daarnaast vertonen alle stalen nog een onveranderlijk 102 bp NlaIII digestieproduct.

De global repair fenotype assay

De global repair fenotype assay laat toe om de snelheid en de efficiëntie van *in vitro* DNA herstel te evalueren. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van de alkaline comet assay, een microgel elektroforese techniek ter detectie van DNA breuken en alkali-labiele sites op celniveau. Op verschillende tijdstippen, vóór en na *in vitro* behandeling met een mutagen, worden cellen genomen en verwerkt in de comet assay. Zodoende kan de inductie en het herstel van DNA schade na *in vitro* behandeling opgevolgd worden en kan de residuele DNA schade, aanwezig op een bepaald tijdstip, berekend worden. Interindividuele verschillen in het verloop van de curve van residuele DNA schade reflecteren variaties in susceptibiliteit (fenotypisch) of adaptieve respons na chronische blootstelling.

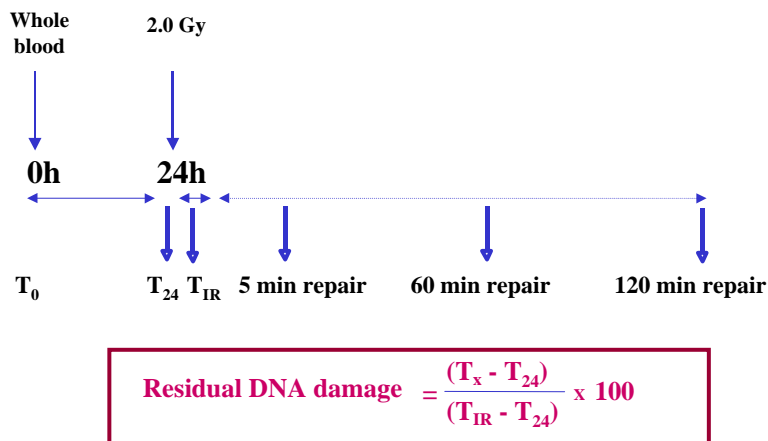
Figuur 1: schema voor de global repair fenotype assay met styreen oxide

Alkaline comet assay - lymphocytes Repair phenotype with styrene-oxide



Figuur 2: schema voor de global repair fenotype assay met ioniserende stralen

Alkaline comet assay - lymphocytes Repair phenotype with ionising radiation



De comet assay

De comet assay wordt zo genoemd naar de vorm van de beelden ('kometen') die onder de microscoop waargenomen worden. Het is een microgel electroforese techniek die toelaat DNA schade cel per cel op te meten. De alkaline versie detecteert DNA breuken, alkali labiele sites, open repair sites en crosslinks. Voor deze techniek worden cellen gemixt met

agarosegel, die uitgespreid wordt op microscoopslides. De cellen worden gelyseerd met hoge zoutconcentraties en detergenten. Vervolgens wordt het overblijvend nucleair DNA gedenateerd in een alkali buffer en geëlectroforeerd in diezelfde buffer. De DNA fragmenten migreren uit de nucleus, naar de positieve pool toe. Na electroforese worden de preparaten gestaind met een fluorochroom, bv. ethidiumbromide. Een beeldanalysesysteem wordt gebruikt om verscheidene schadeparameters te meten. De meest nuttige zijn 'tail length' (TL), gemeten van het midden van de nucleus tot het einde van de 'staart', het percentage aan DNA in de 'staart' (TD) en 'tail moment' (TM = TL x TD).

Om de detectie van oxidatieve DNA schade toe te laten, kan het Fpg enzyme (Formamidopyrimidine DNA glycosylase), dat voornamelijk 8-hydroxydeoxyguanine en zogehete Fpg-gevoelige sites detecteert, toegevoegd worden (Hartwig et al., 1996).

III.2. Mechanistisch onderzoek naar de genotoxische effecten van hard metaalstof

In vitro onderzoek

- *In vitro* genotoxiciteit van hard metaalstof en zijn componenten in menselijke PBMC.

De *in vitro* genotoxiciteit van WC-Co en zijn componenten Co en WC op perifeer bloed mononucleaire cellen (PBMC) werd geëvalueerd met de alkaline comet assay en de cytokinesis-block micronucleustest.

Celbehandeling voor de alkaline comet assay:

24u na het beginnen van PHA stimulatie werd 10 µl partikelsuspensie toegevoegd aan de PBMC. Duur van behandeling was 15 minuten in de dosis-effect experimenten en voor detectie van Fpg-gevoelige sites, and 15 min, 1, 2, 4, 6, 14, 24, 48 en 72 u in de tijdsafhankelijkheidstudies. EMS (ethyl methaansulfonaat), gebruikt als positieve controle, werd verdund in PBS en de blootstellingstijd was 2u. H₂O₂, gebruikt als controle voor Fpg activiteit, werd verdund in PBS, en blootstelling gebeurde op ijs gedurende 5 minuten. Na behandeling werden de cellen 10 min gecentrifugeerd bij 400g. Het supernatant werd verwijderd, en het celpellet geresuspendeerd in PBS en onmiddellijk verwerkt voor de comet assay.

Celbehandeling voor de *in vitro* cytokinesis-block micronucleustest:

32u na het beginnen van PHA stimulatie werden de PBMC behandeld met 4.0 µg/ml Co-equivalent CoCl₂, Co, WC en WC-Co, 0.15 µg/ml MMC (mitomycine C) en 0.04 µg/ml nocodazole. Deze testsubstanties werden in de cultuur gelaten tot het oogsten van de cellen na 72u. Na 44u werd cytochalasine-B toegevoegd, en na 72u werden de cellen gefixeerd en op slides gespreid. De micronucleustest werd gecombineerd met fluorescentie in situ hybridisatie (FISH), gebruik makend van een pancentromerische probe.

- *In vitro* genotoxiciteit van verschillende combinaties van kobalt en metallische carbiden in menselijke PBMC.

De geteste metaalcarbiden waren Cr₃C₂, Mo₂C and NbC, en WC als referentiecarbide. De carbiden werden gekozen op basis van eerder gepubliceerde data over genotoxiciteit (Lison & Lauwerys, 1995). Hun vermogen om enkelstrengige DNA breuken en alkali-labiele sites te induceren werd geëvalueerd aan de hand van de alkaline comet assay, en hun potentiaal om chromosoom-/genoommutaties te induceren aan de hand van de *in vitro* cytokinesis-block micronucleustest op PBMC van twee donoren. PBMC werden blootgesteld aan 0.6, 3.0 en 6.0 µg/ml Co-equivalent gedurende 15 minuten, overeenstemmend met 10.0, 50.0 en 100.0 µg/ml van het carbide of het Co-carbide mengsel.

Voor de alkaline comet assay werden de cellen onmiddellijk verwerkt. Voor de micronucleustest werden de cellen verder geïncubeerd bij 37°C. Als positieve controles werden respectievelijk EMS (2 µM, 2u) en MMC (0.15µg/ml, 48u) gebruikt voor de comet assay en de micronucleustest.

- *In vitro* genotoxiciteit van hard metaal en metallisch kobalt in primaire rat longcellen.

De *in vitro* genotoxiciteit van Co en WC-Co werd geëvalueerd in primaire rat alveolaire macrofagen (AM) en type II pneumocyten (AT-II) aan de hand van de alkaline comet assay. De dosisafhankelijkheid van de DNA beschadigende capaciteit van de twee partikeltypes werd vergeleken. De keuze van concentraties (3.0, 6.0, 12.0 en 24.0 µg/ml Co-equivalent) was gebaseerd op de resultaten verkregen in menselijke PBMC. De behandelingstijd van 4u was gebaseerd op voorafgaande experimenten met AM en AT-II cellen. Cellen werden ook blootgesteld aan EMS (2 µM) gedurende 2u bij 37°C, als positieve controle.

In parallel werd de viabiliteit van de longcellen geanalyseerd met de trypaan blauw *exclusion* test.

- Interferentie van hard metaalstof en zijn componenten met DNA repair *in vitro* in menselijke PBMC.

Het doel van dit deel van het onderzoek was te bepalen of, net als eerder aangetoond voor CoCl₂, metallisch Co, WC en het WC-Co partikelmengsel in staat zijn te interfereren met DNA repair *in vitro* in menselijke PBMC. Als model voor het evalueren van het effect op base excisie repair werd methyl methaansulfonaat (MMS) gekozen.

PBMC werden behandeld met MMS (5.5 µg/ml) gedurende 2u, 24u na PHA stimulatie. Hierna werden de cellen gecentrifugeerd (400g, 10 min) en, na verwijdering van het supernatant, onmiddellijk onderworpen aan de comet assay of heropgelost in vers medium en verder geïncubeerd in compleet medium gedurende 2u in de afwezigheid (*post-incubatie*) of aanwezigheid (*post-behandeling*) van 1.2 µg/ml Co-equivalent Co, WC-Co of WC. Enkele en simultane blootstelling van cellen aan MMS en 1.2 µg/ml Co-equivalent Co, WC-Co en WC werden ook uitgevoerd. Na behandeling, werden de cellen gecentrifugeerd (400g, 10 min), het supernatant verwijderd, en het celpellet geresuspendeerd en verwerkt voor de comet assay.

- *In vitro* apoptogene effecten van hard metaalstof en zijn componenten in menselijke PBMC.

PBMC werden behandeld met Co, WC, WC-Co and CoCl₂ op concentraties waarvoor eerder *in vitro* genotoxiciteit werd waargenomen (Anard et al., 1997; Van Goethem et al., 1997). Behandeling met metaalverbindingen werd gestart samen met PHA stimulatie of 24u erna. Apoptose werd bepaald door Annexine-V staining, Cell Death ELISA, en flow cytometrische identificatie van cellen met een lage DNA inhoud. De betrokkenheid van specifiek apoptose pathways werd bestudeerd door gebruikt van algemene en specifieke inhibitoren.

In vivo genotoxiciteit van hard metaalstof in de rat

Ratten werden behandeld met 16.6 mg WC-Co/kg lichaamsgewicht via intra-tracheale instillatie. Deze dosis induceert significante maar relatief gelimiteerde longtoxiciteit.

De comet assay werd uitgevoerd op PBMC en AT-II pneumocyten 12, 48, 72, 96 and 120h na intra-tracheale instillatie. De micronucleustest werd uitgevoerd op PBMC en AT-II pneumocyten 72 u na intra-tracheale instillatie.

De micronucleustest

De micronucleustest detecteert chromosoom- en genoommutaties. Een micronucleus (MN) wordt gevormd tijdens de metafase/anafase transitie van de mitose (celdeling), en kan ontstaan uit een geheel achterblijvend chromosoom (aneugene gebeurtenis die leidt tot chromosoomverlies) of een acentrisch chromosoomfragment dat loskwam van een chromosoom na een breuk (clastogene gebeurtenis) en niet integreert in de dochterkernen. Scoren van micronuclei is relatief makkelijk uit te voeren, en op verschillende celtypes relevant voor menselijke biomonitoring: lymfocyten, fibroblasten en geëxfolieerde epitheelcellen, zonder een extra *in vitro* cultuurstep.

Een *ex vivo/in vitro* analyse van lymfocyten in de aanwezigheid van een actine-inhibitor, cytochalasine-B (toegevoegd 44 u na start van cultuur), laat toe een onderscheid te maken tussen mononucleaire cellen die niet deelden, en binucleaire cellen die een complete celkerndeling ondergingen gedurende *in vitro* cultuur. In deze omstandigheden verschaffen de frequenties aan mononucleaire cellen een indicatie van het background niveau aan chromosoom-/genoommutaties geaccumuleerd *in vivo*. De frequenties aan binucleaire cellen met MN zijn een maat voor de schade geaccumuleerd vóór cultuur plus mutaties uitgedrukt tijdens de eerste *in vitro* mitose.

De combinatie van de micronucleustest met fluorescentie in situ hybridisatie (FISH) met een probe die de (peri-)centromerische regio van de chromosomen labelt, laat toe een onderscheid te maken tussen micronuclei die een geheel chromosoom (centromeer positieve MN) en een acentrisch chromosoomfragment (centromeer negatieve MN) bevatten.

In afwezigheid van cytochalasine-B, worden mononucleaire cellen geanalyseerd op de aanwezigheid van micronuclei.

In aanwezigheid van cytochalasine-B, wordt aangeraden mononucleaire cellen te fixeren 24 u na PHA-stimulatie, aangezien er op dat ogenblik geen twijfel over kan bestaan dat MN in zulke cellen het resultaat zijn van *in vivo* en geen *in vitro* deling. Voor binucleaire cellen wordt aangeraden ze 72 u na PHA-stimulatie te fixeren.

MNMC = frequentie aan micronuclei per 1000 mononucleairen.

MNCB = frequentie aan gemicronucleëerde binucleaire cellen per 1000 binucleaire cellen.

Detectie van apoptose

- Annexine-V staining

Na behandeling worden de cellen geïncubeerd met een mengsel van annexine en propidium jodide. De cellen worden op microscopslides gedropt en onder de fluorescentiemicroscop geanalyseerd. Zo kan men een onderscheid maken tussen vroeg apoptotische cellen (annexine-V positief/propidium jodide negatief), late apoptotische/secundaire necrotische cellen (annexine-V positief/propidium jodide positief) en necrotische cellen (annexine-V negatief/propidium jodide positief).

- Flow cytometrie

Na behandeling, worden de cellen gewassen met PBS, en gestaind met propidium jodide. Samples worden geanalyseerd met de CellQuest Pro software op een FACSCalibur (BECTON Dickinson) flow cytometer. Detectie van apoptotische cellen gebeurt op basis van cel granulariteit en DNA inhoud. Met deze aanpak kunnen apoptotische cellen geïdentificeerd worden als zeer gecondenseerde, granulaire cellen, met een sub-G1 DNA inhoud.

- Cell Death ELISA

De meting van apoptotische DNA degradatie werd gequantificeerd met de “cell death detection plus assay” (Roche Molecular Biochemicals), die de hoeveelheid histone-gebonden DNA fragmenten in het cytosol meet.

III.3. Biomonitoring studies

Styreen

Het biomonitoringprogramma van beroepsblootstelling aan styreen, dat een samenwerking is tussen de KUL, de UCL en de VUB heeft als doel de simultane evaluatie van externe en interne blootstelling, biologisch effectieve dosis, vroege biologische effecten en metabolische susceptibiliteit, gebruikmakende van een breed gamma van biomerkers:

- Externe dosis: styreen in de lucht (**KUL**)
- Interne dosis: amandelzuur in de urine (**KUL**)
- Biologische effectieve dosis: hemoglobine adducten (**KUL**)
- Vroeg biologisch effect: comet assay (DNA breuken en alkali labiele sites) (**VUB**)
sister chromatid exchange (chromatide recombinatie)
micronucleustest (chromosoom-/genoommutaties)
- Metabolische susceptibiliteit: interindividuele variabiliteitsparameters: genotypering van cytochroom P450 mono-oxygenase (CYP2E1), microsomaal epoxide hydrolase (EPHX) en glutathion S-transferase (GSTT1 en GSTM1) (**UCL**)

Roken is een mogelijke “confounding” factor. De hoeveelheid cotinine in de urine werd bepaald als merker voor het rookgedrag. De arbeiders zijn ook blootgesteld aan loodchromaat, daarom werd de hoeveelheid chroom in urine en lood in bloed eveneens bepaald. Het geheel van analyses werd uitgevoerd bij arbeiders die blootgesteld zijn aan styreen evenals bij een controlegroep.

- Repair susceptibiliteit: Bepaling van repairgenotypen : hOGG1, XRCC1 en XRCC3 (VUB)
- global repair fenotype (VUB)

De bestudeerde groep is een cohorte van 44 arbeiders uit de glasvezel reinforced polyesterindustrie, en 44 matched controles. De controle en blootgestelde groep zijn gematched voor leeftijd, geslacht, rookgewoontes, leef/woonomgeving, etnische oorsprong, socio-economische omstandigheden,... De controles zijn aan geen enkel carcinogen blootgesteld.

De VUB was verantwoordelijk voor de implementatie van de comet assay, het global repair fenotype, micronucleus test op nasale cellen, de *ex vivo/in vitro* micronucleus test op lymfocyten en de genotypering van repairgenen

Kobalt

Het hoofddoel van de Co-biomonitoring studie in het kader van dit onderzoeksprogramma was het belang te bepalen van susceptibiliteitsbiomerkers voor het verbeteren van de biomonitoring van arbeiders blootgesteld aan mutagenen/carcinogenen. Hiervoor bepaalden we het genotype voor hOGG1, XRCC1 en XRCC3, in alle arbeiders die geanalyseerd werden in de vorige studie op biomerkers voor blootstelling en genotoxische effecten (**De Boeck et al., 2000a**). De bestudeerde arbeiders werden geclassificeerd volgens homozygositeit of heterozygositeit voor de wildtype of gemuteerde allelen en rookgedrag. De bestudeerde groep is een cohorte van 60 blootgestelde arbeiders uit de hard metaal industrie en 35 matched controls. Dit project werd uitgevoerd in nauwe samenwerking met D. Lison (UCL).

Ioniserende stralen

Het doel van deze studie was het combineren van genotypering en *in vitro* challenge fenotype om te individuele susceptibiliteit te bepalen van werkers blootgesteld aan lage dosissen ioniserende stralen, waarvan geweten is dat ze oxidatieve schade en DNA strengbreuken, veroorzaken.

Stalen werden genomen 32 externe arbeiders betrokken bij de revisie van de reactoren van de kerncentrale van Doel. Dit type arbeiders is gekend voor zijn hoge blootstelling gedurende een relatief korte periode. Uiteraard zijn deze arbeiders de meest kritieke populatie blootgesteld van een kerncentrale en zijn daarom het onderwerp van deze biomonitoringstudie. Ook werd bloed van 31 controlepersonen gesampled. In samenwerking met de RUG werden verschillende cytogenetische eindpunten onderzocht om de biologische effecten van de werkomstandigheden van deze arbeiders te evalueren. De VUB spitste zich toe op de *ex vivo/in vitro* micronucleus test en de comet assay voor detectie van achtergrond DNA schade en global repair fenotype.

Voor meer informatie betreffende al deze methoden, zie bijlage I.

IV. RESULTATEN

IV.1. Validatie van methoden

Genotypering van DNA repair genen

In het hOGG1 protocol verlaagden we de MgCl₂ concentratie van 2.5 tot 2 mM om contaminerende banden te vermijden. We reduceerden ook de Taq concentratie die onnodig hoog was (2.5U/50µl) tot 1U/50µl.

In het XRCC1 194-399 protocol verhoogden we de MgCl₂ concentratie tot 3 mM en brachten we de 194:399 primerverhouding op 1:5 om multiplex banden van gelijke intensiteit te bekomen.

In het XRCC280-XRCC3 241 protocol voegden we drie basen toe aan het 3' einde van de 241R primer om een uniforme annealing temperaturen te bekomen in de PCR reactie, verhoogden we de dNTP concentratie van 200 tot 400 µM van elk dNTP om de opbrengst van de PCR reactie te verbeteren, en verhoogden we de MgCl₂ concentratie van 2.67 tot 2 mM, aangezien elke verhoging van de dNTP concentratie gepaard moet gaan met een verhoging in concentratie aan Mg ionen om de PCR reactie te doen werken. Voor sommige oude en verdunde stalen voerden we single locus PCR uit in plaats van de multiplex PCR. Dit vereiste een aanpassing van de *cycling conditions* en de aanwezigheid van BSA in een concentratie van 0.5 µg/µl.

De global repair fenotype assay

Details over het werk betreffende de validatie van de the global repair fenotype assay kunnen teruggevonden worden in de volgende publicaties/doctoraten van ons laboratorium:

- De Boeck et al., 2002b
- Touil N., 2001
- De Boeck M., 2002

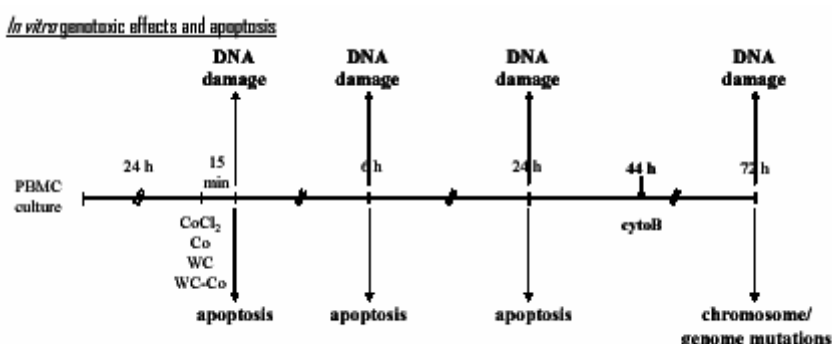
IV.2. Mechanistisch onderzoek naar de genotoxische effecten van hard metaalstof

Voordien werd aangetoond, gebruik makend van de alkaline comet en elutie assays en de cytokinese-blokk micronucleus test, dat het WC-Co mengsel (hard metaal) *in vitro* meer genotoxisch is dan zijn individuele componenten (Anard et al., 1997; Van Goethem et al., 1997). Het hoofddoel van dit deel van het project was te onderzoeken of inductie van initiële DNA schade, het voorkomen van mutaties, en veranderingen in celoverleving zouden helpen het menselijke carcinogeen vermogen van WC-Co te verklaren in vergelijking met zijn individuele componenten, WC en Co. *In vitro* en *in vivo* experimentele toenaderingen werden gecombineerd. In tabel 2 en figuur 3 wordt een overzicht gegeven van de verschillende (geno)toxische *endpoints* die gemeten werden, in de meeste studies Co, CoCl₂, WC en WC-Co vergelijkend.

Tabel 2: (Geno)toxiciteit *endpoints* bepaald in *in vitro* en *in vivo* experimentele tests. +: positief effect; -: geen effect; ±: klein (niet-significant) effect; nd: niet uitgevoerd; FB1: gevoelig voor fumonisin B1 inhibitie; casp: caspase; AM: alveolaire macrofagen; AT-II: type II pneumocyten; BAL: broncho-alveolaire lavage cellen; PBMC: perifeer bloed mononucleaire cellen; Fpg: formamido pyrimidine DNA glycosylase.

	Co	CoCl ₂	WC	WC-Co
<i>In vitro in human PBMC</i>				
DNA breaks and alkali labile sites	±	±	-	++
Fpg sensitive sites	-	nd	-	-
Micronuclei	+	nd	±	++
Chromosome loss	+	+	-	+
Apoptosis	FB1 casp 8 & 9		FB1 casp 9	not FB1 casp 9
DNA repair inhibition	+	nd	±	+
<i>In vitro in rat lung cells</i>				
DNA breaks and alkali labile sites	++ (AT-II) + (AM)	nd	nd	+ (AT-II) ++ (AM)
<i>In vivo in rat lung cells and PBMC</i>				
DNA breaks and alkali labile sites	nd	nd	nd	- (AT-II, BAL, PBMC)
Micronuclei	nd	nd	nd	+ (AT-II) - (PBMC)

Figuur 3: Overzicht van de verschillende gemeten (geno)toxiciteit endpoints



In vitro induceerde WC-Co een dosis- en tijdsafhankelijke verandering in DNA migratie in menselijke PBMC. CoCl₂ induceerde ongeveer dezelfde hoeveelheid schade als Co, maar er werd geen significante toename waargenomen. WC alleen had slecht een marginaal effect op DNA migratie. De inductie van micronuclei door Co, WC en WC-Co was overeenstemmend met hun capaciteit tot het induceren van DNA schade. Co, en op meer uitgesproken wijze WC-Co, zijn clastogeen en/of aneugeen.

Naast CoCl₂ (Resende de Souza Nazareth, 1976; Farah, 1983) levert deze studie het eerste bewijs van het vermogen van andere vormen van kobalt (Co en WC-Co) om chromosoomverlies te induceren in menselijke PBMC, terwijl WC op zich geen effect had.

Het was duidelijk dat de verhoogde genotoxiciteit in termen van DNA migratie en inductie van chromosoom-/genoommutaties geobserveerd voor het WC-Co mengsel niet gelimiteerd was tot deze partikelcombinatie. Andere carbiden (NbC en Cr₃C₂) waren in staat in

interageren met metallische Co-partikels, leidend tot verhoogde genotoxiciteit, die het duidelijkst te zien was in de *in vitro* cytokinesis-block micronucleustest. In het geval van Mo₂C, werd geen verhoogd mutageen effect waargenomen in combinatie met Co. De fysico-chemische interactie met Co leidend tot deze verhoogde genotoxiciteit was niet specifiek voor WC, en is tenminste deels bepaald door de partikeloppervlakte.

Wanneer de *in vitro* genotoxiciteitstests werd uitgebreid naar meer relevante targetcellen, nl. primaire rat alveolaire macrofagen (AM) en type II pneumocyten (ATII), werd het duidelijk dat specifieke celtype eigenschappen een belangrijke rol spelen in hun gevoeligheid voor hard metaal en zijn componenten. Het voordien aangetoonde hoger genotoxisch effect van het WC-Co mengsel werd bevestigd in AM maar niet in AT-II cellen, wat waarschijnlijk verbonden is aan de sterke antioxidant activiteit van dit laatste celtype.

Zoals voordien werd aangetoond voor CoCl₂ (Hartwig et al., 1991; Kasten et al., 1997), waren andere kobalt vormen (Co en WC-Co) of waarschijnlijk de hieruit vrijgekomen Co ionen in staat te interfereren met DNA repair. De kobaltverbindingen veroorzaakten de persistentie van MMS-geïnduceerde DNA schade gedetecteerd met de alkaline comet assay. Inhibitie van DNA repair wordt beschouwd als een co-mutageen effect. Gelijktijdige behandeling van PBMC met MMS en metaalverbindingen leed tot resultaten die wijzen op de aanwezigheid van DNA-proteïne crosslinks en/of inhibitie van het effect van MMS op DNA.

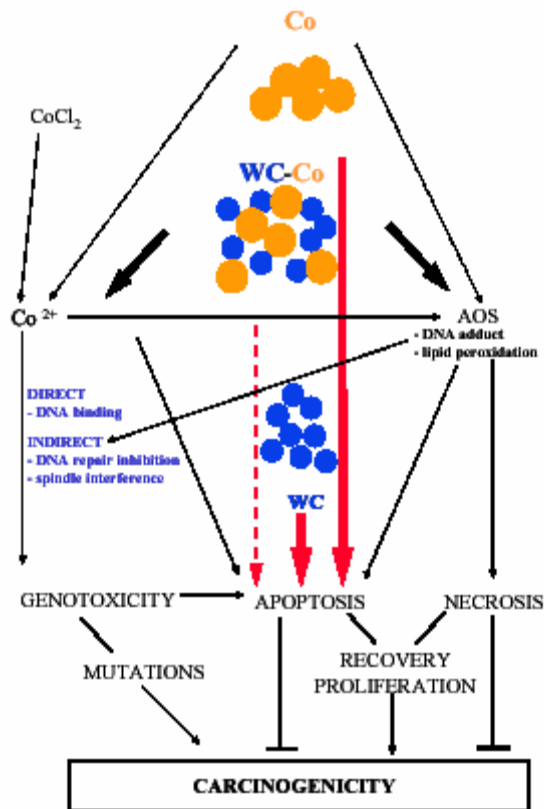
Apoptose werd bepaald via Annexine-V staining, flow cytometrie en de Cell Death ELISA assay. Metallische Co partikels waren in staat om apoptose te induceren *in vitro* in menselijke PBMC; het effect was tenminste deels reproduceerbaar door behandeling met CoCl₂, wat wijst op een mogelijke rol voor Co ionen in het apoptogeen effect. Alhoewel ze totnogtoe als biologische inert beschouwd werden, induceerden WC partikels ook apoptose, maar met een verschillende kinetiek. Na 24 uur blootstelling had WC-Co in vergelijking met zijn individuele componenten een additief effect in de ELISA assay. WC-geïnduceerde apoptose was grotendeels afhankelijk van caspase-9 activatie, terwijl in Co-geïnduceerde apoptose zowel caspase-8 als -9 betrokken was. Apoptose geïnduceerd door het geteste WC-Co mengsel werd grotendeels geïnhibeerd door caspase-9 inhibitor, en resulteerde waarschijnlijk uit de combinatie van WC-specifieke apoptose in monocyten en Co-specifieke apoptose in zowel monocyten als lymfocyten.

Wat de *in vivo* benadering in de rat betreft, induceerden WC-Co partikels micronuclei in mogelijke targetcellen van de alveoli, type II pneumocyten, na één enkele intra-tracheale instillatie. Dit is het eerste bewijs van het *in vivo* mutageen vermogen van hard metaalstof. De grootste toename aan gemicronucleëerde type II pneumocyten vond plaats op de tijd nodig voor deze cellen om één deling te ondergaan. In PBMC van met WC-Co behandelde dieren werden geen toename in DNA migratie en micronucleusfrequenties waargenomen.

Samen beschouwd werden hier de volgende gebeurtenissen geïdentificeerd die een rol spelen in het menselijk carcinogeen vermogen van het WC-Co mengsel: verhoogde *in vitro* genotoxische schade (hogere frequentie aan DNA lesies en chromosoom-/genoommutaties), een lagere maat aan *in vitro* apoptose, het vermogen te interfereren met DNA repair, en het *in vivo* mutageen vermogen in mogelijke targetcellen, type II pneumocyten. Rechtstreekse genotoxische effecten (rechtstreekse binding van Co op DNA), onrechtstreekse genotoxische effecten (productie van DNA- en/of lipide-beschadigende reactieve zuurstofradicalen (AOS), inhibitie van DNA repair, interactie met tubulines leidend tot chromosoomverlies) en verstoring van apoptotische celdood zijn dus, naast de toename aan necrose (cytotoxiciteit) gerapporteerd in de literatuur, allen mechanismen die kunnen bijdragen tot het verhoogd

risico op het ontwikkelen van longkanker na blootstelling aan hard metaal. De relatie tussen de verschillende gemeten *endpoints* en carcinogenese is goed bewezen en laat toe om de bekomen resultaten te beschouwen in het kader van de verschillende mechanismen van het verstoren van celhomeostase (Figuur 4).

Figuur 4: Mogelijke mechanismen betrokken in carcinogenese geïnduceerd door hard metaal.



DNA breuken/alkali labiele sites, chromosoom-/genoommutaties en apoptose werden allen gedetecteerd na 15 minuten *in vitro* behandeling met WC-Co (6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Co-equivalent). Deze periode is lang genoeg om de meerderheid aan AOS vrij te laten, (Lison et al., 1995) en om het grootste deel aan kobalt te solubilizeren (eigen data). Er kan dus afgeleid worden dat de geproduceerde AOS en kobalt ionen verantwoordelijk zijn voor de geobserveerde effecten. Het verschil in effect waargenomen tussen Co en WC-Co zou dan te wijten zijn aan de lagere intensiteit aan AOS (in het geval van Co) aangezien er na 15 minuten ongeveer evenveel ionen beschikbaar waren voor de cellen.

Wolframcarbide (WC) werd lang als biologisch inert beschouwd. In deze studie werd een marginaal, maar niet dosisafhankelijk effect op DNA migratie waargenomen, en hoewel er een toename aan gemicronucleëerde binucleairen werd waargenomen, was deze niet dosisafhankelijk. Er werd geen toename aan centromeer positieve micronuclei (aneugene gebeurtenis) geobserveerd. Daarentegen werd aangetoond dat WC effectief apoptose induceert, voornamelijk door activatie van caspase 8. Zijn effect op DNA repair inhibitie was twijfelachtig. Hoewel WC geen cytotoxiciteit (necrose) veroorzaakt (Lison & Lauwers, 1990), zou zijn apoptogene vermogen toch gewone weefselhomeostase kunnen beïnvloeden, en dus potentieel schadelijk zijn. Het zou nuttig kunnen zijn te zoeken naar een alternatieve

samenstelling van hard metaalstof, met gelijkaardige technische karakteristieken, maar met geen of zeer gelimiteerde gevaarlijke effecten.

IV.3. Biomonitoring studies

Ioniserende stralen (Aka et al., Radiation Research, submitted)

Het doel van deze studie was om het verband te onderzoeken hOgg1, XRCC1, XRCC3 genotypes en het *in vitro* DNA strengbreuk repair fenotype in populaties and individu's blootgesteld aan lage dosissen gammastralen, en om de belangrijkste determinanten van genotoxiciteit te bepalen na blootstelling aan een lage dosis ioniserende stralen.

De genotype frequenties voor hOgg1, XRCC1 en XRCC3 (zie tabel 3) komen overeen met waarden in de literatuur voor Caucasische populaties, en de allelfrequenties verschillen niet significant van het Hardy-Weinberg evenwicht.

Tabel 3: Distributie van hOGG1, XRCC1 en XRCC3 genotypes in de studiepopulaties.

Gene	Genotype	Controls (%)	Exposed (%)	Total (%)
hOGG1³²⁶	Ser/Ser	22 (71)	17 (53)	39 (62)
	Ser/Cys	09 (29)	13 (41)	22 (35)
	Cys/Cys	00 (00)	02 (06)	02 (03)
XRCC1¹⁹⁴	Arg/Arg	30 (97)	26 (84)	56 (90)
	Arg/Trp	01 (03)	05 (16)	06 (10)
XRCC1²⁸⁰	Arg/Arg	30 (97)	28 (90)	58 (93)
	Arg/His	01 (03)	03 (10)	04 (07)
XRCC1³⁹⁹	Arg/Arg	10 (32)	13 (43)	23 (38)
	Arg/Gln	17 (55)	10 (33)	27 (44)
	Gln/Gln	04 (13)	07 (24)	11 (18)
XRCC3²⁴¹	Thr/Thr	13 (42)	15 (48)	28 (45)
	Thr/Met	16 (52)	10 (32)	26 (42)
	Met/Met	02 (06)	06 (20)	08 (13)

De link tussen genotype en genotoxische *endpoints* als resultaat van blootstelling aan ioniserende stralen is relatief duidelijk.

1. hOGG1³²⁶ en XRCC1²⁸⁰ blijken de repair te beïnvloeden van oxidatieve base en enkelstrengige breuken gedetecteerd met de alkaline comet assay en het *in vitro* repair fenotype bepaald met dezelfde methode.
2. XRCC1²⁸⁰ beïnvloedt de inductie van dubbelstrengige breuken uitgedrukt als MNMC in mononucleaire perifere bloed lymfocyten (PBMC) in de cytochalasine-B micronucleus assay.

3. XRCC3²⁴¹ beïnvloedt de repair van dubbelstrengige breuken uitgedrukt als MNCB in binucleaire PBMC cytochalasine-B micronucleus assay.

Deze data wijst erop dat, naast dubbelstrengige breuken, de enkelstrengige breuken geïnduceerd door ioniserende stralen die niet hersteld werden door base excisie (deficiëntie van hOgg1 en/of XRCC1) gerepliceerd worden tot dubbelstrengige breuken gedurende de volgende S-fase, welke indien deze op hun beurt niet hersteld worden (deficiëntie van XRCC3) aanleiding geven tot micronuclei in de volgende mitose. Op basis van deze resultaten is het niet mogelijk een enkel genotype te selecteren voor het voorspellen van de individuele susceptibiliteit voor ioniserende stralen. Een combinatie van de drie genotyperingen voor hOgg1, XRCC1 en XRCC3 polymorfismen is aangeraden. Als alternatief of bijkomend, wordt het *in vitro* DNA strengbreuk fenotype, dat verschillende repair pathways integreert, aangeraden.

In de bestudeerde populatie induceerde een blootstelling aan een gemiddelde cumulatieve dosis van 15.7 ± 8.0 mSv geen significante genotoxische effecten. Alhoewel een, iets hogere frequentie aan TD, MNCB en MNMC geobserveerd werd in de blootgestelde arbeiders vergeleken met de controle arbeiders, was dit niet statistisch significant. Identificatie van MN ontstaan uit chromosoom breuken door FISH (Fluorescentie In Site Hybridisatie) met pericentromerische probes zou een gevoeliger assay kunnen geweest zijn. Anderzijds, wijst de studie van repair efficiëntie met de *in vitro* challenging met ioniserende stralen erop dat de *in vivo* blootgestelde arbeiders hun DNA schade meer efficiënt herstelden dan de controle arbeiders. Dit zou te wijten kunnen zijn aan de inductie van repair enzymen (adaptieve respons) tijdens subchronische blootstelling aan lage dosissen ioniserende stralen.

Ten laatste moet men benadrukken dat arbeiders met variant hOGG1³²⁶ of XRCC3²⁴¹ genotypes die ook roken een hoger risico lopen voor inductie van respectievelijk DNA schade of MN. Deze arbeiders die roken en blootgesteld zijn aan ioniserende stralen vertegenwoordigen een specifieke populatie die een strengere medische surveillance vereisen door hun verhoogd mutageen/carcinogeen risico.

Kobalt (Mateuca et al., in preparation)

De potentiële genotoxische effecten van Co-bevattend stof in arbeiders momenteel blootgesteld aan de TLV-TWA ($20 \mu\text{g}/\text{m}^3$) voor kobaltpartikels alleen of in associatie met carbidepartikels in hard metaal (WC-Co) werd bestudeerd door het bepalen van 8-OHdG in urine, en de comet assay en *ex vivo/in vitro* micronucleus test in PBMC (De Boeck et al., 2000a). Er werd geen significante toename aan genotoxische effecten waargenomen in arbeiders blootgesteld aan kobalt-bevattend stof in vergelijking met controles. Multipole regressie analyse wees er echter op dat arbeiders die rookten en blootgesteld waren aan hard metaalstof verhoogde 8-OHdG en MN waarden hadden. Er werd geconcludeerd dat deze groep van arbeiders een grondiger medische surveillance vereisten.

Deze studie had als doel het bepalen of genetische polymorfismen bij dit blootstellingsgehalte zouden kunnen bijdragen tot het verklaren van bijzonder hoge of lage genotoxische effecten, wat een verbetering zou verschaffen voor preventie op individueel niveau. Aangezien onze mechanistische studies de rol aantoonde van oxidatieve schade en DNA strand breakage in de inductie van genotoxische effecten van Co verbindingen, selecteerden we verschillende DNA repair polymorfismen betrokken in de repair van door Co geïnduceerde DNA lesies. De predictiviteit van DNA repair genotypes op genotoxische effecten werden geanalyseerd door het vergelijken van de genotoxische effecten van elk genotype in blootgestelden versus

controles en door multipele regressie analyse, rekening houdend met leeftijd, blootstellingstype, rookgedrag, en interactie tussen genotypes, rookgedrag en blootstelling.

1) Genotype frequenties in blootgestelde en controle arbeiders

De frequenties van de geobserveerde genotypes voor de hOGG1, XRCC1 en XRCC3 genen zijn samengevat in tabel 4.

Tabel 4 a. Distributie van hOGG1, XRCC1 en XRCC3 genotypes in arbeiders blootgesteld aan Co en matched controles

Gene	Genotype	Control (%)	Exposed (%)	Total (%)
hOGG1	<i>Ser/Ser</i>	10 (66)	15 (68)	25 (68)
	<i>Ser/Cys</i>	4 (27)	6 (27)	10 (27)
	<i>Cys/Cys</i>	1 (7)	1 (5)	2 (5)
XRCC1 194	<i>Arg/Arg</i>	14 (93)	18 (82)	32 (86)
	<i>Arg/Trp</i>	1 (7)	4 (18)	5 (14)
	<i>Trp/Trp</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
XRCC1 280	<i>Arg/Arg</i>	14 (93)	20 (91)	34 (92)
	<i>Arg/His</i>	1 (7)	1 (5)	2 (5)
	<i>His/His</i>	0 (0)	1 (4)	1 (3)
XRCC1 399	<i>Arg/Arg</i>	6 (40)	10 (46)	16 (43)
	<i>Arg/Gln</i>	6 (40)	6 (27)	12 (33)
	<i>Gln/Gln</i>	3 (20)	6 (27)	9 (24)
XRCC3 241	<i>Thr/Thr</i>	3 (20)	7 (32)	10 (27)
	<i>Thr/Met</i>	8 (53)	9 (41)	17 (46)
	<i>Met/Met</i>	4 (27)	6 (27)	10 (27)

Tabel 4 b. Distributie van hOGG1, XRCC1 en XRCC3 genotypes in arbeiders blootgesteld aan WC-Co en matched controles

Gene	Genotype	Control (%)	Exposed (%)	Total (%)
hOGG1	<i>Ser/Ser</i>	5 (42)	15 (56)	20 (51)
	<i>Ser/Cys</i>	6 (50)	10 (37)	16 (41)
	<i>Cys/Cys</i>	1 (8)	2 (7)	3 (8)
XRCC1 194	<i>Arg/Arg</i>	12 (100)	26 (96)	38 (97)
	<i>Arg/Trp</i>	0 (0)	1 (4)	1 (3)
	<i>Trp/Trp</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
XRCC1 280	<i>Arg/Arg</i>	11 (92)	25 (93)	36 (92)

	<i>Arg/His</i>	1 (8)	2 (7)	3 (8)
	<i>His/His</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
XRCC1 399	<i>Arg/Arg</i>	1 (8)	10 (37)	11 (28)
	<i>Arg/Gln</i>	8 (67)	13 (48)	21 (54)
	<i>Gln/Gln</i>	3 (25)	4 (15)	7 (18)
XRCC3 241	<i>Thr/Thr</i>	6 (50)	16 (59)	22(56)
	<i>Thr/Met</i>	5 (42)	9 (33)	14 (36)
	<i>Met/Met</i>	1 (8)	2 (8)	3 (8)

2) Vergelijking van de genotoxische effecten van elk genotype in blootgestelden versus controles

In de kobalt studie werd geen significant verschil gevonden tussen controles en blootgestelde arbeiders voor geen enkel genotype. In de WC-Co studie waren micronuclei frequenties (MNCB) significant hoger in blootgestelde arbeiders met Arg/Arg genotypes voor XRCC1¹⁹⁴ of XRCC1²⁸⁰ dan in de overeenkomstige controles met hetzelfde genotype ($p = 0,021$ and $p = 0,035$, respectievelijk). Significante verschillen tussen genotypes van dezelfde genen werden gevonden voor XRCC1³⁹⁹ en TD van de kobalt controles (het Gln/Gln genotype was gevoeliger), voor hOGG1 en MNMC van de aan WC-Co blootgestelde populatie (het Ser/Cys genotype was meer gevoelig), en XRCC3 en 8-OHdG van de aan WC-Co blootgestelde populatie (het Met/Met genotype was gevoeliger).

3) Multipelle regressie analyse

Wanneer de blootgestelde populaties werden vergeleken met hun overeenkomstige controle populatie, enkel rekening houdend met de significante onafhankelijke variabelen ($p < 0.05$), toonde de multipelle regressie analyse dat:

- in arbeiders blootgesteld aan Co alleen wordt TD bepaald door de interactie tussen XRCC1 (280 and 194) en hOGG1, de interactie tussen rookgedrag en blootstelling, en de interactie tussen XRCC1¹⁹⁴ en rookgedrag. MNCB wordt bepaald door het rookgedrag, en MNMC door hOGG1. Het niveau aan 8-OHdG wordt bepaald door de interactie tussen XRCC1³⁹⁹ en hOGG1, en de leeftijd.
- in arbeiders blootgesteld aan WC-Co wordt TD bepaald door de interactie tussen XRCC1²⁸⁰ en hOGG1. MNCB wordt bepaald door de blootstellingstatus. MNMC wordt bepaald door de interactie tussen XRCC3²⁴¹ en hOGG1, en het rookgedrag. Het niveau aan 8-OHdG wordt bepaald door de interactie tussen blootstelling en rookgedrag, de interactie tussen XRCC1³⁹⁹ en rookgedrag, en XRCC3²⁴¹.

Wanneer de respectievelijke blootgestelde groepen vergeleken worden met de gecombineerde controlepopulatie, toont de multipelle regressie analyse dat:

- in arbeiders blootgesteld aan Co alleen wordt TD bepaald door de interactie tussen XRCC1²⁸⁰ en hOGG1. MNCB wordt bepaald door de interactie tussen XRCC1¹⁹⁴ en rookgedrag, en de interactie tussen XRCC3²⁴¹ en rookgedrag. MNMC wordt bepaald door de leeftijd, concentratie aan Co in de urine, de interactie tussen blootstelling en

rookgedrag, de interactie tussen rookgedrag en hOGG1, en hOGG1. Het niveau aan 8-OHdG wordt bepaald door de interactie tussen XRCC1³⁹⁹ en hOGG1, de interactie tussen rookgedrag en hOGG1, de interactie tussen XRCC1³⁹⁹ en blootstelling, en XRCC1³⁹⁹.

- in arbeiders blootgesteld aan WC-Co wordt TD bepaald door de interactie tussen XRCC1²⁸⁰ en hOGG1. MNMC wordt bepaald door de interactie tussen XRCC3²⁴¹ en hOGG1 en de interactie tussen blootstelling en rookgedrag. Het niveau aan 8-OHdG wordt bepaald door de interactie tussen XRCC3²⁴¹ en blootstelling, en XRCC1³⁹⁹.

Styreen (Godderis et al., Environmental and Molecular Mutagenesis, submitted)

In deze studie werd een set van biomerkers toegepast op werkers om te evalueren of lage beroepsblootstelling aan styreen genotoxische effecten kan veroorzaken, en om de invloed van individuele susceptibiliteit op het verband tussen blootstelling aan styreen en genotoxische effecten te onderzoeken. De gemiddelde blootstelling aan styreen was laag (9.5 ppm ± 9.6) in vergelijking met de huidige ACGIH TLV-TWA voor styreen van 20 ppm.

Genotypering werd uitgevoerd voor DNA repair genen en voor verschillende genen die coderen voor enzymes betrokken in styreen metabolisatie.

Tabel 5: Distributie van GSTT1, GSTM1, EPHX1, CYP2E1, NAT2, hOGG1, XRCC1 en XRCC3 genotypes

		Referents			Exposed			All		
GST	GSTT1	+	-		+	-		+	-	
		36(84%)	7 (16%)		37(84%)	7 (16%)		73(84%)	14(16%)	
	GSTM1	+	-		+	-		+	-	
		25(58%)	18(42%)		16(36%)	28(64%)		41(47%)	46(53%)	
EPHX	EPHX1	Tyr/Tyr	Tyr/His	His/His	Tyr/Tyr	Tyr/His	His/His	Tyr/Tyr	Tyr/His	His/His
	113	17(40%)	24(56%)	2 (4.7%)	23(52%)	15(34%)	6 (14%)	40(46%)	39(45%)	8 (9%)
	EPHX1	Arg/Arg	His/Arg	His/His	Arg/Arg	His/Arg	His/His	Arg/Arg	His/Arg	His/His
	139	1 (2%)	13(30%)	29(67%)	1 (2%)	13(30%)	30(68%)	2 (2%)	26(30%)	59(68%)
CYP2E1	Intron	D/D	D/C	C/C	D/D	D/C	C/C	D/D	D/C	C/C
	1	6 DraI	33(80%)	8 (20%)	0 (0%)	33(75%)	10(23%)	1 (2%)	66(78%)	18(21%)
Nat2	Allele 4	Present	Absent		Present	Absent		Present	Absent	
		22(52%)	20(48%)		20(48%)	22(52%)		42(50%)	42(50%)	

hOGGI	hOGGI	Ser/Ser	Ser/Cys	Cys/Cys	Ser/Ser	Ser/Cys	Cys/Cys	Ser/Ser	Ser/Cys	Cys/Cys
	326	28(65%)	15(35%)	0 (0%)	24(57%)	18(43%)	0 (0%)	52(61%)	33(39%)	0 (0%)
XRCCI	XRCCI	Arg/Arg	Arg/Trp	Trp/Trp	Arg/Arg	Arg/Trp	Trp/Trp	Arg/Arg	Arg/Trp	Trp/Trp
	194	34(77%)	10(23%)	0 (0%)	35(83%)	7 (17%)	0 (0%)	69(80%)	17(20%)	0 (0%)
	XRCCI	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln
	399	22(50%)	16(36%)	6 (14%)	13(31%)	20(48%)	9 (21%)	35(41%)	36(42%)	15(17%)
	XRCCI	Arg/Arg	Arg/His	His/His	Arg/Arg	Arg/His	His/His	Arg/Arg	Arg/His	His/His
	280	41(95%)	2 (5%)	0 (0%)	42(95%)	2 (5%)	0 (0%)	83(95%)	4 (5%)	0 (0%)
XRCC3	XRCC3	Thr/Thr	Thr/Met	Met/Met	Thr/Thr	Thr/Met	Met/Met	Thr/Thr	Thr/Met	Met/Met
	241	16(37%)	20(47%)	7 (16%)	17(40%)	18(43%)	7 (17%)	33(39%)	38(45%)	14(16%)

Correlatie- en regressieanalyse toonden een positieve associatie aan tussen TD en chroom concentratie (allen onder de huidige BEI-TLV van 30 µg/g Cr). De blootstelling aan chroom van de referentiegroep is waarschijnlijk afkomstig van een combinatie van sigarettenrook en voeding, aangezien er geen significante blootstelling aan chroom kon waargenomen worden gedurende het productieproces. Aangezien de referentiegroep een hogere chroomconcentratie had dan de blootgestelde groep, en aangezien de TD in de comet assay in deze studie afhangt van zowel styreen-adduct vorming als blootstelling aan chroom, zou deze vaststelling kunnen helpen verklaren dat er geen significant verschil in TD waardes was tussen de blootgestelde en niet-blootgestelde populaties.

Frequenties van MNMC, MNCB en MN in nasale cellen verschilden significant tussen de blootgestelde referentiegroep. We konden ook het effect van leeftijd op MN frequenties (MNCB) bevestigen. De MNMC en MNCB frequenties waren hoger in rokers in vergelijking met niet-rokers in de blootgestelde populatie. MNMC en MNCB bleken ook beide geïnduceerd te worden na lange blootstelling aan styreen. De positieve associatie tussen duur van tewerkstelling en MNMC en MNCB frequenties in onze studie bevestigt het feit dat MN frequenties goede biomerkers zijn voor geaccumuleerde chromosomale schade (Kirsch-Volders and Fenech, 2001).

Lymfocyten van niet-rokende arbeiders blootgesteld aan styreen vertoonden een hoger niveau aan residuele DNA schade na 24 uur *in vitro* repair van door styreen oxide geïnduceerde DNA schade dan de niet-rokerende referenten. Bovendien steeg de residuele DNA schade gevonden na 24 uur met de duur van tewerkstelling in een omgeving met styreen. Daarentegen bleek *in vitro* DNA repair na 1 uur verhoogd te zijn door recente blootstelling aan styreen en alcohol. De verschillen in vroeg en laat DNA strengbreuk repair fenotype zouden te wijten kunnen zijn aan verschillende lesies en verschillende repair mechanismen die deze herstellen. Vroege repair betreft vooral de excisie kan kleine lesies zoals geoxideerd

basen en niet-bulky adducten door hOgg1 (Lu et al., 2001). In onze studie vonden we een invloed van de hOgg1 polymorfismen op het vroege DNA strengbreuk repair fenotype in de referentiepopulatie. Individu's met twee hOGG1 Ser³²⁶ allelen vertoonden minder residuele DNA schade dan individu's in het bezit van een hOGG1 Cys³²⁶ allel. Na excisie in een latere fase wordt de abasische site hersteld door endonuclease activiteit, verwijdering van het suikerresidu, DNA synthese gebruik makend van de andere streng als template, en ligatie (Goode et al., 2002). XRCC1 is een groep enzymen betrokken in deze fase. Eerder werd gesteld dat polymorfismen in base excisie repair enzymen belangrijk zijn voor het verwijderen van door styreen geïnduceerde alkyl-DNA adducten en door γ -straling geïnduceerde DNA schade (Dypbukt et al., 1992, Wood et al., 2001). De vroege *in vitro* repair capaciteit in onze studie was verlaagd in individu's met het XRCC1 His²⁸⁰ allel. Tuimala et al. deden verslag van verhoogde frequenties aan *in vitro* bleomycine-geïnduceerde chromatidebreuken in lymfocyten van individu's met het XRCC1 His²⁸⁰ allel (Tuimala et al., 2002). Deze bevindingen moeten echter voorzichtig geïnterpreteerd worden, en vereisen verdere opheldering aangezien individu's met deze XRCC1 codon 280 variant slechts zelden voorkomen (5% in onze studiepopulatie). In onze studie vertoonden individu's met het XRCC1 Arg¹⁹⁴ allel een verlaagde *in vitro* DNA strengbreuk repair capaciteit. Anderzijds leek het polymorfisme op XRCC1 codon 194 de resultaten van de genotoxiciteitsassay niet te beïnvloeden.

Frequenties aan MNMC en MNCB waren lager in individu's met één of twee XRCC1 Gln³⁹⁹ allelen. De invloed van XRCC1 polymorfismen op genotoxische effecten na beroepsblootstelling aan ioniserende stralen (zie IV.3.a.) bevestigt deze resultaten.

Individu's die GSTT1 negatief zijn, vertoonden hogere residuele DNA schade na 1 uur repair van door styreen oxide geïnduceerde schade. Dit betekent dat styreen oxide minder efficiënt gedetoxificeerd werd en zo meer DNA schade veroorzaakte, die meer en langer durende repair vereist. GSTT1 activiteit speelt een rol in de metabolisatie van styreen. Hoewel glutathion conjugatie slechts als een secundaire route voor styreen oxide detoxificatie beschouwd wordt, blijkt het toch de resultaten van genotoxiciteitsassay te beïnvloeden (Haufroid et al., 2002, Shield and Sanderson, 2001). In onze studie vertoonden niet-blootgestelde GSTM1 negatieve referenten ook hogere MNMC frequenties dan GSTM1 positieve referenten.

We vonden een invloed van de EPHX1 polymorfismen in exon 3 en exon 4 op de genotoxische effecten in de blootgestelde populatie. De aanwezigheid van een His¹³⁹ allel in aan styreen blootgestelde individu's was geassocieerd met een verhoogde MNMC frequentie. Hogere frequenties aan MN in nasale cellen werden waargenomen in individu's die één of meer His¹¹³ allelen bezitten. Onze data kon geen associatie aantonen tussen EPHX1 activiteit en TD.

IV.4. Exploratorische benadering van de DNA array microchips technologie voor genotypering en fenotypering in de arbeidsgeneeskunde

Zie het UCL (promotor D. Lison) deel van dit verslag.

IV.5. Studie van de ethische en wettelijke implicaties van het gebruik van susceptibiliteitstesten in arbeidsgeneeskunde

Gedurende dit programma waren we constant in contact met de juristen partners van de UCL (promotor P. Vielle), en uitwisseling van informatie en meningen vond plaats tijdens verschillende meetings.

V. BESPREKING

Het doel van het onderzoek verricht door het laboratorium voor Cellulaire Genetica was het evalueren van de predictiviteit van genotypering voor DNA repair genen en fenotypering voor single strand break DNA repair (samen met genotypering voor relevante metabolisatie genen) voor genotoxische effecten in arbeiders blootgesteld aan mutagenen/carcinogenen.

Dit werd toegepast op drie beroepsblootstellingen: lage chronische blootstelling aan ioniserende stralen (arbeiders in een kerncentrale), styreen, en kobaltbevattend stof. Deze studies waren uitgevoerd in samenwerking met onze collega's van respectievelijk de RUG, KUL en UCL.

In een eerste aanpak werden de validatie van de genotoxiciteitsbiomerkers (comet assay, micronucleus assay) uitgevoerd), methodologieën voor genotypering van Base Excisie Repair genen (hOgg1, XRCC1) en double strand DNA break repair (XRCC3) ontwikkeld, en werd de toepasbaarheid van de comet assay voor de *in vitro* fenotypering van strand break repair bepaald.

De keuze van adequate biomerkers voor arbeiders blootgesteld aan styreen en ioniserende stralen was goed gekend uit de literatuur, maar niet voor kobalt and wolframcarbide in combinatie met kobalt. Daarom werden mechanistische studies uitgevoerd om te bepalen welke cytogenetische effecten geïnduceerd worden *in vitro* in menselijke lymfocyten en *in vivo* in rat longcellen door kobalt alleen, of kobalt in combinatie met wolframcarbide. Deze studies, samengevat in het doctoraat van Marlies De Boeck, toonden aan dat tail DNA bepaald door de comet assay en micronucleï bepaald door de cytochalasine-B assay gevoelige biomerkers zijn voor blootstelling aan kobaltbevattend stof.

De predictiviteit van de genotypering an fenotypering voor genotoxische effecten in beroepsblootgestelde individu's kan als volgt samengevat worden:

1. Kerncentrale arbeiders

De link tussen genotype en genotoxische *endpoints* als resultaat van blootstelling aan ioniserende stralen is relatief duidelijk.

1.1.hOGG1³²⁶ en XRCC1²⁸⁰ blijken de repair te beïnvloeden van oxidatieve base en enkelstrengige breuken gedetecteerd met de alkaline comet assay en het *in vitro* repair fenotype bepaald met dezelfde methode.

1.2.XRCC1²⁸⁰ beïnvloedt de inductie van dubbelstrengige breuken uitgedrukt als MNMC in mononucleaire perifeer bloed lymfocyten (PBMC) in de cytochalasine-B micronucleus assay.

1.3. XRCC3²⁴¹ beïnvloedt de repair van dubbelstrengige breuken uitgedrukt als MNCB in binucleaire PBMC cytochalasine-B micronucleus assay.

Deze data wijst erop dat, naast dubbelstrengige breuken, de enkelstrengige breuken geïnduceerd door ioniserende stralen die niet hersteld werden door base excisie (deficiëntie van hOgg1 en/of XRCC1) gerepliceerd worden tot dubbelstrengige breuken gedurende de volgende S-fase, welke indien deze op hun beurt niet hersteld worden (deficiëntie van XRCC3) aanleiding geven tot micronuclei in de volgende mitose.

Op basis van deze resultaten is het niet mogelijk een enkel genotype te selecteren voor het voorspellen van de individuele susceptibiliteit voor ioniserende stralen. Een combinatie van de drie genotyperingen voor hOgg1, XRCC1 en XRCC3 polymorfismen is aangeraden. Als alternatief of bijkomend, wordt het in vitro DNA strengbreuk fenotype, dat verschillende repair pathways integreert, aangeraden.

In de bestudeerde populatie induceerde een blootstelling aan een gemiddelde cumulatieve dosis van 15.7 ± 8.0 mSv geen significante genotoxische effecten. Alhoewel een, iets hogere frequentie aan TD, MNCB en MNMC geobserveerd werd in de blootgestelde arbeiders vergeleken met de controle arbeiders, was dit niet statistisch significant. Identificatie van MN ontstaan uit chromosoom breuken door FISH (Fluorescentie In Site Hybridisatie) met pericentromerische probes zou een gevoeliger assay kunnen geweest zijn. Anderzijds, wijst de studie van repair efficiëntie met de *in vitro* challenging met ioniserende stralen erop dat de *in vivo* blootgestelde arbeiders hun DNA schade meer efficiënt herstelden dan de controle arbeiders. Dit zou te wijten kunnen zijn aan de inductie van repair enzymen (adaptieve respons) tijdens subchronische blootstelling aan lage dosissen ioniserende stralen.

Ten laatste moet men benadrukken dat arbeiders met variant hOGG1³²⁶ of XRCC3²⁴¹ genotypes die ook roken een hoger risico lopen voor inductie van respectievelijk DNA schade of MN. Deze arbeiders die roken en blootgesteld zijn aan ioniserende stralen vertegenwoordigen een specifieke populatie die een strengere medische surveillance vereisen door hun verhoogd mutageen/carcinogeen risico.

2. Kobalt/hard metaal arbeiders

Bevestiging op grotere populaties is nodig voor men definitieve conclusies kan trekken. Als voornaamste bevindingen kunnen we stellen dat:

- Arbeiders met een Arg/Arg genotype voor XRCC1¹⁹⁴ of XRCC1²⁸⁰ die blootgesteld zijn aan WC-Co zouden een hoger risico hebben op inductie van micronucleï, en dus op kanker.
- TD wordt op significante wijze bepaald door de interactie tussen hOGG1 en XRCC1²⁸⁰, in zowel de aan Co als aan WC-Co blootgestelde arbeiders, wat bevestigt dat de Base Excision Repair pathway van oxidatieve schade wordt getriggerd door blootstelling aan kobalt-bevattend stof.
- MNMC worden bepaald door hOGG1 in aan kobalt blootgestelde arbeiders maar niet in aan WC-Co blootgestelde arbeiders; daarentegen is de interactie tussen hOGG1 en XRCC3 enkel significant in de aan WC-Co blootgestelde arbeiders. Dit zou erop kunnen wijzen dat *double strand breakage* meer frequent voorkomt in arbeiders blootgesteld aan WC-Co dan arbeiders blootgesteld aan Co.

- MNCB wordt op significante wijze beïnvloedt door de interactie tussen roken en XRCC1¹⁹⁴ /XRCC3 in aan kobalt blootgestelde arbeiders.
- Het niveau aan 8-OHdG in urine is positief gecorreleerd met de interactie tussen hOGG1 en XRCC1³⁹⁹, en negatief gecorreleerd met XRCC1³⁹⁹ in aan kobalt blootgestelde arbeiders. Dit kon verwacht worden, aangezien hoe efficiënter de repair van oxidatieve schade is, hoe meer geoxideerde basen er in de urine worden teruggevonden. Dit betekent echter dat 8-OHdG in urine enkel een onrechtstreekse maat voor blootstelling is.

Deze resultaten wijzen erop dat polymorfismen voor genen die coderen voor repair enzymen die in staat zijn geoxideerde basen (hOgg1), single stranded DNA breaks (XRCC1) en double stranded DNA breaks (XRCC3) te herstellen, betrokken zijn in de variatie van de omvang van genotoxische effecten in arbeiders blootgesteld aan kobalt-bevattend stof. Interacties tussen deze polymorfismen blijken belangrijk te zijn, daarom kan niet één genotypering in het bijzonder worden aangeraden.. Bovendien blijkt de interactie met roken een belangrijke factor, wat niet verbazend is aangezien roken zelf oxidatieve schade kan induceren.

3. Styreen arbeiders

De studie over arbeiders blootgesteld aan styreen en matched referentie-arbeiders werd uitgevoerd om het belang na te gaan van genetische polymorfismen in biotransformatie en DNA repair enzymen op N-terminale Hb-adducten en genotoxische effecten.

Frequenties aan micronucleï (MNMC en MNCB) in lymfocyten en in nasale cellen verschilden op significante wijze tussen de blootgestelde en referentiegroep. Individu's met een hoog niveau aan terminal valine-adducten vertoonden hogere TD waarden zoals geëvalueerd met de comet assay. De *in vitro* strand break repair capaciteit na 24 u was minder efficiënt in lymfocyten van niet-rokende styreen arbeiders. De duur van tewerkstelling in een omgeving met styreen was positief geassocieerd met de meeste resultaten van de genotoxiciteitsassays (MNMC, MNCB, RD 24 u). de invloed van genetische polymorfismen van metaboliserende en repair enzymen op de Hb-adducten en genotoxiciteitstests werd ook bestudeerd. Handlaminatoren met één of meerdere EPHX1 His¹¹³ allelen vertoonden hogere frequenties aan micronucleï in nasale cellen dan homozygote EPHX1 Tyr¹¹³ individu's. hogere frequenties aan micronucleï in mononucleaire cellen waren geassocieerd met de aanwezigheid van het EPHX1 His¹³⁹ allel. Individu's met één of meerdere XRCC1 Gln³⁹⁹ allelen vertoonden hogere frequenties aan MNMC en MNCB. Analyse van de *in vitro* DNA strand break repair fenotype data toonden een snellere aanvang van DNA repair na 1 uur aan in individu's heterozygoot voor XRCC1 Arg²⁸⁰ en individu's met GSTT1. In individu's homozygoot voor XRCC1 Arg¹⁹⁴ werd hogere residuele DNA schade na 24 uur blootstelling aan styreen oxide waargenomen dan in heterozygote individu's.

*Als besluit kan men stellen dat onze data suggereert dat chromosoom-/genoommutaties gevormd worden in arbeiders blootgesteld aan lage concentraties styreen. De duur van de blootstelling, leeftijd en rookgewoontes zijn belangrijke variabelen die men moet beschouwen in studies die de genotoxische effecten op arbeiders evalueren. Genotypering van metaboliserende en DNA repair enzymen is nuttig voor het bepalen van individueel risico voor styreen. Het *in vitro* DNA strand break repair fenotype zou een belangrijke methode kunnen zijn om de repair capaciteit van arbeiders in te schatten.*



Promotor: Prof. Dr. H. Veulemans

Wetenschappelijk medewerkers: Lode Godderis, MD
Nadine Van Nimmen

Katholieke Universiteit Leuven
Faculteit Geneeskunde
Laboratorium voor Arbeidshygiëne en Toxicologie

1. Invloed van genetische polymorfismes op biomarkers en genotoxische effecten in werknemers blootgesteld aan styreen.

1.1. Inleiding

1.1.1. Context en kader van het onderzoek

Het kanker risico wordt momenteel hoofdzakelijk bepaald d.m.v. epidemiologie en onderzoek van blootstelling-effect relaties (vb. genotoxiciteit testen) op groepsniveaus. Toch wordt het duidelijk dat individuele karakteristieken een invloed hebben op deze relaties en blijken bovendien een significante rol te spelen bij de ontwikkeling van een kanker. Daarom is het belangrijk om bij de bepaling van het kanker risico van werknemers blootgesteld aan lage concentraties van kankerverwekkende stoffen, rekening te houden het genotype en fenotype van de enzymen betrokken bij het metabolisme en DNA herstel (Mohrenweiser et al. 2003; Mutti 1999).

Styreen veroorzaakt genotoxische schade voornamelijk door de vorming van styreen oxide (SO). Styreen wordt verdacht om mogelijk lymfo-hematopoëtische kankers te veroorzaken (Kogevinas et al. 1994; Kolstad et al. 1994). Het metabolisme van styreen bij de mens is goed gekend (Sumner and Fennell 1994). De eerste stap in het metabolisme is de vorming van het styreen 7,8-oxide (SO) d.m.v. een cytochroom P450 gemedieerd monooxygenase systeem (CYP). SO wordt vervolgens gehydrateerd tot styreen glycol d.m.v. microsomaal epoxide hydrolase (EPHX1) of geconjugeerd met glutathion in een enzyme gekatalyseerde reactie (glutathion S-transferases, GST). Verschillende studies hebben reeds het belang aangetoond van individuele variabiliteit in de styreen biotransformatie enzyme activiteit (Vodicka et al. 2001; Vodicka et al. 2002). DNA herstel enzyme polymorfismes, met name deze betrokken bij het herstel van oxidatieve schade en/of alkyl adducten, zijn belangrijk voor de bepaling van het individueel kanker risico (Maki-Paakkanen et al. 1991; Marczyński et al. 2000). Verschillende genetische polymorfismes van DNA herstel enzymen zijn reeds beschreven (Hu et al. 2002). hOGG1 is betrokken in het “base excision” herstel van 8-oxoguanine oxidatieve schade. Het XRCC1 herstel systeem speelt ook een belangrijke rol in het “base excision” herstel en het bijeenbrengen van de DNA keten breuken. Drie polymorfismes zijn beschreven voor *XRCC1* (*Arg194Trp*, *Arg280His*, and *Arg399Gln*) (Tuimala et al. 2002). *XRCC3* is betrokken bij het “homologous recombinational” herstel van “cross-links” en chromosomale dubbele DNA ketenbreuken (Brenneman et al. 2000).

1.1.2. Doelstellingen van het onderzoek

De doelstellingen van het huidig onderzoek waren: 1) Evalueren of lage concentraties van styreen genotoxische effecten induceren d.m.v. de toepassing van goed gevalideerd methodes voor de bepaling van de blootstelling en genotoxische effecten; 2) Onderzoeken of individuele verschillen in genotoxiciteit kan worden verklaard door de genetische polymorfismes voor de genen die coderen voor enzymen betrokken bij het styreen metabolisme en/of DNA herstel.

1.2. Methode

1.2.1. Steekproef

De studie werd uitgevoerd in 2000-2001 en was een samenwerking tussen de KUL, VUB and UCL. Mannelijke arbeiders blootgesteld aan styreen (n=44) werden geselecteerd uit een bedrijf waar styreen werd gebruikt in de productie van plastic containers. Een referentie groep van 44 mannelijke productie arbeiders werd gezocht in twee bedrijven uit dezelfde regio. Een inspanning werd gedaan om de blootgestelde en de controlegroep te matchen voor leeftijd (41.6 ± 9.6 , 40.9 ± 9.0), rookgewoontes (48% rokers in beide groepen), socio-economische status en etniciteit (allemaal Caucasisch). Elke deelnemer vulde een vragenlijst in om belangrijke gegevens zoals leeftijd, levensgewoontes (alcohol gebruik en rookgedrag), anciënteit en de medische voorgeschiedenis na te gaan. De belangrijkste eigenschappen van de bestudeerde populatie zijn weergegeven in Tabel 1. Recente blootstelling aan sigarettenrook werd geëvalueerd door middel van een bepaling van de cotinine concentratie in de urine. Het aantal Pakjaren, zijnde het gemiddeld aantal sigaretten gerookt per dag gedeeld door 25 en vermenigvuldigd met het aantal “gerookte” jaren, werd gebruikt als maat voor chronische sigarettenrook blootstelling. Lood in het bloed en chroom in de urine werden bepaald omdat bepaald kleuradditieven, die loodchromaat bevatten, werden gebruikt tijdens het productie proces van de plastic containers.

Gedurende 3 maanden werden elke donderdag na het werk urinestalen verzameld van elke werknemer blootgesteld aan styreen. Amandelzuur (MA) concentratie werd bepaald in de urine volgens de methode beschreven in Severi et al. 1994 (Severi et al. 1994). De styreen concentratie (ppm) in de lucht werd dan als volgt berekend: $\text{styreen (ppm)} = 0.065 * \text{MA (mg/gr cr.)} - 3.6$ (Ikeda et al. 1982). De wekelijkse urinecollectie werd verdergezet totdat bloed en neuscellen werden verzameld voor de bepaling van de N-terminaal valine adduct concentratie, genotypering en genotoxiciteit testen. De gemiddelde styreen blootstelling over de 3 maanden werd per deelnemer berekend als parameter voor de chronische blootstelling. De recente styreen blootstelling werd berekend op basis van de MA op de dag van de bloednames. Venus bloed werden genomen in gehepariniseerde Vacutainer en EDTA tubes. Nasale mucosa cellen werden verzameld door middel van een “cell brush” (Accellon Multi, Medesign, Germany) na het spoelen van de neus met fysiologisch saline (Sterimar, Rhone-Poulenc Rorer, Belgium). De micronucleus frequentie in de nasale cellen en het DNA herstel fenotype werden enkel bepaald in een subgroep van niet-rokers.

1.2.2. Metingen en analyse procedure

N-terminaal valine adduct bepalingen

N-terminaal valine adducten werden geanalyseerd door middel van een Gas Chromatograaf-Massa Spectrometer” (Hewlett-Packard 6890 series gas chromatograaf uitgerust met een autosampler en een 5973 series mass selective detector) volgens het protocol beschreven in Severi et al. 1994 (Severi et al. 1994). De calibratie curve voor de analytische methode was lineair met een detectielimiet van 1 pmol/g globine. Een waarde van 0.5 pmol/g globine werd gebruikt in de statistische analyse in het geval de N-terminaal valine adduct concentratie van het individu onder de detectie limiet was.

Genotoxiciteit testen en het in vitro DNA herstel fenotype

Ficoll-Paque geïsoleerde lymfocyten van de deelnemers werden geanalyseerd ter opsporing van de hoeveelheid DNA breuken (alkali-labile) door middel van de alkaliene versie van de

“comet assay” met de wijzingen zoals beschreven in De Boeck et al. (De Boeck et al. 1998). De “comet assay” werd uitgevoerd samen met EMS-behandelde en onbehandeld K562 cellen als interne standaard (De Boeck et al. 2000b). Het percentage van DNA in de staart van de komeet (TD) werd gebruikt als maat voor DNA migratie. Verdere details omtrent de methodologie kunnen gevonden worden in het rapport van de VUB.

De bloedculturen en de nasale cellen werden bereid en verwerkt voor het scoren van de micronuclei zoals beschreven in De Boeck et al. 2000 (De Boeck et al. 2000a). Voor verdere details verwijzen we naar het rapport van de VUB. De data werden weergegeven als de frequentie van binucleaire cellen die een micronucleus bevatten per 1000 binucleaire cellen (% MNCB) en de frequentie van mononucleaire cellen die een micronucleus bevatten per 1000 mononucleaire cellen (% MNMC). Voor de nasale cellen werd het aantal cellen die een micronucleus bevatten geteld per 1000 cellen (MN). Alle preparaten werden bekeken met een Olympus licht microscoop (1250x).

Voor de bepaling van het in vitro DNA herstel fenotype, werden culturen van geïsoleerd lymfocyten gemaakt en geïncubeerd op 37°C voor 24u. De cellen werden dan behandeld met SO (0.1mM) gedurende 1 uur. Na de verwijdering van de SO werden cellen ofwel onmiddellijk verwerkt voor de comet assay of verder geïncubeerd om DNA herstel toe te laten gedurende 1 of 24 uur. Dus op verschillende tijdstippen voor en na behandeling met SO, werden cellen geoogst en “comet” preparaten werden voorbereid (4 sets van 2 preparaten per persoon).

Genotypering

De bloedstalen van elke deelnemer werden verzameld in EDTA tubes om het genotype te bepalen. *CYP2E1 intron 6 DraI* genotypes (alleles *D* and *C*) werden bepaald door middel van een methode gebaseerd op de PCR-RFLP techniek (zie ook rapport UCL) (Haufroid et al. 1998). *GSTM1* en *GSTT1* polymorfismes werden geanalyseerd door middel van de methode beschreven door Arand et al. (1996). Deze methode laat toe om homozygote individuen te detecteren met een ontbrekend gen voor deze enzymen (*GSTM1null* of *GSTT1null*) (Arand et al. 1996). Twee *EPHX1* polymorfismes werden gedetecteerd in *exon 4* (*His¹³⁹/Arg¹³⁹*) en *exon 3* (*Tyr¹¹³/His¹¹³*).

De volgende genetische polymorfismes van DNA repair enzymen werden onderzocht: *hOGG1* (*Ser³²⁶/Cys³²⁶*), *XRCC1* (*Arg¹⁹⁴/Trp¹⁹⁴*, *Arg²⁸⁰/His²⁸⁰*, and *Arg³⁹⁹/Gln³⁹⁹*), and *XRCC3* (*Trp²⁴¹/Met²⁴¹*). Alle genotyperingen werden uitgevoerd door middel van PCR-RFLP. Voor verdere details verwijzen we naar het rapport van de VUB.

1.3. Resultaten

1.3.1. Styreen blootstelling

De gegevens over de styreen blootstelling zijn weergegeven in tabel 1. Uit Figuur 1 kan men afleiden dat de blootstelling per week niet constant was over de periode (ANOVA, $p < 0.0001$). Er waren weken met hoge blootstellingen (MA of 393.8 ± 355.2 mg/g cr komt overeen met een styreen concentratie van 29.2 ± 26.7 ppm) afgewisseld door weken met lage blootstelling (MA of 102.9 ± 120.7 mg/g cr komt overeen met een styreen concentratie van of 3.09 ± 4.2 ppm). Figuur 2 toont de gemiddelde styreen blootstelling in de blootgesteld populatie. De berekende gemiddelde styreen blootstelling van de blootgestelde groep was 9.5 ppm \pm 9.6 .

Alle controle werknemers hadden een MA onder de detectielimiet. De gemiddelde recente styreen blootstelling was 12.4 ± 16.6 ppm. Er was een statistisch significante positieve correlatie tussen de gemiddelde styreen blootstelling en recente styreen blootstelling ($r=0.802$, $p<0.001$). Hoewel er een beperkt job rotatie werd toegepast in het bedrijf, bleek dat werknemers met een hoge anciënniteit werden blootgesteld aan hogere styreen concentraties. Dit leiden we af uit de vaststelling dat beide blootstellingsparameters ook correleerden met het aantal jaren dienst ($r=0.830$, $p<0.001$; and $r=0.701$, $p<0.001$ respectievelijk).

De resultaten van de lood concentratie in het bloed waren allen onder de referentie waarde (15 $\mu\text{g}/100\text{ml}$) (Lauwerys and Hoet 2001). 3 en 7 individuen van de blootgestelde in de controlegroep respectievelijk hadden een urinaire chroom concentratie boven de referentie waarde (1 $\mu\text{g}/\text{g}$ cr.) (Lauwerys and Hoet 2001). We merken evenwel op dat alle waarden onder de huidige blootstellinglimiet waren zoals gedefinieerd door ACGIH (30 $\mu\text{g}/\text{g}$ cr) (ACGIH 2003). In de subgroep van niet-rokers waren er 4 controle werknemers met een chroom concentratie in de urine boven de referentie waarde.

1.3.2. Genotypering

De frequenties van de genotypes verschilden niet significant van de voorspelde op basis van de Hardy-Weinberg vergelijking. Er waren geen statistisch significante verschillen tussen blootgestelde en controle populatie wat betreft de frequenties van de polymorfismes (Chi-square and Fisher exact tests).

1.3.3. Verschillen tussen controle en blootgestelde groep: N-terminaal valine adduct concentraties and genotoxiciteit testen

N-terminaal valine adduct concentraties

Er waren geen significante verschillen wat betreft de N-terminaal valine adduct concentratie tussen de werknemers blootgesteld aan styreen en de controlegroep (tabel 1). Rokers en niet-rokers vertoonden geen verschil in N-terminaal valine adduct concentratie (M-W U , $p=0.425$). We vonden ook geen effect van roken of blootstelling wanneer enkel de data van de blootgestelde populatie werden beschouwd. Meervoudige lineaire regressie analyses van de Hb adduct concentraties van alle deelnemers toonde een significant invloed van de recente styreen blootstelling ($R^2=0.064$, helling= 0.095 , $p=0.017$).

Genotoxiciteit testen en het in vitro DNA herstel fenotype

Voor een gedetailleerd beschrijving van de resultaten van de genotoxiciteit testen en het in vitro DNA herstel fenotype verwijzen we naar het rapport van de VUB. We vonden een significante positieve correlatie ($r=0.29$, $p=0.008$) tussen N-terminaal valine adduct concentraties and DNA schade zoals beoordeeld door de alkaliene “comet assay” (TD). Hoewel geen enkele deelnemer een urinaire chroom concentratie had boven de blootstellinglimiet, toonde de correlatie analyse een positieve associatie tussen TD en urinaire chroom concentratie ($r=0.34$, $p=0.002$). In de meervoudige lineaire regressie analyse beide voorspellende variabelen, N-terminaal adduct concentratie (helling= 0.017); en urinaire chroom concentratie (helling= 0.042), toonden een significante positieve invloed op TD ($R^2=0.18$, $p<0.001$). Gelijkwaardige resultaten ($R^2=0.35$, $p<0.001$) werden gevonden wanneer enkel de data van de blootgestelde populatie werden beschouwd (N-terminaal adduct concentratie, helling= 0.022 ; and urinaire chroom concentratie, helling= 0.134)).

Er werden geen significante associaties gevonden tussen N-terminaal valine adducten en de genotoxiciteit testen: micronucleus (MN) frequenties in binucleaire (CB), en mononucleaire (MC) lymfocyten en nasale cellen; en het in vitro DNA herstel fenotype.

1.3.4. Invloed van de genotypes op N-terminaal valine adduct concentraties, resultaten van genotoxiciteit testen en in vitro DNA herstel fenotype.

De invloed van het genotype op de N-terminaal valine adduct concentratie werd geëvalueerd door middel van M-W *U*. Geen enkel van de bestudeerde polymorfismes van biotransformatie enzymes beïnvloedde de N-terminaal valine adduct concentratie. Meervoudige lineaire regressie met de volledige dataset en de data van de controle en blootgestelde groep apart konden geen significante invloed tonen van de beschouwde genotypes.

1.4. Bespreking

In deze studie werden verschillende biomarkers gebruikt om te evalueren of lage blootstelling aan styreen in arbeidsmiddelen genotoxische effecten kan veroorzaken en om de invloed van het genotype te beoordelen voor de verschillen in genotoxiciteit. De gemiddelde styreen blootstelling was laag (9.5 ppm \pm 9.6) in vergelijking met de huidige ACGIH TLV-TWA voor styreen van 20 ppm. We vonden geen significante verschillen in N-terminaal Hb adduct concentraties tussen de blootgestelde en de controle populatie. Evenwel toonde de meervoudige regressie analyse aan dat de N-terminaal valine adduct concentratie positief geassocieerd was met recente styreen blootstelling. Tot op heden werd een gestegen N-terminaal adduct concentratie voornamelijk gevonden in studies met een blootstelling boven of rond de huidige TLV. Christakopoulos et al. (1993) vonden dat Hb adduct concentratie correleerden met de concentratie van MA (Christakopoulos et al. 1993). De gemiddelde MA concentratie in deze studie was 9.5 mmol/L. Dit komt overeen met een styreen blootstelling van 75 ppm. Fustinoni et al (1998) vonden een significant verschil in Hb adduct concentraties tussen werknemers en controles wanneer de gegevens gestratificeerd werden voor hoge blootstelling (gemiddeld blootstelling was geschat op 23.5 ppm) (Christakopoulos et al. 1993; Fustinoni et al. 1998). Onze resultaten tonen aan dat N-terminaal valine adducten boven de achtergrond niet kunnen gedetecteerd worden wanneer de styreen blootstelling relatief laag is (\pm 10 ppm).

We vonden dat TD correleerde met N-terminaal adduct concentratie. Een 3 jaar durende follow-up studie in hand laminators, blootgesteld aan styreen tussen 10-50 ppm, kon geen associatie aantonen tussen N-terminaal Hb adducten en het aantal enkelvoudig ketenbreuken (Vodicka et al. 1999). In een vroegere studie werd wel een significante correlatie gerapporteerd tussen O⁶-dG-styreen adduct concentraties en de hoeveelheid DNA ketenbreuken (Vodicka et al. 1995). We weten dat N-terminaal Hb adduct concentraties kunnen gebruikt worden als een surrogaat voor DNA adducten (Farmer 1995). De gevonden correlatie tussen TD en N-terminaal Hb adduct concentraties kan bijgevolg een indicatie zijn dat de gevonden DNA schade in de vorm van enkelvoudige ketenbreuken een resultaat is van een covalente binding van styreen aan het DNA.

Correlatie en regressie analyse toonde ook een positieve associatie tussen TD en urinaire chroom concentratie (allemaal onder de huidige BEI-TLV van 30 μ g/g cr.). De chroom blootstelling van de referentie groep komt waarschijnlijk van een combinatie van

sigarettenrook en dieet, omdat geen significante chroom blootstelling kon worden gedocumenteerd tijdens het productie proces. Recent onderzoek toonde een gestegen "Tail Moment" in "chrome-plating" werknemers (urinaire chroom: 7.31 µg/g cr. ± 4.33) in vergelijking met niet-blootgestelde individuen (Gambelunghe et al. 2003). Enkelvoudige ketenbreuken worden waarschijnlijk gevormd tijdens de reductie van het chroom(VI) in de cellen (Blasiak and Kowalik 2000). Gezien het feit dat de controle groep in onze studie een hogere urinaire chroom concentratie had dan de blootgesteld groep en gezien de TD in "comet assay" afhangt van zowel styreen-adduct vorming en van chroom blootstelling, kunnen deze bevindingen verklaren waarom er geen significant verschil gevonden kan worden tussen de styreen blootgestelde werknemers en de controle groep.

Noch enkelvoudige, noch meervoudige regressie analyse kon een invloed tonen van het genotype van de biotransformatie enzymes op de N-terminaal valine adduct concentratie. De relatie tussen lage styreen blootstelling en de respectievelijke resultaten van de N-terminaal adduct analyse, genotoxiciteit testen en in vitro DNA herstel fenotype worden blijkbaar niet beïnvloed door het genotype. Deze bevinding dient evenwel bekeken te worden in het licht van een mogelijke onvoldoende "power" voor een studie van deze grootte.

Als besluit kunnen we stellen dat lage blootstelling aan styreen (onder de huidige TLV) genotoxische effecten bij werknemers kan induceren. Individuen met een hogere biologische effectieve dosis (geëvalueerd door middel van hemoglobine adducten) tonen een hoger percentage aan DNA ketenbreuken. Wat betreft het ontbreken van een invloed van het genotype is het duidelijk dat de invloed van genetische polymorfismes van biotransformatie en DNA repair enzymes op genotoxiciteit nog verder onderzoek vergt. Hiervoor dienen biomonitoring studies georganiseerd te worden op een groot aantal gegenotypeerde individuen.

1.5. Tabellen en Figuren

Tabel 1: eigenschappen van de deelnemers

	Controle groep (n=44)			Blootgesteld groep (n=44)		
	Mean ± SD	Range	n (%)	Mean ± SD	Range	n (%)
Leeftijd (jaren)	40.9 ± 9.0	22.0-58.0	,	41.6 ± 9.6	21.0-59.0	,
Rookgedrag	,			,		
Rokers	,	,	21 (48%)	,	,	21 (48%)
Pakjaren ^a	16.8 ± 9.7	1.3-33.6	,	13.7 ± 10.5	0.24-35.0	,
Cotinine in de urine (mg/l)	0.9 ± 1.1	ND-3.0	,	1.9 ± 1.0	ND-4.8	,
Blootstellingsgegevens	,			,		
Gemiddeld amandelzuur (mg/g cr.)	ND	ND		201.6 ± 148.3	ND-618.2	
Berekende gemiddelde styreen blootstelling (ppm)	ND	ND	,	9.5 ± 9.6	ND-36.6	,
Berekende recente styreen blootstelling (ppm)	ND	ND	,	12.4 ± 16.6	ND-73.0	,
Berekende maximum styreen	ND	ND	,	31.0 ± 28.8	1.5 ± 116.6	

blootstelling (ppm)						
Anciënniteit in styreen verwerkend bedrijf (maanden)	0.0	0.0	,	170.7 ± 123.8	7.0-455.0	,
Lood in bloed (µg/dl)	5.4 ± 3.1	1.7-15.0	0 (0%) ^b	4.6 ± 1.7	2.1-10	0 (0%) ^b
Chroom in de urine (µg/g cr.)	1.2 ± 3.1	0.05-18.6	7(16%) ^c	0.5 ± 0.9	0.1-5.1	3 (7%) ^c

^a pakjaren werden enkel berekend voor de huidige rokers: ((aantal sigaretten/dag)*aantal jaren)/25

^b aantal (%) boven referentie waarde (15 µg/100ml)

^c aantal (%) boven referentie waarde (1 µg/g cr.)

ND= niet gedetecteerd

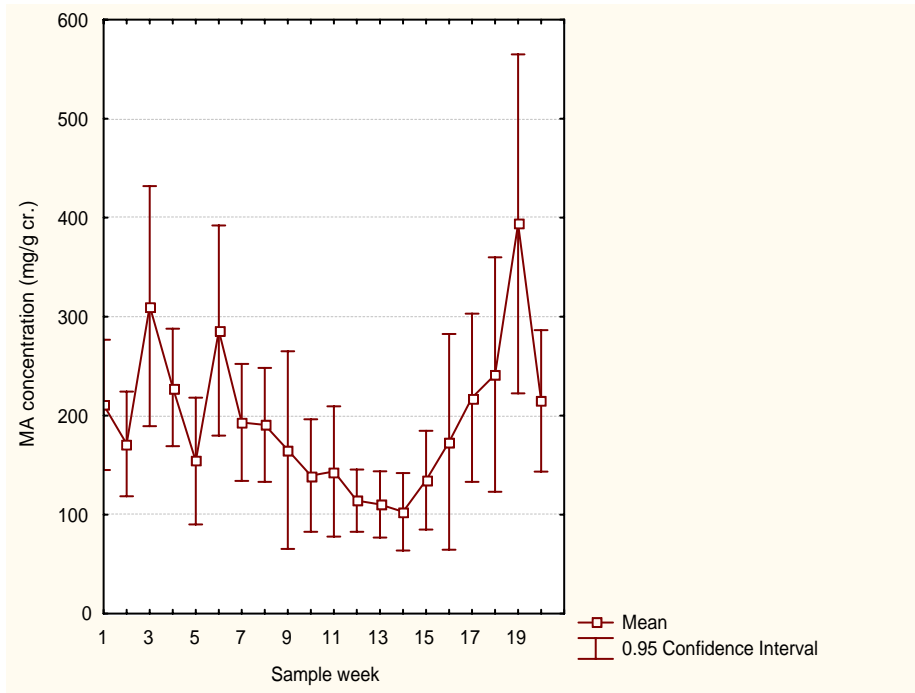
Tabel 2: resultaten van N-terminaal adduct analyses en genotoxiciteit testen

	Controlegroep			Blootgestelde groep			M-W U p-waarde
	n	Mean ± SD	Range	n	Mean ± SD	Range	
N-terminaal adduct concentraties (pmol/g hb)	4 4	3.08 3.30	± ND- 13.06	4 4	5.23 ± 3.49	ND- 25.52	0.131
“Comet assay”: TD (DNA % in staart)	4 4	0.80 0.34	± 0.20-1.62	3 7	0.80 ± 0.31	0.15- 1.60	0.878 ^b
MNMC (MN/1000 mononucleaire lymfocyten)	4 1	0.11 0.20	± 0.00-0.60	3 8	0.71 ± 0.88	0.00- 4.00	<0.001
MNCB (MN/1000 binucleaire lymfocyten)	4 1	2.65 1.94	± 0.00- 10.00	3 8	3.93 ± 2.75	0.00- 13.50	0.02
MN Nasaal (MN/1000 nasale cellen) ^a	1 7	0.23 0.31	± 0.00-1.00	2 3	0.52 ± 0.49	0.00- 1.50	0.04^b
RD 1h (% resterende DNA schade 1 uur na in vitro SO) ^a	1 7	100.53 9.43	± 86.53- 124.71	1 7	98.41 ± 16.70	± 38.53- 115.25	0.71
RD 24h (% resterende DNA schade 24 uur na in vitro SO) ^a	1 7	13.35 9.96	± -0.54- 33.00	1 7	40.55 ± 38.82	± 1.82- 108.92	0.04

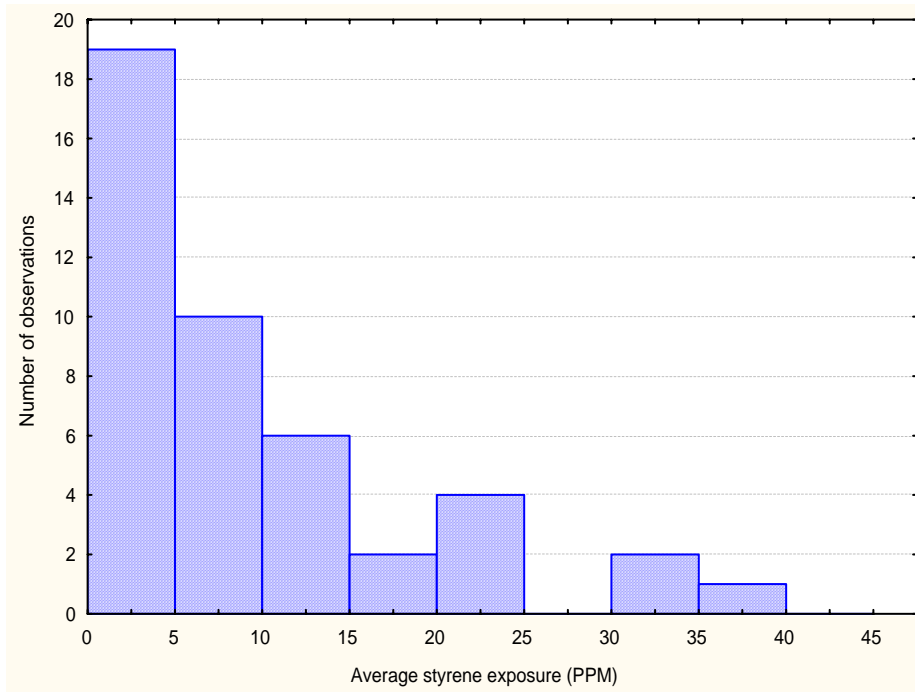
^a enkel bepaald in een subgroep van niet-rokers

^b p-waarde van de ongepaarde T-test

Figuur 1: evaluatie van de MA concentraties (mg/g cr.) per week in blootgestelde werknemers



Figuur 2: verdeling van de gemiddeld styreen blootstelling (ppm) in blootgestelde werknemers (n=44)



2. Opioide analgetica.

2.1. Inleiding

2.1.1. Context en algemeen kader van het onderzoek

Fentanyl, sufentanil en alfentanil behoren tot de groep van de 4-propananilido-piperidine klasse van synthetische narcotische analgetica. Deze opioïde componenten zijn meer potent dan het prototype van de analgetica morfine en veroorzaken minder complicaties bij acute toediening. Omwille van deze eigenschappen kennen deze stoffen een uitgebreide toepassing als anesthetica bij heelkundige ingrepen. (Valaer et al., 1997). Farmacologische eigenschappen van deze opioïde analgetica omvatten de inductie van analgesie, sedatie, ademhalingsdepressie, bradycardie, miose en romp-stijfheid.

Fentanyl, sufentanil and alfentanil worden in hoge mate gemetaboliseerd en slechts enkele percenten van de toegediende dosis wordt als dusdanig uitgescheiden in de urine. De belangrijkste metabole pathway van de opioïde analgetica is de CYP3A4 gekatalyseerde oxidatieve N-dealkylatie ter hoogte van de piperidine stikstof, resulterend in de vorming van de nor-metaboliëten (Fig. 1) (Goromaru et al., 1984, Meuldermans et al., 1988). Onderzoek heeft aangetoond dat een grote variabiliteit bestaat in de activiteit van dit CYP3A4 enzyme in de humane populatie, wat mogelijk leidt tot inter-individuele variabiliteit in metabolisme en klaring.

Alvorens te worden geformuleerd in verschillende toedieningsvormen, worden fentanyl, sufentanil en alfentanil gesynthetiseerd als zuivere chemische poedervormige stoffen. Omdat deze farmaceutisch actieve stoffen speciaal werden ontworpen om biologische functies te modificeren, bestaat het risico dat ook werknemers bij de productie van deze stoffen, ongewenste farmacologische effecten ondervinden als de blootstelling niet adequaat wordt beheerd. Bij blootstelling aan opioïde analgetica kunnen primaire ongewenste effecten optreden zoals dosis-afhankelijke sedatie, gepaard gaande met een risico van acute of vertraagde ademhalingsdepressie, vertraagde hartslag en verlaagde bloeddruk (Willens et al., 1993). Om voor deze productiewerkers en andere betrokken werknemers, de potentiële blootstelling en het geassocieerd gezondheidsrisico in kaart te brengen en te beperken, zijn blootstellingsevaluaties vereist. Naast industriëlehygiëne-metingen, die vooral gericht zijn op de evaluatie van de respiratoire blootstelling, heeft biologische monitoring tot doel om de individuele en geïntegreerde opname van de werknemer en het geassocieerd risico te evalueren. Deze benadering heeft -met het oog op de lipofiele eigenschappen van vooral fentanyl en sufentanil- een bijzonder voordeel, aangezien voor deze componenten absorptie door de huid een belangrijke bijkomende route van blootstelling kan zijn. Bovendien wordt in de literatuur beschreven dat mogelijk inter-individuele variabiliteit bestaat in fentanyl en alfentanil metabolisme en -klaring waardoor de selectie van een geschikte blootstellingsbiomarker de mogelijkheid opent om bijkomende informatie te verkrijgen over de individuele gevoeligheid van de blootgestelde werknemers.

In de literatuur worden verschillende analysetechnieken beschreven om fentanyl-achtige componenten te meten in biologische vloeistoffen van patiënten. Historisch gezien, waren deze analysetechnieken veelal gebaseerd op immunologische principes maar tijdens de laatste tientallen jaren omvatten zij vooral instrumentele technieken, zoals vloeistof- en gaschromatografie met diverse detectiesystemen (Fryirsa et al., 1997, Dotsikas et al., 2002, Dufresne et al., 2001, Choi et al., 2001, Mautz et al., 1994, Shou et al., 2001). Methoden die

gericht zijn op het opsporen van arbeidsgebonden blootstelling aan opioïde analgetica werden in de literatuur tot nu toe niet vermeld. Om de ultra-lage concentraties van de fentanylachtigen en hun metabolieten te kunnen detecteren, die kunnen worden verwacht in arbeidsgebonden blootgestelde individuen, was het dan ook nodig om nieuwe en uiterst gevoelige analytische methoden te ontwikkelen en valideren.

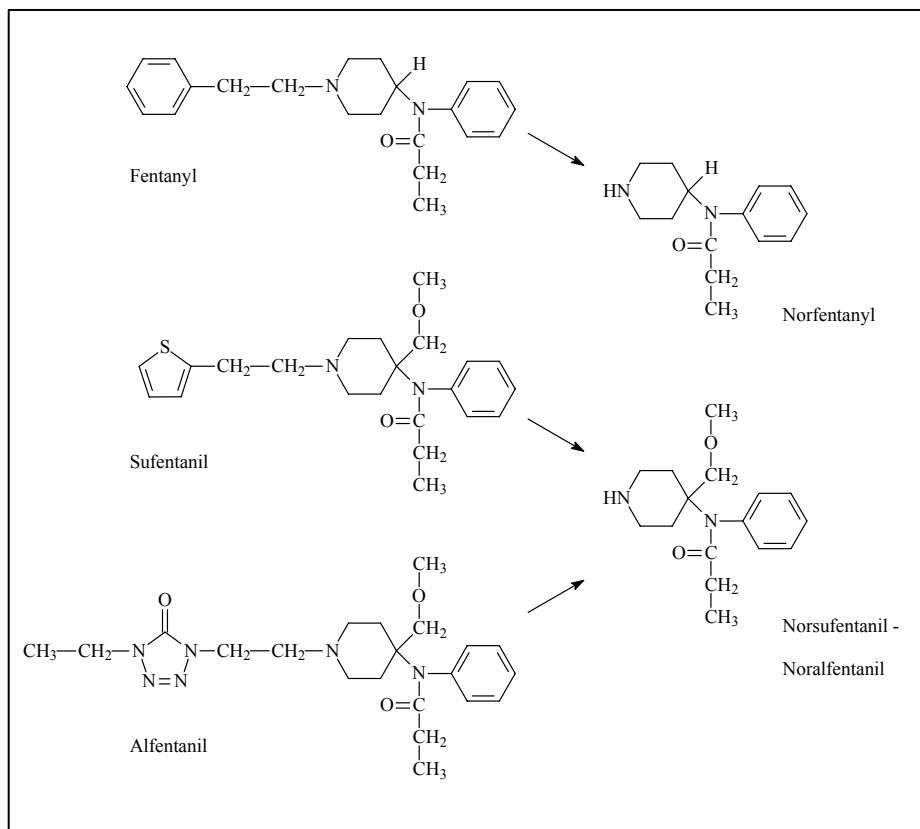


Fig. 1: Structure of fentanyl, sufentanil and alfentanil and their major metabolites formed through CYP3A4 mediated oxidative dealkylation.

2.1.2. Doelstellingen van het onderzoek

Naast het hiervoor geschetst algemeen kader waarin het onderzoek zich situeert, omvatten de concrete doelstellingen van het onderzoek:

- (1) De ontwikkeling en uitgebreide validatie van uiterst gevoelige gaschromatografische-massa spectrometrische (GC-MS) analytische methoden om ultra lage concentraties van fentanyl, alfentanil and sufentanil in omgevingsstalen te kunnen detecteren en om deze opioïde analgetica en hun metabolieten te kunnen bepalen in urine van potentieel blootgestelde opioïde productiewerkers.
- (2) De organisatie van een veldstudie waarbij de hiervoor aangegeven, nieuw ontwikkelde methoden zullen worden toegepast voor de bepaling van de externe en interne fentanylgerelateerde blootstellingsniveaus van farmaceutische productiewerkers.
- (3) De identificatie en validatie van een relevante biomarker voor inter-individuele variabiliteit in het opioïde metabolisme en de -klaring van werknemers en het nagaan van de hypothesen vermeld in het theoretisch kader.
- (4) Het onderwerpen van de farmaceutische productiewerkers aan een neurologische testbatterij in functie van de evaluatie van acute en chronisch neurologische effecten.

2.2. Theoretisch kader

De belangrijkste metabole pathway van de opioïde analgetica is de CYP3A4 gekatalyseerde oxidatieve N-dealkylatie ter hoogte van de piperidine stikstof, resulterend in de vorming van de nor-metabolieten. Onderzoek heeft aangetoond dat een grote variabiliteit bestaat in de activiteit van dit CYP3A4 enzyme in de humane populatie. De activiteit van het enzyme kan *in vivo* worden onderzocht bij patiënten die met de opioïde analgetica worden behandeld tijdens heelkundige ingrepen of voor de behandeling van chronische pijn. Bij deze patiënten zal de klaring van deze geneesmiddelen worden gebruikt als metabole probe voor CYP3A4 activiteit. Bij werknemers is deze methode uiteraard niet toepasbaar. Daarom zal een alternatieve methode worden toegepast die gebruik maakt van endogene steroïde substraten en metabolieten (vb. 6- β -hydroxycortisol/cortisol) als metabole probes (Joellenbeck et al., 1992). Deze methode moet verder worden gevalideerd in een pilootstudie bij patiënten die worden behandeld met de opioïde analgetica, waarbij de resultaten aan de hand van beide voorgestelde probes worden vergeleken.

In dit kader zullen de volgende hypothesen worden getest:

- “De mogelijke individuele susceptibiliteit voor opioïden, veroorzaakt door CYP3A4 defficiëntie, kan worden geëvalueerd op directe wijze door een bepaling van metabolisatiesnelheid van deze opioïden zelf en op een indirecte wijze door een bepaling van de metabolisatiesnelheid van endogene hormoonachtige substraten van hetzelfde enzyme.”
- “Werknemers met een verminderde activiteit van het opioïde metaboliserende enzyme CYP3A4 hebben een verhoogd risico op het ondervinden van neurologische effecten zoals deze die kunnen gemeten worden aan de hand van de beschreven neurotoxicologische eindpunten.”

2.3. Methoden

2.3.1. Staalname

Piloot studie bij patiënten

Teneinde de intra- en inter-individuele verschillen in metabolisatiecapaciteit van geneesmiddelen te onderzoeken, werd een pilootstudie bij patiënten georganiseerd. Hierbij waren 50 patiënten betrokken die werden behandeld met fentanyl voor chronische kankergerelateerde pijn. In deze groep zal de klaring van dit geneesmiddel worden gebruikt als probe voor fenotypisch polymorfisme in CYP3A4.

Van elke patiënt werd gedurende drie opeenvolgende dagen een urinestaal verzameld. Tijdens deze drie dagen werd een constante fentanyl nominale dosis toegediend onder de vorm van Durogesic® pleisters. Afhankelijk van de mentale en/of fysieke toestand van de patiënt werd een mictie of een 24h-debiet verzameld. Na staalname werden de urinestalen bewaard bij – 30°C tot de analyse van fentanyl en norfentanyl werd uitgevoerd. Voor elke patiënt werd naast de nominaal toegediende dosis tevens de werkelijk geleverde dosis berekend aan de hand van de analyse van de residuele hoeveelheid fentanyl aanwezig in de gebruikte Durogesic® pleisters.

Veldstudie bij werknemers

Op het einde van 2001 werd een uitgebreide studie verricht in een productie-eenheid van een farmaceutisch bedrijf. Gedurende een 3 weken durende fentanyl-productie campagne, werden 4 werknemers gevolgd, waarvan 2 werknemers betrokken waren bij de eigenlijke fentanyl-

productie. Een andere werknemer had vooral een toezichhoudende functie en de overige werknemer was vooral betrokken bij de sufentanil-synthese. Ondanks substantiële preventieve maatregelen die genomen worden door de farmaceutische industrie om de blootstelling van deze werknemers te beheersen, doen zich lage achtergrond en accidentele piekblootstellingen voor.

Tijdens fentanyl productiewerkzaamheden die gepaard gingen met open bewerkingen met fijn verdeeld vast fentanyl poeder, werden de werknemers voorzien van een Mururoa® beschermingspak met onafhankelijke luchttoevoer. Tijdens deze werkzaamheden, werden monsternames ter evaluatie van de externe blootstelling verricht binnen in het beschermende pak. Tijdens andere werkzaamheden, werden routine beschermingsmiddelen zoals een cover-all, speciale schoenen, handschoenen en af en toe veiligheidsmaskers gedragen en werd de staalname verricht buiten de beschermende uitrusting.

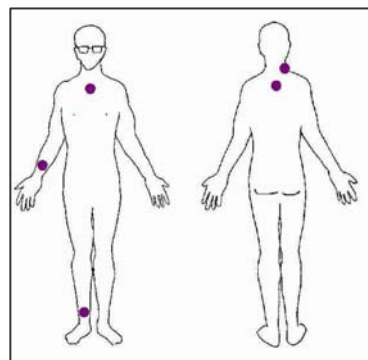
Lucht monstername

Persoonlijke respiratoire blootstelling werd gemeten aan de hand van een IOM sampler die werd bevestigd in de ademhalingszone van de werknemer. Gedurende elke dag, werden voor elke werknemer werden tenminste 2 persoonlijke luchtstalen genomen tijdens elke halve shift en tevens werden piekstalen genomen tijdens de diverse werkzaamheden die gepaard gingen met open bewerkingen. Totaal inhaleerbaar stof werd verzameld op glasvezel filters (Pall Corporation) met luchtpompen (Gilair 5 ®, Sensidyne Inc.) aan een debiet van 2.0 ml/min. De filters werden bewaard bij -30°C tot aan de analyse.

Dermale staalname

De dermale blootstelling aan fentanyl werd gemeten tijdens twee studies. De eerste studie was gericht op een kwantificatie van de fentanyl blootstelling over het lichaam en had tot doel een selectie te maken van het meest geschikte lichaamsdeel dat in een later stadium zou worden bemonsterd voor een schatting van totale dermale fentanyl blootstelling. Tijdens dit eerste onderzoek werden vijf staalnamepleisters aangebracht op verschillende plaatsen van het lichaam: arm, rug, borst, nek en onderbeen (fig. 2). De staalnamepleisters bestonden uit een transparant verband met een 4 x 2,5 cm absorberende laag (OpSite, Smith & Nephew Medical Limited). De pleisters werden gedurende een halve shift gedragen tijdens werkzaamheden die gepaard gingen met open bewerkingen. Aan het einde van elke halve shift werden eveneens handveegstalen genomen zoals hierna beschreven. Het tweede onderzoek omvatte een schatting van de totale dermale fentanyl blootstelling aan de hand van een eenvoudig handveeg-protocol. Hierbij werd aan de werknemers gevraagd de vingertoppen te reinigen met een doekje dat vooraf werd bevochtigd met fysiologisch water en vervolgens deze handeling te herhalen met een in ethanol gedrenkt doekje. Alle pleisters en handveegstalen werden bewaard bij -30°C tot aan de analyse.

Fig. 2: Body location of the five sampling patches applied to evaluate dermal fentanyl exposure.



Urine staalname

Gedurende elke dag werden er tenminste op de volgende 3 tijdstippen urinestalen verzameld van de betrokken werknemers: (i) in de ochtend alvorens de werkzaamheden aan te vatten, (ii) bij het einde van de eerste of het begin van de tweede halve shift en (iii) op het einde van elke werkdag. Het totale gewicht van het tijdstip van de gecollecteerde stalen werd telkens genoteerd. De stalen werden in kleine porties verdeeld en werden zo snel mogelijk op -30°C gebracht en bewaard tot aan de analyse.

2.3.2. Meetmethoden

Bepaling van fentanyl in luchtstalen en dermale stalen

Bemonsterde en QC glasvezel filters, handveegmonsters en dermale staalnamepleisters werden overgebracht in individuele extractieflesjes en 10 of 20 ml van een citraat/natriumhydroxide buffer (pH 6) werd toegevoegd. De stalen werden gedurende 30 minuten automatisch geschud. Van elk staal werden drie replicaten overgebracht in een nieuwe proefbuis. De stalen werden alkalisch gemaakt met 10 N NaOH and 50 μl van een interne standaardoplossing die gedeutereerde analogen bevatte, werd toegevoegd. De stalen werden aangebracht op 1 ml EXTrelut® NT1 SPE kolommen. Na 10 minuten werden de kolommen geëlueerd met 6 ml van een mengsel van *n*-heptaan/*iso*-amylalcohol (98.5/1.5 v/v). De extracten werden gedroogd onder stikstof, heropgelost in 30 μl methanol en geanalyseerd via GC-MS.

Bepaling van urinair fentanyl en norfentanyl

Triplicaten van elk urinestaal en elke urinaire standaard werden alkalisch gemaakt met 10 N NaOH en 50 μl van een interne standaardoplossing met gedeutereerde analogen werd toegevoegd. De betrokken stoffen werden uit de urine geëxtraheerd let het SPE protocol zoals hierboven werd beschreven. Voor de bepaling van fentanyl werden de geëvaporeerde stalen heropgelost in 30 μl methanol. Voor de bepaling van de opioïde nor-metabolieten, werden de afgekoelde residu's gederivatiseerd met 100 μl 0.1 M pentafluorobenzoyl chloride in chloroform. Na overnacht (16 h) reactie werden de stalen gedroogd onder stikstof, heropgelost in 30 μl methanol en geanalyseerd met GC-MS.

GC-MS analyse

De analyses werden uitgevoerd op een Hewlett-Packard 6890 series gaschromatograaf uitgerust met een autosampler en een 5973 series mass selective detector (MSD) in de electron impact (EI) mode (70 eV). Voor de bepaling van fentanyl, werd 5 μl van elk staal geïntroduceerd in de spitless mode op een 30-m DB35-MS (J&W) analytische kolom. Voor de bepaling van de nor-metabolieten, werd een 30-m DB5-MS (J&W) gebruikt. De GC scheiding werd bekomen aan de hand van een ovenprogramma waarbij de begintemperatuur van 70°C werd verhoogd met $60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ tot een finale temperatuur van 280°C . De massa selective detector werd toegepast in de selected ion monitoring (SIM) mode. Hierbij werden de basis ion fragmenten bij m/z 245 voor fentanyl, en m/z 250 voor d_5 -fentanyl gemonitord en gebruikt voor kwantificatie. De norfentanyl-metaboliet afgeleiden werden gemonitord aan de hand van hun specifieke moleculair ion fragmenten bij m/z 426 voor norfentanyl en m/z 431 voor de interne standaard d_5 -norfentanyl.

Bepaling van de cortisol/6- β -hydroxycortisol ratio in urine

Urinair cortisol and 6- β -hydroxycortisol zullen worden bepaald aan de hand van een GC-MS analytische procedure die recent werd ontwikkeld en gepubliceerd door Luceri et al. (2001). Hierbij wordt aan 1 ml urine d_2 -cortisol as interne standaard toegevoegd waarna de stalen

worden aangebracht op 1 ml Extrelut[®] SPE kolommen en geëluëerd met 6 ml dichloromethaan. Beide analytische stoffen worden vervolgens gederiviseerd tot dimethoxime tri-(trimethyl-silyl)-ethers (MOX-TMS) and geanalyseerd via GC-MS, gebruik makend van specifieke ion fragmenten (SIM).

Evaluatie van neurologische end-points

De volgende parameters zullen worden onderzocht als merkers voor neurotoxiciteit:

- Test voor simple reaction times (visual/auditive) met het Neurobehavioral Examination System (NES).
- Complex visuomotor reactie tijden.
- Verhoogde pijndrempel via EMG.
- Ademhalingsdepressie voor acute neurologische effecten.
- Een vragenlijst voor symptomen van afhankelijkheid van geneesmiddelen en ontwenningssverschijnselen voor de evaluatie van chronische neurologische effecten.

Analyse procedure

Urinaire fentanyl en norfentanyl concentraties werden gecorrigeerd voor creatinine gehalte (patiënten, werknemers) of urinair debiet (werknemers). Hierbij dient te worden opgemerkt dat stalen met een creatininegehalte lager dan 0,3 g/L niet in de analyse werden opgenomen.

Time weighted average (TWA) inhalatoire blootstelling werd berekend voor elke werknemer voor elke periode van een halve shift (4h) en een volledige werkdag (8h).

Dermale blootstellingsconcentraties ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (bepaald door de analyse van de huidpleisters of handveegmonsters) werden omgerekend naar een 8h time weighted average (TWA) blootstellingsconcentratie per lichaamsdeel ($\mu\text{g}/\text{body part}$) door de fentanyl concentratie van de individuele sampler te vermenigvuldigen met de anatomische afmetingen zoals beschreven door EPA (1989). Totale dermale lichaamscontaminatie ($\mu\text{g}/8\text{h}$) werd berekend door de fentanyl TWA oppervlakte contaminatie van de verschillende lichaamsdelen op te tellen. In deze berekening werd aangenomen dat elke sampler een bepaalde huid regio vertegenwoordigde waarop de contaminatie uniform aanwezig was.

Mixed ANCOVA and Variance Components Method of Analysis werd gebruikt om de variantiecomponenten te schatten, gebaseerd op maximum likelihood methods (REML).

Pearson correlatie coëfficiënten werden gebruikt om de relatie te onderzoeken tussen de dermale blootstelling op de verschillende lichaamsonderdelen en de totale dermale blootstelling en om de relatie te exploreren tussen de verschillende blootstellingsmerkers.

Multiple regressie analyse werd uitgevoerd om de relatie tussen de verschillende afhankelijke of predicteve variabelen en een bepaalde out-come te onderzoeken.

2.4. Resultaten

2.4.1. Piloot studie bij patiënten

Intra- en inter patiënt variaties in urinaire concentraties van fentanyl (blue line) en norfentanyl (green line) gecorrigeerd voor de toegediende dosis worden aangegeven in figuur 3. Een gelijkaardige voorstelling die de intra- en inter-patiënt variabiliteit weergeeft in urinaire norfentanyl/fentanyl ratios wordt getoond in figuur 4.

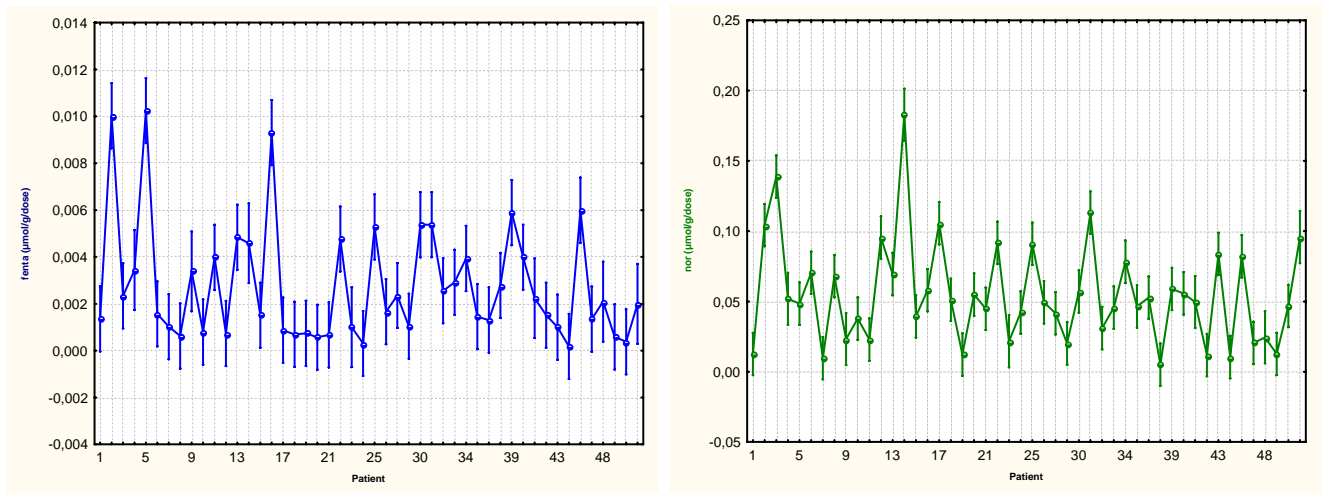


Fig. 3: Intra- and inter-patient variations in urinary fentanyl and norfentanyl concentrations ($\mu\text{mol/g}$) corrected for administered dose. Vertical bars denote 0,95 confidence intervals.

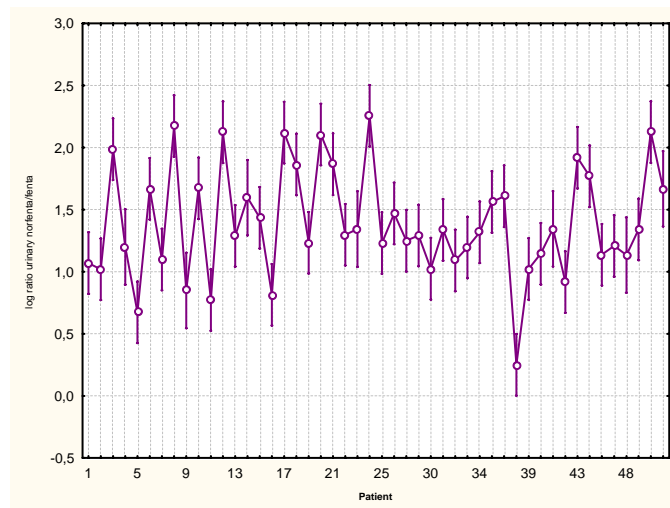


Fig. 4: Intra- and inter-patient variations in urinary norfentanyl/fentanyl ratios. Vertical bars denote 0,95 confidence intervals.

De bovenstaande grafieken geven aan dat een potentieel grote variabiliteit bestaat tussen patiënten in fentanyl klaring en metabolisme –zoals gemeten door de urinaire norfentanyl/fentanyl ratio. Bovendien geeft een schatting van de variantiecomponenten (REML) voor de drie onderzochte parameters aan dat het overgrote deel van de geobserveerde variantie patiënt gerelateerd is, en instaat voor respectievelijk 77% (uriniar fentanyl), 96% (urinair norfentanyl) and 80% (ratio norfentanyl/fentanyl) van de totale variantie (table 1).

Table 1: Mixed ANCOVA and Variance Components method of analysis to estimate variance components based on maximum likelihood methods (REML).

Parameter examined	Variance effect	Variance component	Variance %	Asymptotic p
Urinary fentanyl	Between patients	0,17	77%	0,000016
	Within patients	0,051	23%	< 0,00001
Urinary norfentanyl	Between patients	0,13	96%	0,000011

	Within patients	0,0051	4%	< 0,00001
Urinary norfentanyl/ fentanyl ratio	Between patients	0,18	80%	0,000010
	Within patients	0,047	20%	< 0,00001

Wanneer tenslotte de relatie tussen urinair fentanyl of norfentanyl en de toegediende dosis wordt onderzocht, blijkt uit multiple lineaire regressie dat beide parameters significant ($p < 0,0001$) maar eerder zwak gecorreleerd zijn aan de toegediende dosis ($r = 0,56$ and $r = 0,63$ respectievelijk) hetgeen erop wijst dat inter-patiënt variabiliteit bestaat in drug klaring en metabolisme. Nochtans kon via multiple regressie analyse niet worden aangetoond dat de in de literatuur vermelde parameters (age, sex, BMI) een significante invloed zouden hebben op de onderzochte variabelen, hetgeen mogelijk weer wijst op het feit dat andere parameters, zoals CYP3A4 activiteit een belangrijke determinant is.

2.4.2. Veldstudie bij werknemers

Dermale blootstelling

Figuur 5 toont de resultaten van de bepaling van de verspreiding van de fentanyl blootstelling over geselecteerde lichaamsdelen in een bepaalde operator, betrokken bij de fentanyl productie. Alle aangebrachte pleisters vertonen duidelijk detecteerbare hoeveelheden fentanyl. In figuur 6 worden dezelfde data voorgesteld, aangevuld met de gemeten fentanyl blootstelling van de armen en handen. Het is duidelijk dat voor deze werknemer de armen en handen in hoge mate gecontamineerde lichaamsonderdelen zijn. Figuur 7 toont dezelfde gegevens voor twee andere operatoren. Operator C had een toezichhoudende functie en vertoont duidelijk lagere fentanyl dermale blootstelling dan operator A, zoals werd verwacht. Bij deze operator waren de handen en armen ook duidelijk gecontamineerd maar niet op consistente wijze meer dan de andere lichaamsonderdelen. Operator D was voornamelijk betrokken bij de sufentanil synthese en vertoont duidelijk de laagste fentanyl dermale blootstelling, die opnieuw niet consistent hoger is op armen of handen. Deze resultaten wijzen er mogelijk op dat verschillende operatoren diverse, mogelijk taak-gerelateerd bronnen van dermale contaminatie hebben.

Om een selectie te kunnen maken van het meest geschikte lichaamsonderdeel dat zou worden bemonsterd om een schatting van de totale dermale blootstelling uit te voeren, werd de correlatie tussen de berekende totale dermale blootstelling en de blootstelling van de diverse lichaamsonderdelen berekend. Pearson correlatie coëfficiënten (r) worden getoond in tabel 2. Fentanyl contaminatie aan de armen was in hoge mate gecorreleerd aan de totale dermale blootstelling, wanneer alle 4 operatoren in de analyse werden opgenomen, evenals wanneer de operatoren werden ondergebracht in twee groepen (fentanyl productie werknemers en andere operatoren). Voor de totale groep van 4 operatoren worden hoge correlaties gevonden tussen de fentanyl contaminatie op alle onderzochte lichaamsonderdelen en de totale dermale blootstelling. Correlaties tussen fentanyl contaminatie in de nek en op de borst zijn niet langer significant op het niveau $\alpha = 0,05$ in de fentanyl productie groep. Voor de andere operatoren is alleen de relatie tussen contaminatie op de armen en de totale dermale blootstelling significant op het aangegeven significantieniveau. Deze resultaten wijzen er opnieuw mogelijk op dat voor deze twee groepen van werknemers de dermale blootstelling van een andere origine is. Nochtans blijkt de bepaling van de fentanyl contaminatie op de armen voor alle werknemers een geschikte parameter te zijn voor de schatting van de totale dermale blootstelling.

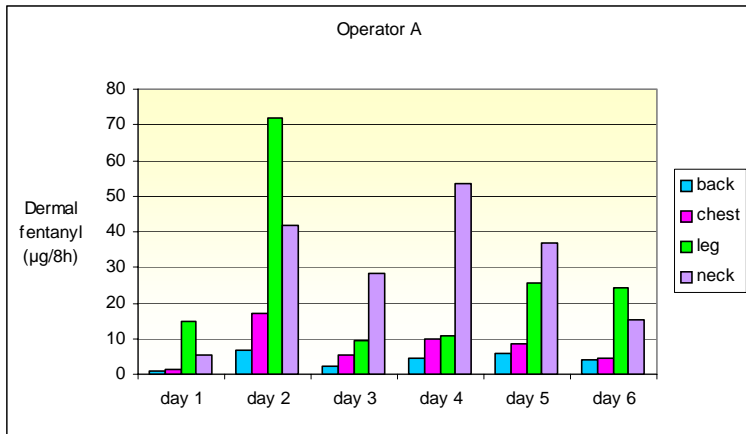


Fig. 5: Operator A Fentanyl dermal exposure measured through the analysis of patch samplers.

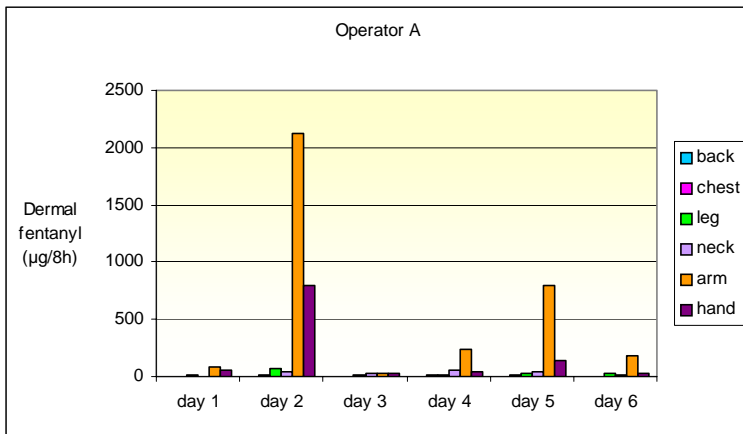


Fig. 6: Operator A Fentanyl dermal exposure measured through the analysis of patch samplers and hand wipes.

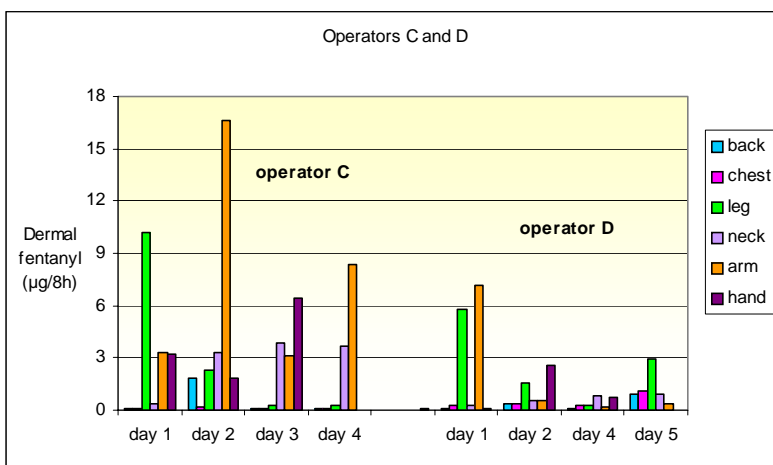


Fig. 7: Operator C and D Fentanyl dermal exposure measured through the analysis of patch samplers and hand wipes.

Table 1. Pearson correlation coefficients (r) between fentanyl level ($\mu\text{g}/8\text{h}/\text{body part}$) at individual skin regions and calculated total body dermal exposure ($\mu\text{g}/8\text{h}$)

Skin region	All (N=4)	Fentanyl workers (N=2)	production	Other operators (N=2)
Neck	0,87	0,56 (NS)		0,71
Back	0,78	0,79		0,28 (NS)
Chest	0,81	0,61 (NS)		0,07 (NS)
Legs	0,84	0,85		0,46 (NS)
Arms	0,97	0,97		0,92
Hands	0,90	0,87		0,52 (NS)

(NS) not significant at the $\alpha = 0,05$ level

Figuur 8 toont de resultaten van de analyse van de handveegmonsters die werden genomen tijdens de tweede studie. De fentanyl productie werknemers (N=2) vertonen een significant ($p < 0,0001$) hogere contaminatie van de handen dan de andere operatoren (N=2), zoals was verwacht.

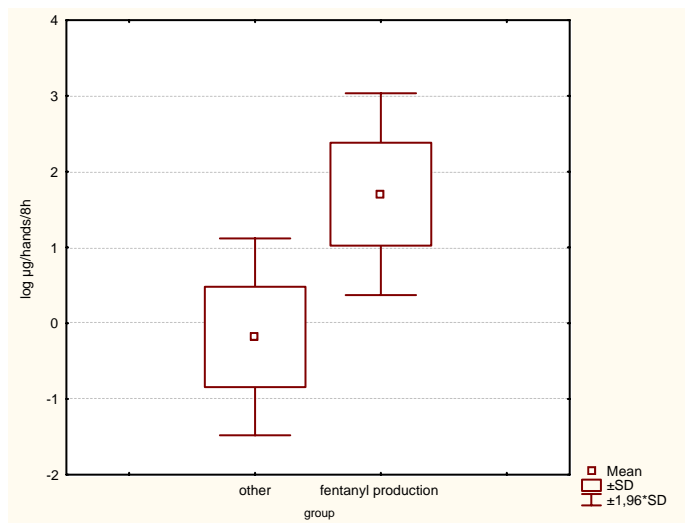


Fig. 8: Fentanyl exposure of the hands, measured through the analysis of hand wipes.

Luchtbemonstering

Figuur 9 toont de resultaten van de bepaling van de time-weighted average respiratoire blootstelling geïntegreerd over een halve shift en vergeleken met de geldende Occupational Exposure Limit (OEL) ($100 \text{ ng}/\text{m}^3$) voor operator A. Het is duidelijk dat tijdens verschillende perioden de respiratoire blootstelling de huidige OEL overstijgt. Men moet evenwel opmerken dat de persoonlijke bemonsteringen werden uitgevoerd buiten de persoonlijke beschermingsuitrusting, met uitzondering van de datapunten aangeduid met witte cirkels. Deze datapunten werden afgeleid van metingen die werden genomen in het Mururoa® pak en reflecteren dus de actuele respiratoire blootstelling die min of meer rond de huidige OEL fluctueert.

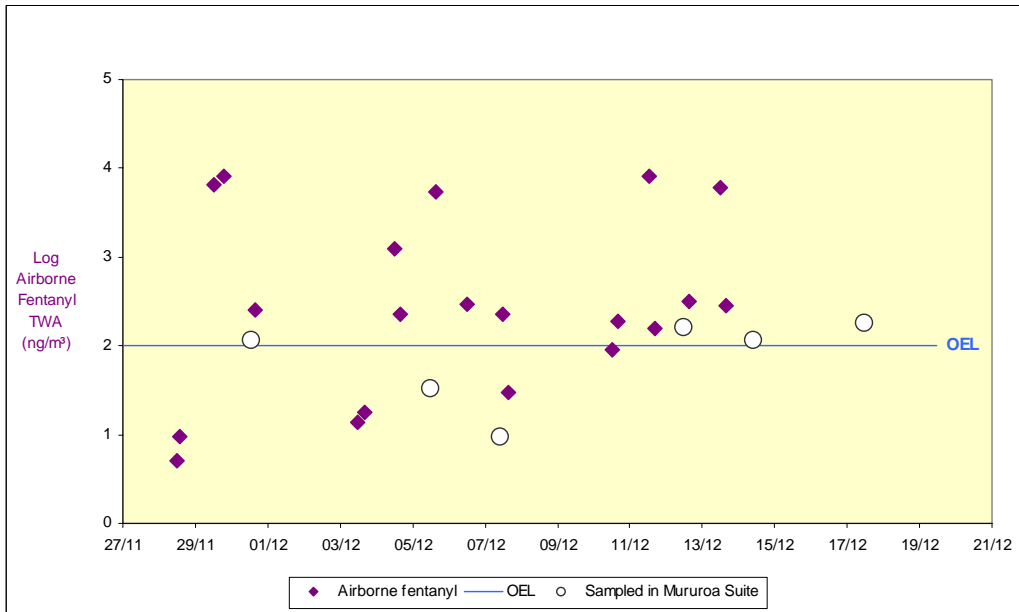


Fig. 9: Operator A Fentanyl potential respiratory exposure as compared with the Occupational Exposure Limit (OEL). Samples taken in the Mururoa protective suite reflect actual respiratory exposure levels and are indicated in white bullets.

Urine monstername

Figuur 10 toont het urinaire fentanyl klaringsprofiel in operator A. Het eerste urine staal, gecollecteerd alvorens de fentanyl productie werd gestart, vertoont geen detecteerbare hoeveelheid fentanyl. Alle volgende urienstalen vertonen detecteerbare hoeveelheden fentanyl, gaande van 15 pg/ml tot 1560 pg/ml urine, corresponderend met een urinaire klaring van 18 to 2750 pg fentanyl/min.

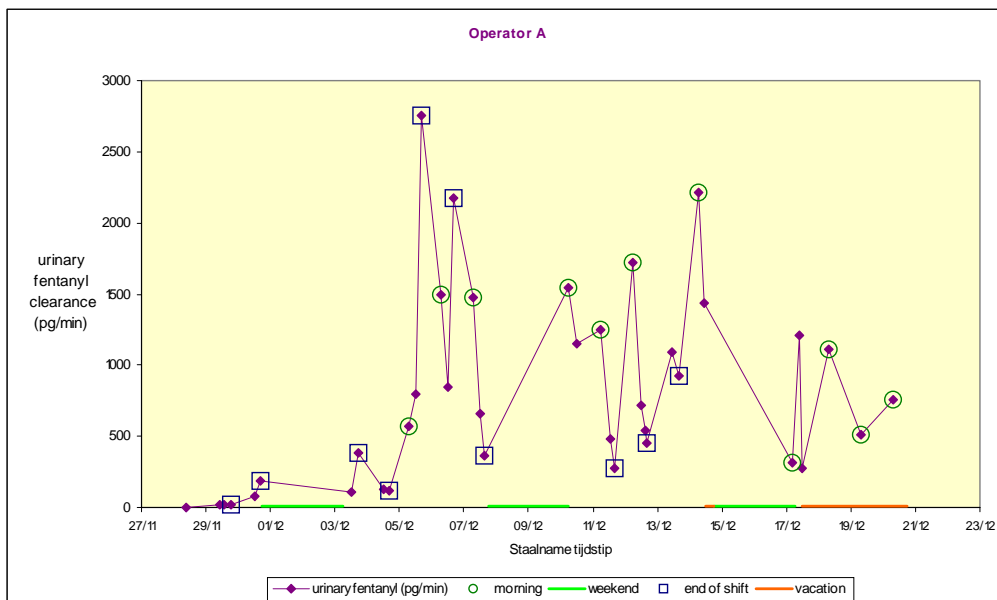


Fig. 10: Urinary fentanyl clearance (pg/min) in operator A.

Zoals blijkt uit figuur 10, vertonen ook de urienstalen gecollecteerd tijdens het weekend en op verlofdagen op onverwachte wijze een aantoonbare hoeveelheid fentanyl en norfentanyl. De

hypothese werd gesteld dat een vertraagde fentanyl klaring plaatsvond, mogelijk resulterend uit een ongewilde verlengde blootstelling door rest-contaminatie aanwezig op de huid van de werknemer. Deze hypothese zal verder worden onderzocht in een follow-up studie waarin naast andere parameters ook een evaluatie van de dermale fentanylblootstelling zal worden uitgevoerd (data not shown).

Correlaties tussen blootstellingsmerkers

Simpele regressie analyse toont een hoog significante correlatie ($r=0,79$) tussen urinaire fentanyl klaring op het einde van elke halve shift en de dermale fentanyl contaminatie van de handen, die een surrogaat is in de schatting van de totale dermale blootstelling, gemiddeld over dezelfde tijdsperiode (fig. 11). Ook een significante ($p=0,001$) maar minder uitgesproken correlatie ($r=0,36$) bestaat tussen urinaire fentanyl klaring op het einde van elke halve shift en de time weighted average respiratoire blootstelling over dezelfde periode. Multipele lineaire regressie wijst erop dat een relatie bestaat tussen de waargenomen respiratoire en dermale blootstelling en dat fentanyl klaring vooral wordt bepaald door de dermale blootstelling. Men kan dan ook besluiten dat fentanyl absorptie door de huid een belangrijke blootstellingsroute kan zijn in vergelijking met de respiratoire blootstelling.

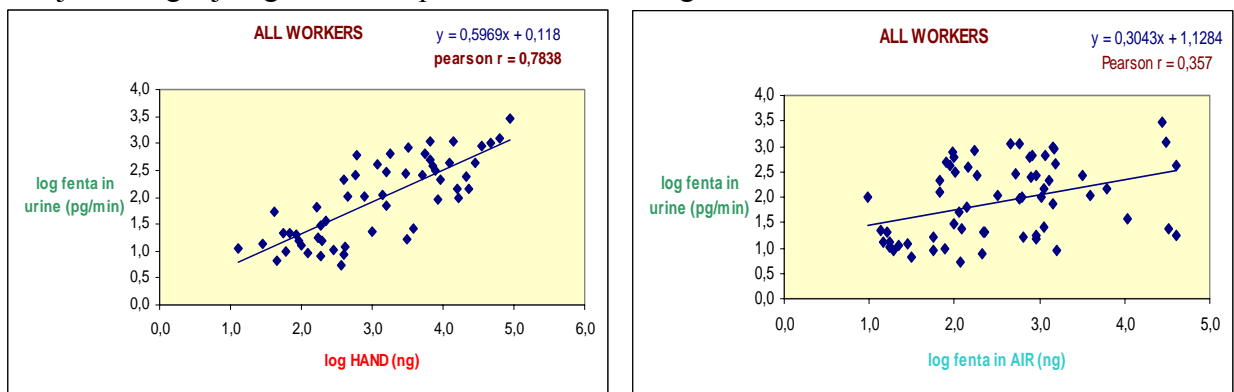


Fig. 11: Relationship between urinary fentanyl clearance (log fenta in urine (pg/min)) and fentanyl contamination levels of the hand (log hand (ng)) and between urinary fentanyl clearance (log fenta in urine (pg/min)) and fentanyl respiratory exposure (log fenta in air (ng)). All values were log-transformed and were averaged over a half shift period (4h time weighted average value).

Inter-individuele susceptibiliteit

Tot op heden kon een exploratie van de inter-individuele susceptibiliteit niet worden uitgevoerd omwille van het kleine aantal werknemers ($n = 4$). Nochtans zal de ervaring en de kennis die werden vergaard tijdens de beschreven veldstudie en de patiënten survey worden gebruikt om in toekomstige onderzoeken een evaluatie van de individuele susceptibiliteit van werknemers uit te voeren.

2.5. Bespreking

Uiterste selectieve en gevoelige analytische methoden werden ontwikkeld voor de bepaling van fentanyl in persoonlijke luchtmonsters en dermale staalnamepleisters en handveegmonsters en om deze stof en zijn belangrijkste metaboliet te bepalen in urine. Dezelfde methodologie werd toegepast voor de bepaling van urinaire fentanyl en norfentanyl profielen in patiënten.

Om de inter-individuele verschillen in drug metabolisatie capaciteit te evalueren, werd een pilootstudie georganiseerd, waarin 50 patiënten werden opgenomen die werden behandeld met fentanyl voor de beheersing van chronische kanker-gerelateerde pijn. In deze groep werd de klaring van deze stof gebruikt als probe voor fenotypisch polymorfisme in CYP3A4. Er werd aangetoond dat een aanzienlijk variabiliteit bestaat in de metabolisatiecapaciteit van patiënten, zoals die kan worden uitgedrukt in urinaire norfentanyl/fentanyl ratios. Het gebruik van drug klaring als probe voor CYP3A4 activiteit zal verder worden gevalideerd aan de hand van endogene steroïde substraten en metabolieten (e.g. 6- β -hydroxycortisol/cortisol) als een alternatieve metabole probe.

In een eerste onderzoek waarin een groep van 4 fentanyl blootgestelde werknemers waren opgenomen, werd een systematische evaluatie uitgevoerd van de potentiële en actuele respiratoire blootstelling en werden urine stalen verzameld in het kader van een biologische monitoring strategie. De ruimtelijke distributie van dermale fentanyl contaminatie werd onderzocht aan de hand van dermale blootstellingspleisters die werden aangebracht op 5 verschillende plaatsen op het lichaam, aangevuld met het nemen van handveegstalen. Een onderliggende aanname in deze evaluatie is een uniforme verspreiding van de blootstelling binnen een bepaald anatomisch gebied. Bij fentanyl productie werknemers werden in hoge mate gecontamineerde lichaamsonderdelen vastgesteld, met name de armen en de handen. Deze contaminatie was significant lager in de andere groep werknemers. Dermale contaminatie van de borst, de nek, de rug en de benen had slechts een minimale bijdrage aan de totale dermale blootstelling in de eerste groep, terwijl de contaminatie van deze lichaamsonderdelen significant bijdroeg aan de totale dermale blootstelling in de tweede groep. Daarom werd verondersteld dat de dermale blootstelling in beide groepen plaats vindt op een andere wijze, waarbij de blootstelling vermoedelijk taak-gerelateerd is in de fentanyl productie werknemers en waarschijnlijk eerder het gevolg is van contact met gecontamineerde oppervlakken in de tweede groep.

Voor de vier werknemers, opgenomen in de veldstudie werd een statisch significante correlatie aangetoond tussen de berekende totale dermale blootstelling en de blootstelling gemeten op verschillende lichaamsonderdelen, met name deze op de armen. Toch werd in een volgende studie de totale dermale blootstelling geschat aan de hand van de resultaten van het meer eenvoudige handveeg-protocol.

Pearson correlatie coëfficiënten werden gebruikt om de relatie te onderzoeken tussen de verschillende blootstellingsmerkers en om het belang van de verschillende blootstellingsroutes te exploreren. De totale dermale fentanyl blootstelling was in hoge mate en significant gecorreleerd aan de urinaire blootstellings biomerkers, terwijl dit veel minder uitgesproken was voor de respiratoire blootstelling. Multiple stepwise regressie analyse toonde aan dat fentanyl absorptie door de huid mogelijk de meest belangrijke blootstellingsroute uitmaakt. In dit kader is een schatting van de individuele geïntegreerde opname van elke werknemer door het uitvoeren van een biologische monitoring essentieel. Bovendien is het mogelijk dat fentanyl metabolisme en -klaring onderhevig is aan inter-individuele variabiliteit en de selectie van de meest geschikte blootstellingsbiomarker zou potentieel bijkomende informatie kunnen verstrekken over de individuele susceptibiliteit van de blootgestelde werknemers.

Men verwacht dat deze studie zal dienen als een model voor de evaluatie van beroepsmatige blootstelling en de individuele susceptibiliteit van werknemers voor andere farmaceutische ingrediënten die gelijkaardige effecten hebben.



Promotor: Prof. Dr. H. Thierens

Universiteit Gent
Faculteit Geneeskunde
Vakgroep Anatomie, Embryologie, Histologie en Medische Fysica
Departement Fysica Biomedische Wetenschappen & Radioprotectie

I. Inleiding

I.1. Context en algemeen kader van het onderzoek

Ioniserende stralingen zijn gekend als een krachtig carcinogen. Blootstelling van populaties van werknemers in de werkomgeving vindt vooral plaats in de medische en de nucleaire sectoren. In België worden niet minder dan 40.000 werknemers beroepshalve blootgesteld aan straling en de dosis verbonden aan sommige werkposten bedraagt 10 mSv/jaar, hetgeen voor een 40 jarige beroepsloopbaan volgens de huidig geldende methode van risico-evaluatie een risico op kankermortaliteit van 1 op 50 betekent. Studies van radiotherapiepatiënten hebben verder aangetoond dat zich bij 1-2 % van deze patiënten een overgevoeligheid naar straling toe manifesteert, wat bij deze patiënten leidt tot vroege en late complicaties van de therapie. Dit samen met de verhoogde stralingsgevoeligheid en kankersusceptibiliteit waargenomen bij patiënten lijdend aan een aantal genetische syndromen wijst op de genetische achtergrond van radiosensitiviteit. Werknemers met deze genetische belasting zullen bij blootstelling aan straling op de werkplaats een significant verhoogd risico lopen op een door straling geïnduceerde maligniteit vergeleken met het resultaat gebaseerd op de risico-evaluatie voor de bevolking in haar geheel. Kennis van de individuele stralingsgevoeligheid van de werknemer kan dus een belangrijke rol spelen in het kader van het preventief beleid in de arbeidsgeneeskunde. In tegenstelling tot de populatie benadering die leidt naar een gemiddeld risico en waarbij aangenomen wordt dat alle individuen identiek reageren op de blootstelling dringt een individuele preventieve aanpak zich op, die rekening houdt met de individuele gevoeligheid.

Het laatste decennium werd een grote wetenschappelijke vooruitgang gemaakt in de analyse van het menselijk genoom. Het “Human Genome Project” heeft een relatief grote genetische variatie aangetoond op individueel niveau. Correlatieonderzoek tussen het individueel genotype en de *in vivo* stralingsgevoeligheid bij radiotherapiepatiënten kan leiden tot de bepaling van genetische profielen geassocieerd met stralingsovergevoeligheid. De verhoogde chromosomale stralingsgevoeligheid waargenomen bij een aantal populaties van kankerpatiënten en bij klinisch radiosensitieve radiotherapiepatiënten wijst anderzijds op de mogelijkheid om chromosomale radiosensitiviteitstesten te gebruiken voor bepaling van de individuele stralingsgevoeligheid op fenotypisch niveau. In het kader van huidig project hebben we de mogelijkheid en de bruikbaarheid van de “State of the Art” radiosensitiviteitstesten op genotypisch en fenotypisch vlak in de arbeidsgeneeskunde in het kader van de bescherming van de werknemer tegen de gevaren van ioniserende straling onderzocht. De essentiële vraag die hierbij dient te worden beantwoord is of de beschouwde testen gevoelig, specifiek en predictief genoeg zijn om een betrouwbare biomonitoring naar individuele stralingsgevoeligheid uit te voeren. Gebruik van individuele genotypische en fenotypische informatie in de arbeidsgeneeskunde in het kader van preventie en gezondheid op het werk doet automatisch ook talrijke ethische en juridische vragen rijzen. Deze implicaties verbonden aan het project werden toevertrouwd aan het team van juristen en ethici behorend tot het netwerk.

I.2. Doelstellingen van het onderzoek

De hoofddoelstelling van het project was het onderzoek van de waarde, het nut en de toepasbaarheid van kandidaat-biomerkers voor bepaling van de individuele susceptibiliteit voor ioniserende stralen op genotypisch en fenotypisch niveau in de arbeidsgeneeskunde van stralingswerkers. De kandidaat-biomerkers dienen gevoelig, specifiek en predictief genoeg te zijn om een betrouwbare monitoring uit te voeren naar stralingsgevoeligheid.

In de eerste plaats hebben we cytogenetische technieken geoptimaliseerd en gestandaardiseerd voor bepaling van de chromosomale stralingsgevoeligheid als fenotypische biomarker voor stralingsgevoeligheid. Ook moleculaire technieken voor analyse van “Single Nucleotide Polymorphisms” (SNP’s) werden op punt gesteld voor identificatie van de SNP-profielen als genotypische biomarker geassocieerd met een verhoogde stralingsgevoeligheid. SNP’s vormen immers ongeveer 90 % van de natuurlijk voorkomende DNA sequentievariëaties. Voor de validatie van de toegepaste technieken werd een populatie van radiotherapiepatiënten met klinische evaluatie van de stralingsgevoeligheid gebruikt. De waarde van de vermelde genotoxiciteitstesten voor individuele bepaling van de stralingsgevoeligheid in de arbeidsgeneeskunde werd nagegaan via een studie van een populatie van externe stralingswerkers uit de nucleaire industrie betrokken bij de revisie van reactoren. Bij het uitwerken van deze studie kwamen automatisch de socio-ethische aspecten in het onderzoek verbonden aan het gebruik van genetische informatie voor bepaling van de individuele stralingsgevoeligheid op de werkplaats aan bod.

II. Theoretisch kader

Het *in vivo* effect van blootstelling aan ioniserende straling op cel- en weefselstructuren en het gevolg hiervan voor de gezondheid van de mens is afhankelijk van de interacties tussen straling, cel en weefsels. Dit hangt bij inwendige en uitwendige blootstelling zoals op de werkplaats in de eerste plaats af van de absorptie van straling door de betrokken weefsels: de geabsorbeerde dosis. Bij absorptie van straling door de weefsels induceert straling in de cellulaire structuren van deze organen DNA breuken, die hersteld of gefixeerd kunnen worden of getransformeerd kunnen worden in een mutatie. Dit laatste kan dan leiden tot carcinogenese als gevolg van de blootstelling.

Variabiliteit voor deze mutagene en carcinogene effecten komt voor op het genetisch niveau: individuen die één of meerdere allelen dragen met polymorfismen leidend tot een minder efficiënte DNA herstelcapaciteit en/of een deregulatie van de checkpoint-controle van de celcyclus zullen een hogere susceptibiliteit vertonen voor stralingsgeïnduceerde kanker. Meer dan 100 genen komen tussen in de detectie van DNA schade en DNA herstel. Het betreft genen o.a. betrokken bij de “base excision repair (BER)”, de “nucleotide excision repair (NER)”, de “non-homologous-end-joining (NHEJ)”, de “homologous recombination (HR)”, de celcyclus controle en herstelmechanismen van oxidatieve schade. Literatuurgegevens tonen aan dat verschillende SNP's in genen betrokken bij deze processen in verband kunnen gebracht worden met radiosensitiviteit en kankerpredispositie.

Een geringere DNA herstelcapaciteit gaat tevens gepaard met een grotere chromosomale schade in perifere bloed lymfocyten na *in vitro* bestraling van een bloedstaal. Als dusdanig hebben individuen met verhoogde *in vitro* chromosomale stralingsgevoeligheid eveneens een verhoogd risico op stralingsgeïnduceerde maligne aandoeningen. Studies op patiënten met genetische syndromen die gepaard gaan met een verhoogde stralingsgevoeligheid en kankerpredispositie als ataxia-telangiectasia hebben aangetoond dat de scoring van het aantal chromatidebreuken en gaps in delende lymfocyten na *in vitro* bestraling in de G2 fase van de celcyclus (de G2-test) een gevoelige cytogenetische techniek is voor bepaling van de radiosensitiviteit. Hetzelfde geldt voor het aantal micronuclei in lymfocyten na deling volgend op een *in vitro* bestraling in de G0 fase (de micronucleus test).

In het kader van het project hebben we dus enerzijds de gevoeligheid, specificiteit en predictieve waarde van vermelde cytogenetische technieken voor bepaling van de *in vitro* chromosomale stralingsgevoeligheid nagegaan met het oog op een mogelijke toepassing in de arbeidsgeneeskunde. Deze technieken voor bepaling van de stralingsgevoeligheid werden toegepast op een populatie van externe werknemers beroepshalve blootgesteld aan straling uit de nucleaire industrie. Anderzijds hebben we de technieken op punt gesteld om via een analyse van de polymorfismen informatie te verzamelen over genotypen geassocieerd met een verhoogde stralingsgevoeligheid en verhoogd risico op stralingsgeïnduceerde kanker.

III Methode

III.1. Steekproef

Populaties voor de validatiestudies

Voor de validatie van de chromosomale radiosensitiviteitstesten en de studies op genotypisch niveau werd enerzijds een populatie beschouwd van 48 patiënten behandeld in het verleden met radiotherapie voor cervix uteri en endometrium carcinoom in de afdeling radiotherapie van het Universitair Ziekenhuis Gent. Voor deze patiënten was de klinische radiosensitiviteit tijdens en na de therapie geëvalueerd volgens de RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) schaal. Graad 1 en 2 zijn respectievelijk milde en matige reacties terwijl graad 3 en 4 ernstige tot levensbedreigende complicaties zijn. Al deze patiënten kregen een nagenoeg identiek behandelingsschema en de gegevens met betrekking tot de fysische dosimetrie werden geïnventariseerd. Bij deze patiënten werd een bloedstaal afgenomen minstens 6 maand na het einde van de radiotherapiebehandeling. De leeftijd van de patiënten bij de bloedafname varieerde van 35 tot 81 jaar met een gemiddelde waarde van 64 jaar. Validatie van de chromosomale radiosensitiviteitstesten gebeurde door correlatieonderzoek tussen *in vivo* en *in vitro* radiosensitiviteit terwijl genotypische informatie over stralingsgevoeligheid kon gehaald worden uit een vergelijking van de resultaten van de SNP analyse voor de groep met hoge klinische radiosensitiviteit met de groep zonder of met milde complicaties. Deze studie gebeurde in samenwerking met Prof. M. van Eijkeren van de afdeling Radiotherapie.

Naast deze studie van radiotherapiepatiënten werd eveneens een uitgebreide studie uitgevoerd naar de chromosomale radiosensitiviteit van patiënten lijdend aan borstkanker met vermoedelijk een genetische belasting. Het betreft patiënten (1) jonger dan 35 jaar bij diagnose, (2) met bilaterale borstkanker vóór 50 jaar, (3) met drie familieleden van de eerste graad met borst- of ovariumkanker, (4) met twee familieleden van eerste of tweede graad met borst- of ovariumkanker vóór 50 jaar. In totaal werden voor deze studie 62 borstkanker patiënten geïnccludeerd met leeftijd variërend van 29 tot 69 jaar met gemiddelde waarde van 45 jaar. Een bloedstaal werd afgenomen minstens 9 maanden na radio/chemotherapie. Deze studie gebeurde in samenwerking met het Departement Medische Genetica Universitair Ziekenhuis o.l.v. Prof. A. De Paepe.

Als controlepopulatie werden 60 vrouwelijke werknemers van het Universitair Ziekenhuis Gent genomen, niet blootgesteld aan straling of andere mutagene agentia. Dit onderzoek gebeurde in samenwerking met de arbeidsgeneeskundige dienst aldaar o.l.v. Dr. R. Morthier, IDEWE. De leeftijd van deze vrouwen varieerde tussen 23 en 60 jaar met gemiddelde waarde 37 jaar.

Voor al deze studies werd de goedkeuring van het Ethisch Comité van het Universitair Ziekenhuis bekomen. Alle deelnemers aan de studies werden ingelicht over de inhoud ervan en gaven hun schriftelijke toelating vóór de bloedafname.

Populatie van werknemers uit de nucleaire sector

De toepassing van radiosensitiviteitstesten in de arbeidsgeneeskunde is het meest relevant voor de werknemers met de hoogste blootstelling aan straling. Wat de nucleaire industrie

betreft vormen de externe werkers betrokken bij de revisie van reactoren (“jumpers”) de meest kritische populatie. Bij de werkzaamheden verbonden aan de revisie lopen ze soms relatief hoge dosissen op op relatief korte termijn (tot 10 mSv per maand). Hun werkzaamheden bestaan uit taken verbonden aan de schoonmaak, het onderhoud en het herstel van componenten in de “warme” zone van de reactoren. Het aantal externe werknemers in de kerncentrale Doel is niet onbelangrijk: de groep beslaat ongeveer 63 % van alle werknemers (1636). Voor biomonitoring vormt de groep van de externe werkers een moeilijke populatie gezien ze voornamelijk bestaat uit tijdelijke werknemers. Voor deze werknemers is fysische dosimetrie verplicht en de arbeidsgeneeskundige dienst van de kerncentrale is hiervoor verantwoordelijk. Biomonitoring van deze populatie was dan ook slechts mogelijk via een sterke samenwerking met de arbeidsgeneeskundige dienst aldaar o.l.v. Dr. M. Barbé.

In het kader van het project werd een biomonitoring programma uitgewerkt voor populaties van externe werkers betrokken bij de revisies van de 4 kernreactoren van de kerncentrale Electrabel Doel van april tot september 2000. In de praktijk worden deze werkzaamheden uitbesteed aan tien ondernemingen. Een studie van de doses opgelopen door externe werknemers in de kerncentrale Doel in de periode 1990-2000 leidde tot de selectie van drie ondernemingen, waarvan de werknemers de hoogste stralingsbelasting hadden en dit inderdaad ten gevolge van de revisies van de kernreactoren.

Een eerste onderneming is verantwoordelijk voor mechanische en elektrische herstellings- en onderhoudsactiviteiten aan de stoomgeneratoren, en werknemers van deze firma kunnen beschouwd worden als “jumpers”. De tweede onderneming voert schoonmaak- en mechanische onderhoudsactiviteiten uit in de “warme zone” terwijl de derde onderneming verantwoordelijk is voor isolatiewerken aan de koelcircuits. De gemiddelde doses opgelopen door de werknemers van deze ondernemingen bij deze werkzaamheden bedraagt 2-5 mSv per jaar en de maximale doses 10 mSv per jaar.

Als steekproefpopulatie blootgesteld aan straling werden in de studie 41 mannelijke werknemers van deze drie ondernemingen geselecteerd. Vóór de deelname aan de studie werd door de Medische Dienst informatie verschaft aangaande de studie en een schriftelijk akkoord aangaande deelname werd individueel gevraagd vóór bloedafname. De deelnemers aan de studie werd gevraagd een vragenlijst in te vullen met de gegevens belangrijk voor de studie: leeftijd, rookgewoonten, medische blootstellingen. De leeftijd van de deelnemers aan de studie varieerde van 18 tot 55 jaar met een gemiddelde waarde van 30.6 jaar. Dertien werknemers waren niet-rokers. Voor de rokers was het gemiddeld aantal sigaretjaren, gedefinieerd als het aantal sigaretten per dag vermenigvuldigd met het aantal jaren als roker 208 met een variatie van 40 tot 750 sigaretjaren. Het gemiddeld aantal sigaretten geconsumeerd per dag bedroeg binnen de populatie van rokers 16.9 met een variatie van 6 tot 25. De gemiddelde dosis opgelopen door de werknemers tot vóór de revisie volgens de officiële dosimetriegegevens bedroeg 13.9 mSv met een variatie van 0.0 tot 68.7 mSv.

De dosis opgelopen door de werknemers tijdens de revisiewerkzaamheden werd continu gevolgd met fysische methoden (elektronische dosimeters). Een eerste bloedstaal, 10 ml bloed in een heparine proefbuis, werd afgenomen van elke deelnemer aan de studie onmiddellijk vóór starten van de werkzaamheden. Dit bloedstaal is het uitgangsmateriaal voor bepaling van de individuele chromosomale radiosensitiviteit van de werknemer. Daarnaast werd de micronucleus test toegepast op een deel van dit bloedstaal zonder *in vitro* bestraling.

Bedoeling hiervan was een uitgangswaarde te hebben vóór de blootstelling voor gebruik van de micronucleus test als effect-biomarker.

Een tweede bloedstaal, 10 ml in een heparine proefbuis & 5 ml in een EDTA proefbuis, werd afgenomen direct na de werkzaamheden van de revisie in de “warme zone” volgens de volgende criteria: (1) voor werknemers betrokken bij de revisie van één reactor bloedafname na deze revisie (2) voor werknemers betrokken bij de revisie van meer reactoren bloedafname na de revisie met de hoogste schattingswaarde voor de op te lopen dosis. Dit bloedstaal diende voor de studie van het effect van de blootstelling aan straling op de individuele chromosomale radiosensitiviteit en in het kader van het gebruik van de micronucleus test als effect-biomarker. De gemiddelde blootstellingstijd bedroeg 5.2 weken met een variatie van 1 tot 8 weken. Gemiddelde dosis opgelopen in die periode bedroeg 3.0 mSv met een maximale dosis van 9.5 mSv.

Voor de studies uitgevoerd door het Laboratorium voor Cellulaire Genetica van de VUB binnen het netwerk werd naast de populatie van de externe stralingswerkers een controlegroep beschouwd van 31 mannelijke administratieve personeelsleden van de kerncentrale Doel, beroepshalve niet blootgesteld aan straling. Gemiddelde leeftijd van deze groep was 37 jaar met een variatie van 18 tot 57 jaar.

III.2. Analyse procedure

G2-test

Een eerste test voor de chromosomale radiosensitiviteit, die systematisch werd toegepast, is de G2-test op perifere bloed lymfocyten. Hierbij wordt het aantal chromatide aberraties (breuken en gaps) geteld in lymfocyten in metafase na een *in vitro* bestraling van een celcultuur in de G2 fase van de celcyclus. Het blijkt dat de hoge chromosomale stralingsgevoeligheid van ataxia telangiectasia patiënten zich het sterkst manifesteert na bestraling in de G2 fase. Kritisch voor de applicatie van de G2 test is dat de temperatuur gedurende de periode van een half uur tussen de bestraling en de toevoeging van colcemide om de celdeling te blokkeren in metafase 37°C moet bedragen. In de onderzoeksgroep schept dit geen probleem gezien de bestralingsinstallatie in hetzelfde gebouw direct bij het celcultuurlaboratorium is gelegen. Na optimalisatie van de *in vitro* dosis en celcultuurtijden bekwamen we het volgende protocol: uitgaande van een gehepariniseerd bloedstaal worden celculturen opgezet en gestimuleerd met 10 µl van een 1 % oplossing van phytohaemagglutinin (PHA). Na 71h incubatie bij 37°C worden de culturen bestraald bij 37°C met 0.4 Gy ⁶⁰Co-γ stralen. Dertig minuten na bestraling wordt colcemide (0.15µg/ml) toegevoegd. Na 60 minuten worden de celculturen gestopt door ze te plaatsen op ijs. De cellen ondergaan dan een hypotone behandeling met 0.075 M KCl gedurende 15 min, worden gefixeerd in methanol-ijsazijn (3:1), worden op microscoop draagglasjes gebracht en gekleurd met 6 % Romanowsky Giemsa.

Voor de scoring van de chromatide breuken en gaps in metafasen wordt gebruik gemaakt van een metafase-finder. Dit is een vol-automatisch systeem voor het zoeken en de localisatie van metafasen op microscoop draagglasjes gebruik makend van een scanning platform. De automatische scanning met autofocusering gebeurt aan een tempo van 5 camera velden per seconde wat resulteert in een totale scantijd van 10 minuten per draagglasje. Gedurende de scan worden alle gevonden metafasen afgebeeld op een hoge resolutiescherm wat een selectie

van de metafase spreidingen naar kwaliteit mogelijk maakt. Na de scan laat het systeem een automatische relocatie toe van de geselecteerde objecten zodat ze onder de microscoop kunnen worden geobserveerd. Het systeem bevat verder een gemotoriseerde scanning tafel die acht glaasjes kan bevatten. Er werd een vergelijkende studie uitgevoerd tussen de resultaten van de G2-test bekomen met manuele lokalisatie van metafasen en die bekomen met automatische lokalisatie met het metafase finder systeem. Deze vergelijkende studie toonde geen significante verschillen. Voor de G2-test werden systematisch chromatide aberraties gescoord in 50 metafasen door twee scorers op gecodeerde draagglasjes.

Micronucleus test

De tweede test die werd toegepast voor bepaling van de chromosomale radiosensitiviteit is de micronucleus (MN) test op perifere bloed lymfocyten na *in vitro* bestraling in de G0 fase van de celcyclus. Voor de G0 MN radiosensitiviteitstest werden twee *in vitro* bestralingsprotocollen gebruikt: een bestraling met 3.5 Gy ⁶⁰Co γ -stralen gegeven aan een hoog dosistempo (1 Gy/min) (HDR-MN) en een bestraling met dezelfde dosis gegeven aan een laag dosistempo (4 mGy/min) (LDR-MN). De laatste procedure werd toegepast omdat literatuurgegevens wijzen op een grotere sensitiviteit van de MN test voor chromosomale radiosensitiviteit bij *in vitro* bestraling aan een laag dosistempo. Phytohaemagglutinin (PHA) werd onmiddellijk na de bestraling aan de bloedcultuur toegevoegd. Cytochalasine-B (6 μ g/ml) werd toegevoegd 24 uur na de stimulatie om de cytokinese te blokkeren. Na een incubatie gedurende 70 h bij 37°C werden de cellen geogst, behandeld met een koude hypotone oplossing van 0.075 M KCl en gefixeerd met methanol-ijsazijn (10:1). De cellen werden dan gebracht op microscoop draagglasjes en gekleurd met Romanowsky-Giemsa oplossing.

Micronuclei werden gescoord in 1000 binucleaire cellen gebruik makend van de criteria zoals gedefinieerd door Fenech.

Het dosis-tempo effect van de LDR bestraling vergeleken met de HDR bestraling, weergegeven door de “dose rate sparing” (DRS) factor, werd berekend volgens de betrekking:

$$DRS = (1 - Y_{LDR}/Y_{HDR}) \times 100$$

met Y_{LDR} de micronucleus opbrengst bij laag dosis-tempo en Y_{HDR} de micronucleus opbrengst bij hoog dosis-tempo.

SNP- analyse

Voor de SNP analyse wordt vertrokken van genomisch DNA verkregen uit perifere bloed lymfocyten. Voor de detectie wordt enerzijds gebruik gemaakt van de RFLP techniek (Restriction Fragment Length Polymorphism), anderzijds van de gecommmercialiseerde SnaPshot techniek. Beide technieken vereisen een eerste polymerase chain reaction (PCR) met uitwendige primers voor amplificatie van het DNA fragment met het gekende polymorfisme. Vervolgens wordt bij de RFLP techniek gebruik gemaakt van specifieke restrictie enzymen die al dan niet knippen naargelang de aan- of afwezigheid van het polymorfisme. De DNA fragmenten worden gescheiden en gevisualiseerd met behulp van gel elektroforese. Voor de SnaPshot technologie wordt een tweede PCR met een primer, die juist vóór de polymorfe DNA plaats bindt, uitgevoerd. Deze primer wordt tijdens de reactie met een fluorescent dideoxynucleotide (ddNTP) verlengd. Na denaturatie van de fluorescent gelabelde PCR fragmenten worden deze via capillaire elektroforese (ABI 310 Genetic Analyser) geanalyseerd.

IV Resultaten

IV.1. Onderzoek van intra- en interindividuele variabiliteit van de chromosomale radiosensitiviteitstesten

Cruciaal voor een radiosensitiviteitstest is zijn gevoeligheid en betrouwbaarheid. Ten einde dit na te gaan voor de HDR-LDR MN test en G2-test werd een studie uitgevoerd vertrekkende van bloedstalen van een aantal donoren. Om inzicht te krijgen in de intra-individuele variabiliteit werden voor een tweetal gezonde donoren beide testen een tiental maal toegepast over een periode van een jaar. Daarnaast werd de interindividuele variabiliteit binnen een normale populatie van twaalf gezonde donoren onderzocht. Verder werd eveneens de reproduceerbaarheid van de testen op zich onderzocht uitgaande van een zestal culturen van hetzelfde bloedstaal. In onderstaande tabel wordt een vergelijking gemaakt tussen de variatie coëfficiënt CV gedefinieerd als de verhouding van de standaarddeviatie en de gemiddelde waarde uitgedrukt in procenten voor de intercultuur, intra-individuele en interindividuele data.

TABEL 1. De CV (%) waarde van de intercultuur, intra-individuele en interindividuele data voor de verschillende toegepaste chromosomale radiosensitiviteitstesten

	G2-test	HDR-MN test	LDR-MN test
Intercultuur	6	5	10
Intra-individueel	15	10	17
Interindividueel	17	9	18

Conclusie van deze studie is dat de intra-individuele variabiliteit slechts een weinig geringer is dan de interindividuele variabiliteit voor beide testen. De CV waarden van de intercultuurdata tonen aan dat de intra-individuele variaties niet kunnen worden toegeschreven aan cultuureffecten of de scoring.

IV.2. Onderzoek van de stralingsgevoeligheid van een populatie van radiotherapiepatiënten: validatie van de G2-test en SNP-analyse van het XRCC1 gen

Voor validatie van de in het project gebruikte technieken werd enerzijds een retrospectieve studie van een populatie van radiotherapiepatiënten behandeld voor gynaecologische tumoren uitgevoerd. In deze studie werd als radiosensitieve populatie een groep van 18 patiënten beschouwd met matige en ernstige reacties op de therapie (graad 2 en meer op de RTOG schaal) terwijl een groep van 30 patiënten zonder of slechts met milde reacties (graad 1 RTOG schaal) als controlepopulatie werd beschouwd. Voor een zevental patiënten bleek mitogene stimulatie van de lymfocyten onmogelijk, zeer waarschijnlijk ten gevolge van de radio/chemotherapie uit het verleden. De G2-test als test voor chromosomale stralingsgevoeligheid gaf de volgende gemiddelde waarden en standaarddeviaties van de G2 index (aantal chromatide breuken en gaps per metafase) als resultaat: stralingsgevoelige groep 1.34 ± 0.21 (SD) versus controlegroep 1.15 ± 0.20 (SD). Toepassing van de Student t-test toont aan dat de resultaten van de G2 test voor beide groepen statistisch significant verschillend zijn ($p = 0.01$). Opsplitsing van de radiosensitieve groep in een groep met matige (RTOG schaal graad 2) complicaties en een groep met ernstige (RTOG schaal graad 3 en 4) complicaties geeft als waarden van de G2-index respectievelijk 1.32 ± 0.21 (SD) en 1.39 ± 0.24 (SD). Het

verschil tussen deze twee groepen is statistisch niet significant en dit vooral wegens een te beperkt aantal (7) patiënten met ernstige complicaties.

TABEL 2: Frequenties van de verschillende genotypes beschouwd bij verschillende polymorfismen van het XRCC1 gen

194 Arg/Trp C>T

	Graad 0-1	Graad 2-4	Controlegroep
CC	24/32 (75%)	16/16	20/25 (80%)
CT	7/32 (22%)	0/16	5/25 (20%)
TT	1/32 (3%)	0/16	0/25
q	14%	0%	10%

280 Arg/His G>A

	Graad 0-1	Graad 2-4	Controlegroep
GG	30/32 (94%)	14/16 (88%)	25/25
GA	2/32 (6%)	2/16 (12%)	0/25
AA	0/32	0/16	0/25
q	3%	6%	0%

399 Arg/Gln G>A

	Graad 0-1	Graad 2-4	Controlegroep
GG	11/32 (34%)	4/16 (25%)	7/25 (28%)
GA	16/32 (50%)	10/16 (63%)	12/25 (48%)
AA	5/32 (16%)	2/16 (12%)	6/25 (24%)
q	40%	44%	48%

632 Gln/Gln G>A

	Graad 0-1	Graad 2-4	Controlegroep
GG	13/32 (41%)	4/16 (25%)	10/25 (40%)
GA	17/32 (53%)	8/16 (50%)	14/25 (56%)
AA	2/32 (6%)	4/16 (25%)	1/25 (4%)
q	33%	50%	32%

Niettegenstaande een duidelijk en statistisch significant verschil in G2-index wordt waargenomen tussen de controlegroep en de radiosensitieve groep patiënten en

stralingsgevoelige radiotherapiepatiënten gemiddeld hoog scoren is dit niet systematisch het geval. Bij hanteren van het 90^{ste} percentiel van de normale controlepopulatie als “cut off” waarde waarboven een patiënt als chromosomaal radiosensitief wordt beschouwd blijken toch 4 van de 18 klinisch stralingsgevoelige patiënten een normale waarde van de G2-index te hebben. Anderzijds blijken 8 van de 30 patiënten zonder/met milde reacties toch een G2-index te hebben boven de 90^{ste} percentiel grens. Als individuele biomarker van stralingsgevoeligheid is de sensitiviteit (78 %) en de specificiteit (73%) van de G2-test dus enigszins beperkt rekening houdend met het 90^{ste} percentiel van de controlepopulatie als grens voor verhoogde radiosensitiviteit.

Voor de groep van radiotherapiepatiënten werd een SNP analyse uitgevoerd voor polymorfismen op 4 plaatsen van het XRCC1 gen, die in de literatuur reeds in verband werden gebracht met kankerpredispositie: 194 Arg/Trp C>T, 280 Arg/His G>A, 399 Arg/Gln G>A, 632 Gln/Gln G>A. In bovenstaande tabel zijn de resultaten van de SNP analyse weergegeven. Naast de frequenties van de verschillende genotypen is ook de allelfrequentie q gegeven voor de populatie van radiotherapiepatiënten met normale respons of milde reacties (RTOG 1), de populatie van stralingsgevoelige patiënten (RTOG 2-4) en een populatie van 25 gezonde vrijwilligers.

Deze tabel toont aan dat de polymorfismen 280 Arg/His G>A en 399 Arg/Gln G>A weinig invloed hebben op de radiosensitiviteitsstatus. Het genotype geassocieerd met polymorfisme 632 Gln/Gln G>A zou resulteren in een verhoogde stralingsgevoeligheid terwijl het genotype geassocieerd met polymorfisme 194 Arg/Trp C>T eerder een radioprotectieve invloed zou hebben.

IV.3. Onderzoek van de stralingsgevoeligheid van een populatie van borstkankerpatiënten: validatie van de chromosomale radiosensitiviteitstesten.

De waarde van de micronucleus en G2-testen als biomonitor voor radiosensitiviteit werd eveneens gevalideerd via een studie van borstkanker patiënten versus een controle populatie van gezonde vrouwelijke werknemers van het UZ Gent.

Wat de micronucleus (MN) techniek betreft werd zowel de HDR-MN test met een 3.5 Gy *in vitro* bestraling van een bloedstaal bij hoog dosis tempo (1 Gy/min) als de LDR-MN test met een 3.5 Gy *in vitro* bestraling bij laag dosis tempo (4 mGy/min) toegepast. De HDR-MN test geeft voor de controlegroep een gemiddeld aantal MN van 741±105(SD) per 1000 binucleaire cellen waar dat voor de borstkankerpatiënten een gemiddelde waarde van 841±143(SD) geeft: een statistisch significante verhoging ($p < 0.001$) bij toepassing van de Student t-test. Bij toepassing van het 90^{ste} percentiel van de normale populatie als “cut off “ punt voor radiosensitiviteit, blijken 45 % van de patiënten radiosensitief vergeleken met 11 % voor de controlepopulatie.

De LDR-MN test geeft voor de controlegroep een gemiddeld aantal MN van 346±59(SD) per 1000 binucleaire cellen waar dat voor de borstkankerpatiënten een gemiddelde waarde van 442±89(SD) geeft: een statistisch significante verhoging ($p < 0.001$) bij toepassing van de Student t-test. Toepassing van het 90^{ste} percentiel van de controlepopulatie als grens voor verhoogde radiosensitiviteit bij de LDR-MN test geeft aan dat 61 % van de patiënten stralingsgevoelig is vergeleken met 12 % van de controlegroep.

Toepassing van de G2-test waarbij een 0.4 Gy bestraling van een lymfocyten cultuur in de G2 fase van de celcyclus wordt uitgevoerd geeft gemiddeld een G2-index van $1.03 \pm 21(\text{SD})$ chromatide aberraties per metafase, terwijl in de groep borstkankerpatiënten de G2-index $1.24 \pm 26(\text{SD})$ bedraagt. Dit is eveneens een statistisch significant verschil ($p < 0.001$) bij toepassing van de Student t-test. Gebruik makend van het 90^{ste} percentiel van de controlepopulatie als limietwaarde voor verhoogde radiosensitiviteit blijken 43 % van de borstkanker patiënten radiosensitief te zijn waar dat voor de controlegroep 10 % is.

Wat de genetische basis is voor de verhoogde *in vitro* stralingsgevoeligheid van borstkankerpatiënten is niet duidelijk. Een analyse van de data in combinatie met de resultaten van mutatieanalyse toonde aan dat mutaties in de BRCA1 of BRCA2 genen met een sterke kankerpredispositie niet verantwoordelijk zijn voor de verhoogde *in vitro* radiosensitiviteit.

Voor de controlepopulatie werd eveneens de interindividuele variatie vergeleken met de intra-individuele voor de verschillende chromosomale radiosensitiviteitstesten. De resultaten worden hieronder opgegeven in tabelvorm.

TABEL 3. De waarde van de intra-individuele en interindividuele variatie binnen de controlepopulatie voor de verschillende toegepaste chromosomale radiosensitiviteitstesten.

	G2-test	HDR-MN test	LDR-MN test
Intra-individueel	15	9	10
Interindividueel	20	14	17

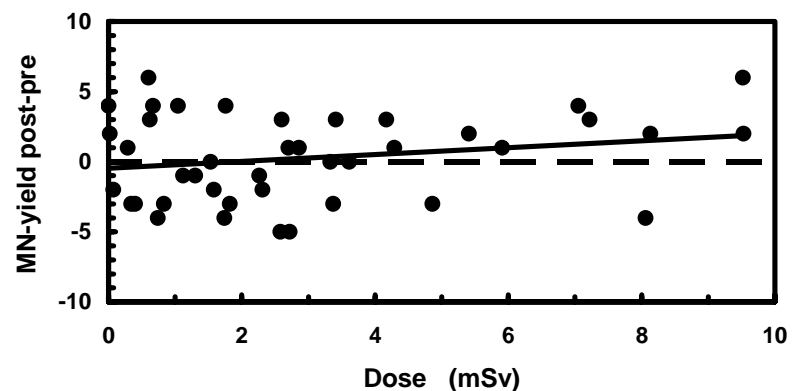
Deze studie bewijst eveneens dat zowel de MN test als de G2 test in staat zijn een verhoogde radiosensitiviteit op populatieniveau aan te tonen. Dit onderzoek gebeurde in nauwe samenwerking met Prof. A. Vral, Laboratorium Histologie UGent.

IV.4. Onderzoek van de radiosensitiviteit van een populatie van stralingswerkers uit de nucleaire industrie.

Resultaten voor de MN test als blootstellingsmonitor voor werknemers blootgesteld aan straling

Gezien we voor alle werknemers volledige kennis hebben van de micronucleus frequentie vóór en na de blootstelling en tezelfdertijd van de blootstelling over één à twee maanden via gedetailleerde fysische dosimetrie, hadden we met deze studie de ideale experimentele set-up om de waarde na te gaan van de micronucleus test als individuele bio-effect monitor in de nucleaire industrie voor de maximale dosiswaarden momenteel opgelopen.

De individuele data voor de werknemers uitgedrukt als het verschil tussen het aantal micronuclei per 1000 tweekernige cellen na en vóór de blootstelling zijn hiernaast afgebeeld als functie van de opgelopen dosiswaarden.



Uit deze figuur blijkt dat de individuele verandering van de micronucleus opbrengst na de blootstelling niet sterk gecorreleerd is met de opgelopen dosis. Een lineaire regressie van de toename van het aantal micronuclei, $MN_{\text{post-pre}}$, versus de opgelopen dosis H , geeft

$$MN_{\text{post-pre}} = 0.244(\pm 0.180) H - 0.46(\pm 0.72).$$

De Spearman's correlatie coefficient r is 0.10 ($p = 0.53$), wat wijst op een zwakke correlatie tussen $MN_{\text{post-pre}}$ and H . In ongeveer de helft van de gevallen is een toename van het aantal MN geobserveerd (21 van de 41 werknemers). Statistische verwerking met de Wilcoxon test geeft ook geen significante toename na de blootstelling ($p = 0.69$).

Hieruit kan worden geconcludeerd dat dosiswaarden beneden 10 mSv zoals nu opgelopen in de nucleaire sector niet kunnen worden gedetecteerd met de eenvoudige micronucleus test zonder centromeerdetectie zelfs niet met kennis van het aantal MN vóór de blootstelling.

Analyse van de baseline micronucleus frequenties vóór de blootstelling

Er werd een statistische analyse uitgevoerd van de baseline micronucleus frequenties vóór de blootstelling met de dosis van de werknemers opgelopen gedurende de voorgaande jaren, de leeftijd en de rookgewoonten. Zoals kon worden verwacht werd een zeer goed correlatie (Spearman correlatie coëfficiënt $r = 0.45$; $p = 0.004$) gevonden tussen het aantal MN vóór de blootstelling en de leeftijd van de werknemers. Een lineaire regressieanalyse geeft een toename van 0.228 MN/jaar per 1000 binucleaire cellen. De geobserveerde leeftijdsafhankelijkheid kan worden beschouwd als een vorm van interne kwaliteitscontrole op de data.

Na correctie van de individuele MN frequenties voor de leeftijdsafhankelijkheid en aanpassing aan de gemiddelde leeftijd van 30.6 jaar, werd de bestudeerde populatie gesorteerd in drie klassen volgens de rookgewoonten (niet-rokers; 1-12 sigaretten per dag; 13-25 sigaretten per dag). Toepassing van de Mann-Whitney test op deze subpopulaties toont geen significante verschillen in MN opbrengst (niet-rokers: gemiddelde MN 8.04; 1-12 sigaretten per dag: gemiddelde MN 7.89; 13-25 sigaretten per dag: gemiddelde MN 8.27; $p > 0.10$). Een gelijkaardige analyse volgens het aantal sigaretjaren toonde eveneens geen correlatie met de MN opbrengst.

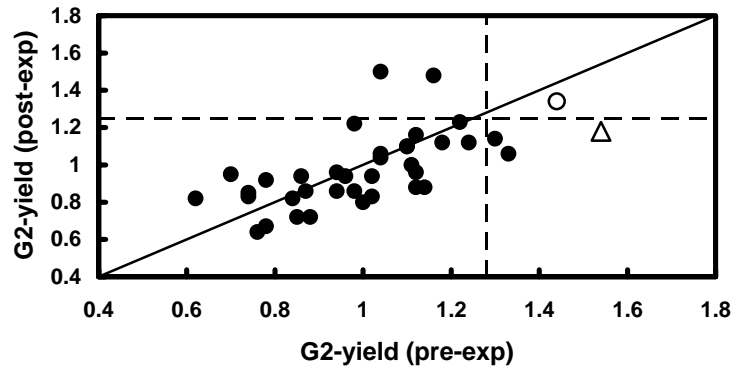
Een analyse van de individuele leeftijd-gecorrigeerde MN opbrengsten versus de gecumuleerde dosis opgelopen in het verleden vóór de blootstelling bij de revisie toonde nagenoeg geen correlatie. Een lineaire regressie analyse gaf het volgende verband:

$$MN = 0.0067 (\pm 0.024) H_{\text{cum}} + 7.98 (\pm 0.59)$$

met H_{cum} de gecumuleerde dosis in mSv. De Spearman correlatie coëfficiënt r is 0.04 wat wijst op een zwakke correlatie tussen het aantal MN en de gecumuleerde dosis.

Resultaten voor de G2-assay als biomonitor voor stralingsgevoeligheid van werknemers blootgesteld aan straling

Een analyse van de G2 index (aantal chromatide breuken en -gaps per metafase) vóór de blootstelling toont geen effect van leeftijd en rookgedrag. De individuele waarden van de G2 index voor de werknemers vóór en na de blootstelling is weergegeven in onderstaande figuur.

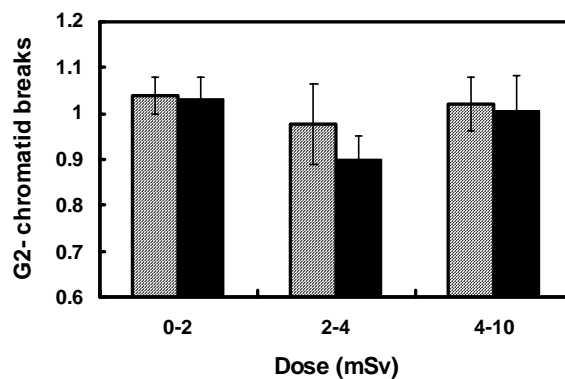


De diagonaal stelt het verloop voor dat verwacht wordt wanneer de G2 index vóór en na de blootstelling dezelfde waarde heeft.

Rekening houdend met het 90^{ste} percentiel, aangegeven in de figuur door de streeplijnen, zijn vier werknemers vóór de blootstelling radiosensitief en drie na de blootstelling. Eén werknemer (aangeduid met de open cirkel) is zowel vóór als na de blootstelling stralingsgevoelig. De figuur toont een acceptabele correlatie van de resultaten van de G2 test vóór en na de blootstelling ($r = 0.74$; $p = 0.001$). Toepassing van de Wilcoxon test geeft geen statistisch significant verschil tussen de gemiddelde waarde vóór (1.02 ± 0.21 (SD)) en na de revisie blootstelling (0.99 ± 0.20 (SD), $p = 0.16$).

Verdere statistische verwerking van de gegevens geven een gemiddelde intra-individuele variatie van 9 % terwijl de interindividuele variatie 20 % bedraagt.

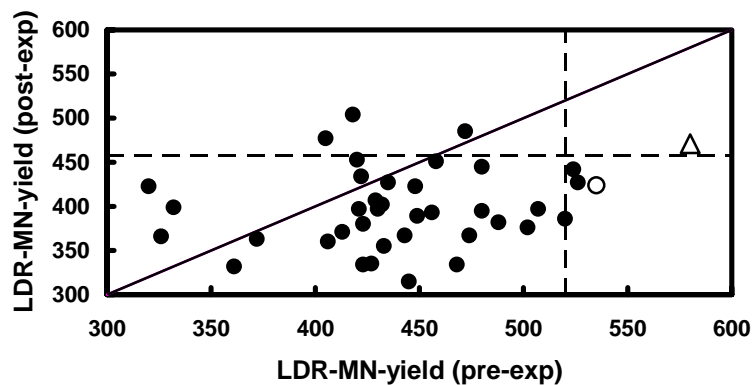
Ten einde na te gaan of de resultaten van de G2 test beïnvloed worden door de blootstelling tijdens de revisie worden in onderstaande figuur de gemiddelde waarden van de G2 assay voor de drie dosisgroepen (0-2 mSv; 2-4 mSv; 4-10 mSv) van de werknemers vóór en na blootstelling vergeleken. De foutenvlaggen zijn de standaard deviaties op deze gemiddelden. Uit de figuur blijkt geen significant verschil vóór en na blootstelling.



Dit wordt bevestigd door een analyse van de individuele toename van de G2 index na de blootstelling vergeleken met vóór de blootstelling, versus de dosis opgelopen door de werknemers H. De bekomen gegevens tonen dus aan dat het resultaat van de G2 test als radiosensitiviteitstest niet beïnvloed wordt door de beroepshalve blootstelling.

Resultaten voor de micronucleus test als biomonitor voor stralingsgevoeligheid van werknemers blootgesteld aan straling

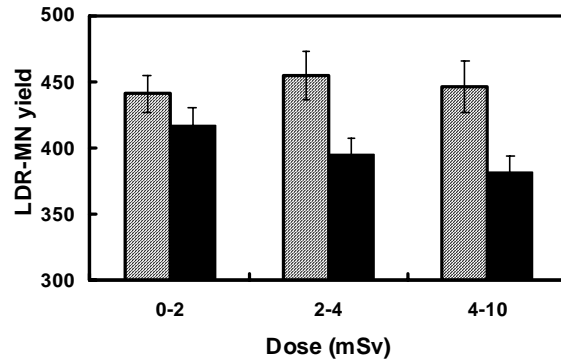
Een vergelijking van de individuele resultaten van de LDR-MN test vóór en na de blootstelling is weergegeven in onderstaande figuur. De diagonalen stellen het verloop voor dat verwacht wordt wanneer het aantal micronuclei vóór en na de blootstelling dezelfde waarde heeft. De resultaten voor de HDR-MN test zijn analoog doch minder uitgesproken. Uit onderstaande figuur blijkt dat de correlatie tussen de LDR-MN data vóór en na de



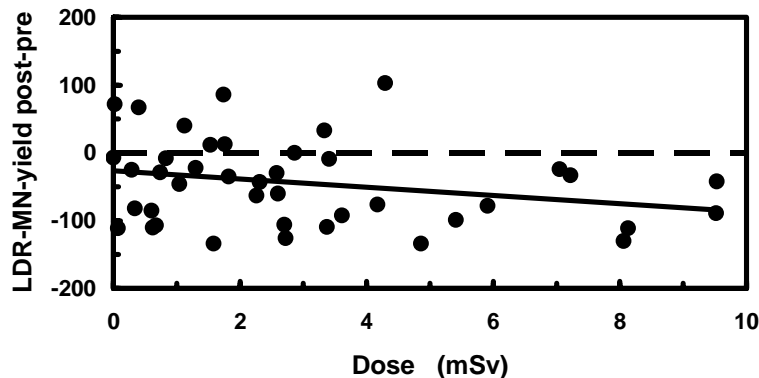
blootstelling zwak is in tegenstelling tot de resultaten met de G2 test : $r = 0.20$. Voor de LDR-MN data is er een bijna systematische verschuiving naar lagere waarden na de blootstelling wat zich weerspiegelt in een significante ($p = 0.0002$) daling van de gemiddelde LDR-MN waarden: 400 ± 45 (SD) na de blootstelling versus 445 ± 58 (SD) vóór de blootstelling. Deze daling is eveneens aanwezig in de HDR-MN data doch minder uitgesproken: 788 ± 77 (SD) na de blootstelling versus 826 ± 80 (SD) vóór de blootstelling.

De streeplijnen in bovenstaande figuren geven de 90^{ste} percentielen aan. Rekening houdend met deze waarden als cut off voor verhoogde radiosensitiviteit komt één werknemer (aangegeven door het driehoek symbool) in aanmerking voor verder onderzoek gezien hij zowel vóór als na de beroepsblootstelling boven de 90^{ste} percentiel valt voor de LDR-MN test. Voor de inter-individuele variaties van de resultaten van de HDR-MN en LDR-MN testen worden analoge waarden bekomen vóór en na de blootstelling: HDR-MN test CV = 9 %; LDR-MN test CV=12 %. Gezien de mogelijke invloed van de dosis opgelopen bij de revisie op het resultaat van de LDR-MN en HDR-MN testen heeft een studie van de intra-individuele variatie hier geen zin.

Ten einde de invloed van de dosis opgelopen tijdens de revisie op de resultaten van de HDR-MN en LDR-MN test na te gaan werden de gemiddelden voor de drie dosisgroepen van de werknemers (0-2 mSv; 2-4 mSv; 4-10 mSv) vóór en na blootstelling vergeleken. Deze vergelijking is hieronder weergegeven voor de LDR-MN test. De foutenvlaggen zijn de standaard deviaties op deze gemiddelden.

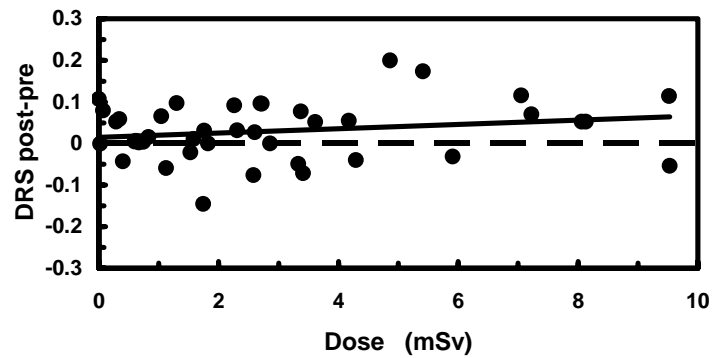


De gearceerde balken geven de waarden vóór de revisie, de zwarte balken de waarden na de revisie. Uit deze figuur blijkt dat de blootstelling tijdens de revisie een dosis-afhankelijke reductie van de chromosomale stralingsgevoeligheid met zich meebrengt. Ook een analyse van de individuele data wijst in dezelfde richting. Hieronder is de individuele verandering van het resultaat van de LDR-MN test na de blootstelling vergeleken met vóór de blootstelling weergegeven als functie van de opgelopen dosis.



Deze figuur toont ontegensprekelijk aan dat een dosis van 5-10 mSv, recent opgelopen bij de revisie van de reactoren, een reductie van de chromosomale stralingsgevoeligheid met zich meebrengt. De data bekomen met de HDR-MN test geven analoge resultaten doch minder uitgesproken.

Combinatie van de data bekomen door *in vitro* bestraling van bloedstalen bij hoog en laag dosistempo via de HDR-MN en de LDR-MN testen levert de “dose rate sparing” (DRS) factor, maat voor de DNA herstelcapaciteit. In onderstaande figuur zijn de individuele gegevens van de toename van de DRS factor uitgezet versus de dosis opgelopen bij de revisie. Deze figuur toont aan dat voor een aantal werknemers met dosis boven 5 mSv de blootstelling door de revisie een verhoogd DNA herstel met zich meebrengt: de “adaptive response”. Dat dit effect niet bij alle werknemers wordt waargenomen is in overeenstemming met literatuurgegevens aangaande de “adaptive response” geïnduceerd door *in vitro* bestraling. In onze studie fungeert de beroepshalve *in vivo* blootstelling tijdens de revisie als “conditioning dose” en de 3.5 Gy *in vitro* dosis van het bloedstaal als “challenging dose”.



Waarom de resultaten van de G2 test de “adaptive response” niet vertonen is mogelijks te wijten aan het feit dat voor deze test de *in vitro* bestraling ongeveer drie dagen na het opstarten van de bloedcultuur gebeurt waar dat voor de HDR-MN en LDR-MN gebeurt bij het begin van de bloedcultuur. Volgens literatuurgegevens is het “adaptive response” effect inderdaad slechts een paar dagen na de “conditioning dose” actief. Een analyse van de resultaten van de chromosomale radiosensitiviteitstesten vertrekkende van bloedstalen bekomen vóór de revisie versus de dosis opgelopen in het verleden toont geen effect van de dosis, in overeenstemming met de relatief korte levensduur van het effect.

V. Bespreking

De extensieve studies met de chromosomale radiosensitiviteitstesten, uitgevoerd in het kader van huidig project hebben aangetoond dat ze bruikbaar zijn voor de bepaling van de stralingsgevoeligheid van populaties doch dat een bepaling op basis van één bloedstaal een onvoldoende specifiek resultaat oplevert om deze testen momenteel te gebruiken voor individuele stralingsgevoeligheidsbepaling in arbeidsgeneeskundig kader. Uit de populatie van stralingswerkers kwamen twee kandidaten naar voor met systematisch verhoogde chromosomale stralingsgevoeligheid op basis van de twee bloedafnamen uitgevoerd in het kader van de studie met tussenperiode van één tot enkele weken. Een validatiestudie met een populatie van radiotherapiepatiënten zoals uitgevoerd binnen het kader van het project doch waarbij het resultaat van meerdere bloedafnamen in rekening wordt gebracht voor afleiding van de gevoeligheid en specificiteit van de chromosomale radiosensitiviteitstesten zou definitief uitsluitel kunnen geven over de waarde van deze testen op individueel vlak. Multipole bloedafname op verschillende tijdstippen in een arbeidsgeneeskundig kader is echter ook in de praktijk moeilijk haalbaar.

Uit de studie van de stralingswerkers is verder gebleken dat recente (tot enkele dagen vóór de bloedafname) blootstellingen een invloed hebben op de individuele chromosomale radiosensitiviteitsstatus door het mechanisme van de “adaptive response”. De studie uitgevoerd binnen het project is de eerste studie die direct aantoot via bepaling van de chromosomale radiosensitiviteit dat een beroepshalve blootstelling van 5-10 mSv in een korte periode een positief effect heeft op het DNA herstel en de stralingsgevoeligheid laat dalen. De invloed van blootstelling aan straling en andere mutagene factoren en eveneens van fysiologische factoren in het bloed op het eindresultaat van chromosomale radiosensitiviteitstesten is een groot nadeel voor deze fenotypische aanpak van individuele stralingsgevoeligheidsbepaling.

Naar aanleiding van de studies van de chromosomale radiosensitiviteit bij werknemers uit de nucleaire sector en bij de controlepopulaties werd een discussie gevoerd met verschillende interbedrijfsgeneeskundige diensten naar de socio-ethische aspecten van biomonitoring van susceptibiliteit. De volgende vragen kwamen hierbij aan bod:

- (1) Welke is de rationale voor het gebruik van genetische monitoring om werknemers op te volgen en dit in vergelijking met de vandaag toegepaste follow-up technieken?
- (2) Hoe sterk verschillen de conventionele en de genetische technieken op het gebied van accuraatheid, relevantie, noodzaak en gevolgen ?
- (3) Welke sociale problemen kan het gebruik van nieuwe genetische onderzoeksmethoden met zich meebrengen wanneer ze geïntroduceerd worden in de arbeidsgeneeskundige praktijkvoering ?
- (4) Hoe ziet men de rapportering van de resultaten van het genetisch susceptibiliteitsonderzoek naar de deelnemers ?

Veel aandacht werd besteed aan de meldingsplicht waardoor het individu op de hoogte moet worden gesteld van het testresultaat van studies zoals uitgevoerd binnen het project. Probleem hierbij is dat bij de huidige stand van zaken de chromosomale radiosensitiviteitstesten voldoende betrouwbare resultaten kunnen opleveren voor een populatie doch niet voor een individu. Er werd daarom besloten de groepsresultaten anoniem mee te delen aan de deelnemers en af te zien van een mededeling van het individueel resultaat. Individuele rapportering zou voor een aantal betrokkenen immers leiden tot te verre gaande conclusies

voor henzelf en hun familieleden rekening houdend met de beperkte specificiteit van de testen.

Studies van patiënten behandeld met radiotherapie hebben aangetoond dat genetische factoren verantwoordelijk zijn voor de patiënt gerelateerde variabiliteit. Men is het er nu over eens dat met uitsluiting van patiënten met genetische syndromen geassocieerd met een hoge radiosensitiviteit deze variabiliteit niet het resultaat is van mutaties in één gen doch dat de individuele stralingsgevoeligheid het resultaat is van verschillende interindividuele variaties in het genoom. Individuen die allelen dragen met polymorfismen leidend tot een minder efficiënte DNA herstelcapaciteit en/of een deregulatie van de checkpoint-controle van de celcyclus zullen een hogere susceptibiliteit vertonen voor stralingsgeïnduceerde kanker. Meer dan 100 genen komen tussen in de detectie van DNA schade en DNA herstel. Combinatie van polymorfismen in deze genen zullen ook grotendeels de individuele stralingsgevoeligheid in een populatie van gezonde individuen bepalen. In het kader van huidig project hebben we daarom technieken op punt gesteld voor individuele analyse van de “Single Nucleotide Polymorphisms”. SNP’s vormen immers ongeveer 90 % van de natuurlijk voorkomende DNA sequentievariaties. Het effect op de stralingsgevoeligheid van een viertal SNP’s in het XRCC1 gen, dat een cruciale rol speelt in de “base excision repair”, en waarvan gekend is dat ze geassocieerd zijn met kankerpredispositie werd onderzocht binnen het kader van het project. Dergelijke studies dienen uitgebreid te worden naar het groot aantal genen betrokken bij DNA herstel, de celcyclus controle en mechanismen van oxidatieve schade. Dit moet de basis leggen voor “radiogenomics” wat moet leiden tot de radiosensitiviteitsbepaling vertrekkende van het individueel genomisch profiel van hoger vermelde genen. Recent werd aangetoond dat de som van risicoallelen een eerste eenvoudige benadering is voor de individuele bepaling van de stralingsgevoeligheid. Een belangrijk voordeel van de genotypische aanpak voor bepaling van de individuele susceptibiliteit is dat blootstellingen en fysiologische factoren geen invloed hebben op het resultaat. Genomisch DNA verkregen uit perifere bloed lymfocyten volstaat. Gebruik makend van de moleculaire technieken toegepast binnen huidig project kan SNP bepaling eveneens op grote schaal worden toegepast.

In conclusie kunnen we stellen dat chromosomale radiosensitiviteitstesten bruikbaar en gevoelig zijn voor studies van de radiosensitiviteit van populaties doch momenteel niet toepasbaar op individueel vlak vertrekkende van één bloedstaal o.a. door de waargenomen invloed van mutagene blootstellingen en fysiologische factoren in het bloed. Voor individuele radiosensitiviteitsbepaling dringt de genotypische aanpak via “radiogenomics” op basis van een uitgebreide SNP-analyse zich op.



Promotor: Prof. Dr. L. de Ridder

Wetenschappelijk medewerker: Prof. Dr. Anne Vral

Universiteit Gent
Faculteit Geneeskunde
Dept. Anatomie, Embriologie, Histologie en Medische Fysica
Laboratorium voor Histologie

I. INLEIDING

I.1. Context en algemeen kader van het onderzoek.

Het *in vivo* effect van blootstelling aan ioniserende straling op de cellulaire structuren en het gevolg hiervan voor de gezondheid van de mens is afhankelijk van de interacties tussen straling en de weefsels. Dit hangt bij uitwendige blootstelling in de eerste plaats af van de absorptie van straling door de betrokken weefsels. Bij absorptie van straling door de doelwitorganen induceert straling in de cellulaire structuren van deze organen DNA schade zoals enkelstrengige breuken (ssb), dubbelstrengige breuken (dsb), base schade, Afhankelijk van de complexiteit van de schade en de hoeveelheid schade zal de cel deze schade herstellen, niet herstellen of foutief herstellen. Foutief herstelde schade zal resulteren in mutaties en chromosoom aberraties die via een meerstaps proces kunnen leiden tot carcinogenese.

De door straling geïnduceerde meest letale schade is de DNA dsb die wanneer niet hersteld of foutief hersteld door de cel zal resulteren in chromosoom aberraties. Literatuurgegevens hebben aangetoond dat het aantal chromosoom aberraties geïnduceerd door straling sterk kan verschillen van individu tot individu en dat deze interindividuele verschillen in chromosomale radiosensitiviteit gecorreleerd zijn met 1) verschillen in herstelcapaciteit van de door straling geïnduceerde DNA-lesies en 2) defecten in het celcyclus 'checkpoint' controle mechanisme. Mutaties in herstelgenen van het DNA en celcyclus 'checkpoint' genen leiden tot een verhoogde chromosomale stralingsgevoeligheid en een verhoogd kankerrisico.

In het kader van het project zullen we technieken op punt stellen waarmee de individuele variabiliteit voor stralingsgevoeligheid zal kunnen worden onderzocht en dit zowel op chromosomaal niveau (cytogenetische analyse) als op genetisch niveau (mRNA expressie, gene profile).

I. 2. Doelstellingen van het onderzoek

De hoofddoelstelling van onze groep (RUG1, promotor Prof. Dr. L. De Ridder) en RUG2 (promotor Prof. Dr. H. Thierens) is het onderzoek van de waarde, het nut en de toepasbaarheid van genotoxiciteitstesten als kandidaat-biomerkers voor susceptibiliteit voor ioniserende stralen in de arbeidsgeneeskunde van stralingswerkers. Deze testen dienen gevoelig, specifiek en predictief genoeg te zijn om een betrouwbare monitoring uit te voeren naar stralingsgevoeligheid.

Hierbij zullen we in de eerste plaats kandidaat genotoxiciteitseffect-biomerkers optimaliseren en standaardiseren als biomerkers voor stralingsgevoeligheid. Hierbij denken we aan cytogenetische testen zoals de micronucleus test en de G2 test. Deze testen zullen dan worden toegepast en gevalideerd via 1) een populatie van borstkankerpatiënten, dit daar uit literatuur blijkt dat ongeveer 30-40% van de totale populatie van borstkankerpatiënten een verhoogde chromosomale stralingsgevoeligheid vertonen met bovenvernoemde technieken en 2) een populatie van radiotherapiepatiënten waarvan geweten is dat 1% een verhoogde klinische stralingstoxiciteit vertoont. De waarde van de vermelde genotoxiciteitstesten voor stralingsgevoeligheid in de arbeidsgeneeskunde zal worden nagegaan via een studie van een populatie van stralingswerkers uit de nucleaire industrie.

Aangezien een verhoogde chromosomale stralingsgevoeligheid waarschijnlijk het gevolg is van defecten t.h.v. DNA herstelgenen en celcyclus 'checkpoint' genen zal bij de patiënten en werknemers die een verhoogde chromosomale stralingsgevoeligheid vertonen met de G2 of

G0-micronucleus (G0-MN) test de expressie (mRNA) van DNA repairgenen en celcyclus 'checkpoint' genen onderzocht worden.

Studies uitgevoerd om deze doelstellingen te onderzoeken:

- ontwikkelen en optimaliseren van de G2 test en G0-MN test (verschillende bestralingsprocedures).
- analyse van de reproduceerbaarheid, betrouwbaarheid en gevoeligheid van de G2 test en de G0-MN test.
- toepassing van de radiosensitiviteitstesten, G2 test en G0-MN test, op een populatie van stralingswerknemers uit de nucleaire sector (zie verslag RUG2, promotor Prof. Dr. H. Thierens).
- validatie van de G2 test en G0-MN test in een populatie van borstkankerpatiënten.
- validatie van de G2 en G0-MN test in een populatie van radiotherapiepatiënten (zie verslag RUG2, promotor Prof. Dr. H. Thierens).
- onderzoek naar het mechanisme verantwoordelijk voor de vorming van G2 chromatide breuken.
- correlatie tussen verhoogde chromosomale stralingsgevoeligheid en de expressie van genen betrokken bij het 'processen' van stralings-geïnduceerde DNA schade.

II. THEORETISCH KADER

Literatuurgegevens hebben reeds aangetoond dat de G2 test en de G0-MN test goede biomerkers zijn voor de identificatie van individuen met een verhoogde chromosomale stralingsgevoeligheid. Deze genotoxiciteitstesten laten toe om een onderscheid te maken tussen patiënten leidend aan genetische syndromen gepaard gaande met een verhoogde stralingsgevoeligheid en eveneens een kanker-voorbeschiktheid (bvb. Ataxia telangiectasia patiënten) en individuen uit een normale populatie. De G2- en G0-MN test worden als dusdanig nu reeds gebruikt voor identificatie van individuen als dragers van genetische afwijkingen met kankerpredispositie (Scott et al. 1999). Uit recente literatuur blijkt tevens dat een belangrijk percentage van kankerpatiënten een verhoogde chromosomale stralingsgevoeligheid vertoont met bovenvermelde cytogenetische testen (Scott et al., 1998; Scott et al., 1999; Terzoudi et al., 2000; Papworth et al., 2001; Baria et al., 2001; Riches et al., 2001). Deze verhoogde chromosomale stralingsgevoeligheid is waarschijnlijk het gevolg van defecten t.h.v. DNA herstelgenen en celcyclus 'checkpoint' genen. Genen betrokken bij het herstellen van DNA schade worden dan ook beschouwd als laag penetrante kankerpredispositiegenen (Burrill et al. 2000, Roberts et al. 1999). Het nut en de toepasbaarheid van genotoxiciteitstesten als kandidaat-biomerkers voor susceptibiliteit voor ioniserende stralen is dan ook van groot belang in de arbeidsgeneeskunde van stralingswerkers en vormt het hoofddoel van dit studieproject.

III. METHODEN

III.1. Analyse technieken.

1. Geoptimaliseerde G2 test: de G2 procedure van het Paterson Institute, Manchester (Scott et al. 1999) werd gevolgd mits een aantal wijzigingen:

- 0.5 ml heparine bloed wordt toegevoegd aan 4.5 ml compleet cultuur milieu bestaande uit RPMI-1640 medium + 10 % FCS + 0.05 % L-glutamine + peniciline/streptomycine (50U/ml peniciline en 50µg/ml streptomycine; Gibco). 10 µl phytohaemagglutinine (PHA- P) (1% PHA-P

oplossing; Difco, Biotrading) wordt toegevoegd als mitogen. Per donor worden telkens twee culturen opgestart: één om te bestralen en één die dient als controle. Na 70 uur incubatie bij 37°C in een CO₂ incubator worden de te bestralen culturen blootgesteld aan een dosis van 0.4 Gy gamma stralen bij 37°C. 30 minuten na bestraling wordt 75 µl colcemid toegevoegd (eindconcentratie: 0.15µg/ml; Sigma-Aldrich) en 90 min na bestraling worden de culturen gestopt door ze op ijs te brengen gedurende 5 minuten. Na centrifugatie volgt een koude hypotone shock met 0.075M KCl, gedurende 15 min op ijs. Vervolgens worden de cellen gefixeerd in koude methanol:ijsazijn (3:1) en in de koelkast geplaatst. De volgende dag wordt de celsuspensie nog 3 x gefixeerd met methanol:ijsazijn (3:1). Vervolgens worden de cellen gedruppeld op draagglaasjes, gedroogd en gekleurd met 6% Romanowsky-Giemsa in Hepes buffer (pH 6.5) gedurende 20 min. Chromatidebreuken worden geanalyseerd in 50 goed gespreide metafasen. Het aantal stralingsgeïnduceerde chromatidebreuken wordt verkregen door het aantal breuken verkregen in de controle stalen af te trekken van het aantal breuken verkregen in de bestraalde stalen. Per staal worden 2 preparaten gemaakt en allen worden gecodeerd en geanalyseerd door 2 personen (per staal (bestraald en controle) telt elke scorer 25 metafasen op één preparaat).

2. *Geoptimaliseerde micronucleus (MN) test:*

Voor de MN test wordt 0.5 ml bloed toegevoegd aan 1.5 ml compleet cultuur milieu (zie G2 test).

Per staal worden, afhankelijk van de studie, meerdere culturen opgestart: cultuur 1 wordt bestraald met 3.5 Gy Co-gamma stralen bij 37°C aan een hoog dosistempo (1Gy/min) (HDR = high dose rate); cultuur 2 wordt bestraald met 3.5 Gy Co-gamma stralen bij 37°C aan een laag dosistempo (4mGy/min) (LDR = low dose rate); cultuur 3 wordt bestraald met 3.5 Gy Co-gamma stralen bij 37°C aan een hoog dosistempo (1Gy/min) maar PHA wordt pas toegevoegd 6 h na bestraling (HDR-DS (delayed stimulation)); cultuur 4 wordt niet bestraald (= controle staal). Het “dose rate sparing” effect van LDR bestraling t.o.v. HDR bestraling (DRS) = $1 - Y_{LDR}/Y_{HDR}$ wordt gebruikt als maat voor de herstelcapaciteit van de cel.

24 h na PHA stimulatie wordt cytochalasine B (6µg/ml; Sigma-Aldrich) toegevoegd om de cytokinese te blokkeren. Na een cultuurperiode van 70h bij 37 °C in een CO₂ incubator worden de cellen geogst door een koude hypotone shock met 0.075M KCl. Vervolgens worden de cellen 1x gefixeerd in methanol:ijsazijn:Ringer (0.9% NaCl) oplossing (10:1:11). De cellen worden overnacht bewaard in de koelkast (4°C) en vervolgens nog 3x gefixeerd met methanol:ijsazijn (10:1) (Vral et al., 1994). Na de laatste fixatie wordt de celsuspensie op draagglaasjes gedruppeld en gekleurd met 6% Romanowsky-Giemsa in Hepes buffer gedurende 20 min. Per situatie worden telkens 2 MN preparaten gemaakt, gecodeerd en geanalyseerd door 2 personen. Per preparaat worden micronuclei gescoord in 500 binucleaire cellen (BN) (lichtmicroscopie, 10× 40) volgens de criteria van Fenech (1993). In totaal worden per staal telkens 1000 BN cellen geteld.

De gedetailleerde procedures en resultaten van deze standaardisatie en optimalisatie methodologie werden gepubliceerd in Radiation Research (**artikel 3** in bijlage II).

In het kader van de optimalisatie en standaardisatie procedure van de G2 test nam de onderzoeksgroep tevens deel aan “The technical workshop on the G2 assay” die werd georganiseerd door de ‘University of St.-Andrews’ in Schotland. De resultaten van deze workshop werden gepubliceerd in Int. J. Rad. Biol. (**artikel 4** in bijlage II).

III.2. Materiaal

1. Studie i.v.m. de optimalisatie, reproduceerbaarheid, betrouwbaarheid en gevoeligheid van cytogenetische testen als biomerkers voor stralingsgevoeligheid.

- bij 14 gezonde donoren (4 mannen en 10 vrouwen, leeftijd tussen 23 en 55 jaar) werd de stralingsgevoeligheid geanalyseerd door middel van de G2- en MN test. Om de intra- en interindividuele variaties te bestuderen werden bij 2 van de 14 donoren 9 bloedstalen afgenomen op verschillende tijdstippen gespreid over een periode van 1 jaar. Uitgaande van 1 bloedstaal werden ook verschillende culturen opgestart om de intrinsieke reproduceerbaarheid van de testen te analyseren. Bij één donor, geïdentificeerd als zijnde stralingsgevoelig met de G2 test, werd de test nog tweemaal herhaald om dit resultaat te bevestigen. Deze studie werd goedgekeurd door de Ethische Commissie van de Universiteit Gent.

2. Toepassing van de radiosensitiviteitstesten, G0-MN test en G2 test, op een populatie van stralingswerknemers uit de nucleaire sector.

De toepassing van chromosomale radiosensitiviteitstesten in de arbeidsgeneeskunde is het meest relevant voor de werknemers met de hoogste blootstelling aan straling. Wat de nucleaire industrie betreft vormen de externe werkers betrokken bij de revisie van reactoren (“jumpers”) de meest kritische populatie. Bij de werkzaamheden verbonden aan de revisie lopen ze soms relatief hoge dosissen op op relatief korte termijn (tot 15 mSv per maand). Hun werkzaamheden bestaan uit taken verbonden aan de schoonmaak, het onderhoud en het herstel van componenten in de “warme” zone van de reactoren.

In het kader van het project werd een biomonitoring programma uitgewerkt voor populaties van externe werkers betrokken bij de revisies van de 4 kernreactoren van Doel. De studie gebeurde in samenwerking met de Medische Dienst KCD o.l.v. Dr. M. Barbé. Een gedetailleerde beschrijving van deze groep vindt men in het verslag van RUG2, promotor Prof. Dr. H. Thierens.

3. Validatie van de G0-MN en G2 test bij een populatie van borstkankerpatiënten.

In deze studie werd de chromosomale stralingsgevoeligheid onderzocht bij een grote groep van vnl. familiale borstkankerpatiënten (n=62) en dit door middel van de G2-test en de G0-MN test. Een klein aantal van deze patiënten waren dragers van de BRCA 1/2 mutatie.

Voor deze studie werden heparine bloedstalen afgenomen bij 60 gezonde vrouwen, leeftijd tussen 23 en 60 jaar (gemiddelde 37 ± 12) en bij 62 borstkankerpatiënten, leeftijd tussen 29 en 66 jaar (gemiddelde 44 ± 10), en dit gedurende een periode van ongeveer 2 jaar. De studie werd uitgevoerd in samenwerking met het Centrum voor Medische Genetica van het Universitair Ziekenhuis Gent. De patiënten opgenomen in onze studie werden in het Centrum voor medische genetica gescreend op de aanwezigheid van mutaties in de borstkankergenen BRCA1 en 2 en voldeden aan de volgende criteria:

- a) patiënten met 3 eerstegraads verwanten die reeds borstkanker hebben gehad (n=27).
- b) patiënten met tenminste 2 eerste - of tweedegraads verwanten waarbij borstkanker werd vastgesteld vóór de leeftijd van 50 jaar (n = 24).
- c) patiënten met bilateraal borstkanker en beide tumoren gediagnosticeerd voor de leeftijd van 50 jaar (n = 8; 5 voldoen ook aan criterium a en 3 voldoen aan criterium b).
- d) patiënten gediagnosticeerd met borstkanker voor de leeftijd van 35 jaar en waarbij geen familiaal borstkanker voorkomt (n = 11).

De bloedstalen werden afgenomen tijdens de genetische consultatie. Dit was gemiddeld 2-3 jaar na de borstoperatie en radio/chemotherapie (tussen 9 maand en 21 jaar). Deze studie werd goedgekeurd door de Ethische Commissie van het Universitair Ziekenhuis Gent en alle patiënten tekenden een toestemmingsformulier.

4. Validatie van de G2 en G0-MN test bij een populatie van radiotherapiepatiënten.

Een gedetailleerde beschrijving van deze populatie vindt men in het verslag van RUG2, promotor Prof. Dr. H. Thierens.

5. Onderzoek naar het mechanisme verantwoordelijk voor de vorming van G2 chromatide breuken.

- voor deze studie werd de G2 test uitgevoerd op bloedstalen van 4 gezonde donoren. De bloedstalen werden bestraald met verschillende doses lage LET γ -stralen en hoge LET neutronen.

6. Correlatie tussen verhoogde chromosomale stralingsgevoeligheid en defecten t.h.v. van genen betrokken bij het 'processen' van stralingsgeïnduceerde DNA schade.

- voor deze studie werd gebruik gemaakt van bloedstalen van gezonde donoren en patiënten. Op een fractie van het bloed werd een lymfocytenscheiding uitgevoerd en werden de geïsoleerde lymfocyten ingevroren in vloeibare stikstof.

IV. RESULTATEN EN BESPREKING.

1. Studie i.v.m. de optimalisatie, de reproduceerbaarheid, betrouwbaarheid en gevoeligheid van cytogenetische testen als biomerkers voor stralingsgevoeligheid.

Bij de start van dit project werden de G2 test en G0 MN test geoptimaliseerd (protocol zie methoden) en werd de gevoeligheid en betrouwbaarheid van de test als biomarker voor de identificatie van stralingsgevoelige individuen geanalyseerd. Hiervoor werd een grondige studie uitgevoerd van de inter- en intra-individuele variabiliteit verkregen met de G0-MN test en G2 test. De resultaten van deze studie werden gepubliceerd in Radiation Research (**artikel 3** in bijlage II) en in Int. J. Low Radiation (**artikel 11** in bijlage II). Voor een volledig overzicht van de resultaten en discussie verwijzen we naar de artikels waarvan referentie werd toegevoegd in bijlage.

Hieronder volgt een korte samenvatting en bespreking van deze resultaten:

Om kwantificatie van een verhoogd risico voor een bepaald individu toe te laten is het belangrijk dat de inter-experimentele / intra-individuele variatie duidelijk lager is dan de inter-individuele variatie binnen een normale populatie. Daarom is een accurate bepaling van de intra- en inter-individuele variabiliteit noodzakelijk vooraleer deze testen kunnen gebruikt worden als biomerkers voor individuele stralingsgevoeligheid en kanker susceptibiliteit.

In dit kader werd bij de aanvang van dit project gestart met een onderzoek naar de intra- en inter-individuele variabiliteit verkregen met de MN test (HDR, LDR en DS) en de G2 assay. Hiertoe werd een populatie van 14 gezonde donoren onderzocht (Table 1). Om inzicht te krijgen in de intra-individuele variabiliteit werden bij twee donoren beide testen meermaals toegepast gespreid over een periode van één jaar (Table 2). Uitgaande van één bloedstaal werden tevens multi-pele culturen opgestart om de reproduceerbaarheid van de testen te analyseren onder omstandigheden waar variaties te wijten aan individuele of experimentele

parameters worden uitgesloten (Table 3). Voor 1 donor, geïdentificeerd als stralingsgevoelig met de G2 test, werd de test tweemaal herhaald om deze resultaten te bevestigen.

Table 1. Summary of the data used for the study of the interindividual variation among donors for different chromosomal radiosensitivity assays.

Donor/ Gender	Date G2 (M/D/Y)	G2 index	Date MN (M/D/Y)	HDR-MN	LDR-MN	HDR-DS- MN	DRS
1/M	7/2/99	1.14	10/16/00	0.752	0.315	0.603	0.58
2/F	7/2/99	1.14	10/16/00	0.652	0.303	0.519	0.54
3/F	10/22/99	0.92	10/16/00	0.925	0.332	0.671	0.64
4/M	10/22/99	0.98	12/11/00	0.778	0.358	0.650	0.54
5/M	10/7/99	0.80	-	-	-	-	-
6/F	12/9/99	1.04	-	-	-	-	-
7/M	1/27/00	1.14	10/27/00	0.826	0.432	0.780	0.48
8/F	1/27/00	1.28	10/27/00	0.769	0.366	0.688	0.52
9/F	3/20/00	0.92	3/20/00	0.845	0.309	0.599	0.63
10/F	3/20/00	1.02	3/20/00	0.808	0.305	0.620	0.62
11/F	3/20/00	1.18	3/20/00	0.808	0.337	0.637	0.58
12/F	3/20/00	1.10	3/20/00	0.935	0.311	0.856	0.67
13/F	12/11/00	1.58	3/13/00	0.791	0.454	0.603	0.43
14/F	12/11/00	1.20	3/13/00	0.829	0.502	0.664	0.40
15/F	-	-	3/13/00	0.763	0.405	0.683	0.47
Me an		1.10		0.806	0.364	0.659	0.55
SD		0.19		0.073	0.065	0.085	0.09
CV(%)		17		9	18	16	13
90% P		1.35		0.900	0.447	0.768	0.44

*G2 index : number of breaks and gaps/metaphase

HDR-MN, LDR-MN, HDR-DS-MN : number of MN/binucleate cell

DRS : $1 - Y_{LDR}/Y_{HDR}$ (Y=yield)

Table 2. Summary of the data used for the study of the intraindividual variation for two donors for different chromosomal radiosensitivity assays.

Donor 7

Date G2 (M/D/Y)	G2 index	Date MN (M/D/Y)	HDR-MN	LDR-MN	HDR-DS-MN	DRS
10/7/99	0.80	-	-	-	-	-
1/27/00	1.14	1/27/00	0.826	0.432	0.780	0.48
1/31/00	1.18	1/31/00	0.907	0.451	0.700	0.50
2/8/00	0.92	2/8/00	0.922	0.410	0.686	0.56
2/17/00	1.28	2/17/00	0.849	0.326	0.718	0.62
3/20/00	1.20	3/20/00	0.980	0.358	0.686	0.64
9/10/00	1.14	9/10/00	0.786	0.290	0.778	0.63
10/10/00	1.08	10/10/0	0.706	0.361	0.675	0.49
10/16/00	1.22	-	-	-	-	-
Mean	1.11		0.854	0.375	0.718	0.56
SD	0.15		0.092	0.058	0.044	0.07
CV (%)	14		11	16	6	12

Donor 8

Date G2 (M/D/Y)	G2 index	Date MN (M/D/Y)	HDR-MN	LDR-MN	HDR-DS-MN	DRS
10/22/99	1.24	-	-	-	-	-
1/27/00	1.28	1/27/00	769	0.366	0.688	0.52
1/31/00	0.94	1/31/00	815	0.458	0.626	0.44
2/8/00	1.58	2/8/00	845	0.469	0.654	0.45
2/17/00	1.20	2/17/00	764	0.468	0.797	0.39
2/25/00	1.16	2/25/00	724	0.394	0.634	0.46
9/10/00	1.06	9/10/00	647	0.269	0.638	0.58
10/10/00	1.02	16/10/00	700	0.371	0.678	0.47
10/16/00	1.38	-	-	-	-	-
Mean	1.21		752	0.399	0.673	0.47
SD	0.20		68	0.073	0.059	0.06
CV (%)	16		9	18	9	14

Table 3. Summary of the data used for the study of the variation between different cultures for donor 13 for different chromosomal radiosensitivity assays.

Culture	G2-index	HDR-MN	LDR-MN	DRS
1	1.12	0.770	0.535	0.31
2	0.98	0.831	0.428	0.49
3	1.10	0.750	0.413	0.45
4	1.00	0.825	0.457	0.45
5	1.02	0.747	0.429	0.43
6	1.10	0.821	0.462	0.44
Mean	1.05	0.791	0.454	0.43
SD	0.06	0.039	0.044	0.06
CV (%)	6	5	10	15

De resultaten van deze studie tonen aan dat zowel voor de G2 als de G0-MN test de intra-individuele variabiliteit groot is en niet significant verschillend van de inter-individuele variabiliteit wat de bepaling van de individuele stralingsgevoeligheid binnen een normale populatie bemoeilijkt en in vraag stelt.

In onze studie werd zowel voor de G0-MN test als de G2 test het 90ste percentile van de normale populatie berekend en gebruikt als drempelwaarde waarboven een individu kan beschouwd worden als stralingsgevoelig (dit in overeenstemming met de studies van D. Scott (IJRB 75, 1-10, 1999)). De resultaten van de 2 donoren die meermaals bloed gaven op verschillende tijdstippen verspreid over 1 jaar (Table 2), tonen aan dat in de meeste gevallen de G0-MN en G2 waarden beneden deze drempelwaarde liggen, maar dat er ook occasioneel hogere waarden (boven de drempelwaarde) worden gescoord. Op basis van deze hoge waarden zouden deze personen als stralingsgevoelig worden beschouwd wat echter niet blijkt uit alle overige waarnemingen. Dit stelt de waarde van chromosoomaberratie testen voor het bepalen van de individuele stralingsgevoeligheid gebaseerd op één bloedstaalname in vraag. Deze resultaten werden verder bevestigd in een bijkomende studie waarbij van donor 13, die stralingsgevoelig bleek te zijn met de G2 test in onze eerste studie (G2 score = 1.58, 90% P of drempelwaarde = 1.35, zie Table 1), een tweede en een derde bloedstaal werd genomen. Normale G2 waarden (1.07 en 1.04) werden verkregen in deze volgende experimenten.

De reden waarom occasioneel bij bepaalde personen hoge waarden worden verkregen is nog niet duidelijk. Het feit dat tijdens de experimenten telkens bloedstalen van meerdere personen gelijktijdig werden opgestart liet ons toe om uit te sluiten dat de hoge waarden, die tijdens één bepaald experiment slechts bij één individu werden gescoord, zouden te wijten zijn aan externe experimentele parameters zoals serum batch, stralingsdosis, temperatuur,... (zie Table 1 and 2). De lage variatie coëfficiënten verkregen wanneer G0-MN en G2 waarden worden vergeleken van verschillende culturen opgestart uitgaande van hetzelfde bloedstaal, wijzen verder op een goede intrinsieke reproduceerbaarheid van de test (Table 3). Deze bevindingen wijzen er aldus op dat de variabele en occasioneel hoge waarden die gevonden worden voor éénzelfde individu een intrinsieke eigenschap zijn van het individu zelf en misschien het gevolg zijn van het feit dat het startmateriaal, namelijk een bloedstaaltje, op zich niet echt reproduceerbaar is aangezien de samenstelling van het bloed (cellen en serum) varieert afhankelijk van veranderingen in hormonale toestand, dieet, immunologische conditie, etc..... Deze parameters kunnen misschien een invloed hebben op het stralingsgevoelig gedrag van het individu.

Uit deze studie kunnen we besluiten dat resultaten verkregen met chromosoom aberratietesten gebaseerd op één bloedstaaltje niet betrouwbaar zijn voor de bepaling van de individuele

stralingsgevoeligheid. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of het nemen van meerdere bloedstaalnamen noodzakelijk zal blijken om een betrouwbare bepaling van de individuele stralingsgevoeligheid toe te laten. Een verder grondige validatie van de G2 en MN methode is noodzakelijk vooraleer deze testen kunnen gebruikt worden als biomerkers voor individuele stralingsgevoeligheid. Uit de studies uitgevoerd bij borstkankerpatiënten (resultaten 3) blijkt dat beide testen wel zeer geschikt zijn voor het bepalen van de stralingsgevoeligheid van populaties.

Ook werd rond de standaardisatie van de G2 test een workshop georganiseerd. Het artikel dat hieruit voortvloeide werd gepubliceerd in Int. J. Rad. Biol.. Voor een volledig overzicht en bespreking van de resultaten verwijzen we naar het artikel (**artikel 4** in bijlage II).

Ook werkte onze groep mee aan het internationaal HUMN (human micronucleus project) project dat tot doel heeft de micronucleus test te standardiseren. Door het HUMN werd een grote internationale studie opgezet met als doel het vergelijken van de intra- en inter laboratorium variaties bij het scoren van MN in binucleaire cellen. De resultaten van deze internationale MN scoring oefening waaraan een groot aantal groepen hun medewerking verleenden werden gepubliceerd in Environmental and Molecular Mutagenesis (**artikel 1** in bijlage II) and in Mutation Research (**artikel 5** in bijlage II). Voor een volledige bespreking van de resultaten verwijzen we naar de artikels (referenties zie bijlage).

2. Toepassing van de radiosensitiviteitstesten, G0-MN test en G2 test, bij een populatie van stralingswerknemers uit de nucleaire sector.

De waarde van de vermelde genotoxiciteitstesten voor stralingsgevoeligheid in de arbeidsgeneeskunde werd nagegaan via een studie van een populatie van stralingswerkers uit de nucleaire industrie. De resultaten van deze studies worden gedetailleerd besproken in het verslag van RUG2, promotor Prof. H. Thierens, en werden gepubliceerd in Int. J. Rad. Biol. (**artikel 6** in bijlage II) en in Int. J. Low Radiation (**artikel 10** in bijlage II). Een belangrijke conclusie uit de studie gepubliceerd in IJRB is dat in vivo blootstelling aan een lage dosis ioniserende straling resulteert in een reductie van de stralingsgevoeligheid in G0 lymfocyten van de werknemer tengevolge van het “adaptive response phenomenon”. Met de G2 test kon geen adaptieve respons worden gedemonstreerd.

3. Validatie studie van de G0-MN test en de G2 test bij een populatie van borstkankerpatiënten.

De resultaten van deze validatie studie werden gepubliceerd in Brit. J. Cancer (**artikel 7** in bijlage II). Voor een volledig overzicht en bespreking van de resultaten verwijzen we naar artikel 7 (referentie in bijlage II).

Hieronder volgt een korte samenvatting en bespreking van de resultaten:

Wat de borstkankerstudie betreft werden in totaal bloedstaaltjes verzameld bij 62 borstkankerpatiënten met een gekende of veronderstelde genetische predispositie (details van de populatie zie III.2. materiaal). Deze patiëntengroep werd geselecteerd aangezien de grote studies die tot nu toe werden uitgevoerd bij borstkankerpatiënten enkel handelen over sporadische borstkankerpatiënten. De invloed van hoge risicofactoren zoals a) een familiale geschiedenis van borstkanker, b) aanwezigheid van BRCA1 of 2 mutatie en c) jonge leeftijd waarop borstkanker wordt ontwikkeld, op chromosomale stralingsgevoeligheid is momenteel nog niet gekend.

Uit deze studie blijkt dat borstkankerpatiënten met een gekende of veronderstelde genetische predispositie een hogere stralingsgevoeligheid vertonen dan gezonde vrouwen en dit zowel met de G2 als met de G0 micronucleus (MN) test. Voor de MN test werden de in vitro bestralingen zowel uitgevoerd aan een hoog dosis tempo (HDR) als aan een laag dosistempo (LDR) (details protocol zie III.1. analyse technieken).

Table 1. Mean values, standard deviations, ranges and Percentage of radiosensitive breast cancer patients and controls

Assay	Parameter	normals	Patients
Age	Range	23-60	29-69
	Mean \pm SD	37 \pm 12	45 \pm 10 *
G2	Population size ^a	51	54
	Mean \pm SD ^b	1.03 \pm 0.21	1.24 \pm 0.25 *
	Range ^b	0.6-1.55	0.76-1.82
	Cut off value ^{b,d}	1.29	
	% sensitive ^d	10	43 **
MN-HDR	Population size ^a	53	49
	Mean \pm SD ^c	741 \pm 105	841 \pm 143 *
	Range ^c	495-969	546-1166
	Cut off value ^{c,d}	876	
	% sensitive ^d	11	45 **
MN-LDR	Population size ^a	49	51
	Mean \pm SD ^c	346 \pm 59	442 \pm 89 *
	Range ^c	247-499	263-635
	Cut off value ^{c,d}	422	
	% sensitive ^d	12	61 **

^a number of successful blood samples; ^b number of chromatid breaks per cell

^c number of micronuclei (MN) per 1000 BN; ^d 90th percentile of the controls was selected as cut off

* Significantly different from controls ($p < 0.05$) (unpaired t-test)

** Significantly different from controls ($p < 0.05$) (Chi-square test)

Het hoogste percentage stralingsgevoelige patiënten werd gedetecteerd met de LDR-micronucleus test. Wanneer het 90^{ste} percentile van de normale populatie genomen wordt als drempelwaarde voor het bepalen van stralingsgevoeligheid, zien we dat 61% van de borstkankerpatiënten stralingsgevoelig zijn in de LDR-MN test (t.o.v. 45% in de HDR-MN test en 43% in de G2 test) (Table 1). Deze resultaten suggereren dat bij borstkankerpatiënten

met een gekende of veronderstelde genetische predispositie het DNA herstelmechanisme werkzaam tijdens LDR bestraling in G0 lymfocyten minder efficiënt zou zijn dan bij sporadische borstkankerpatiënten. Wanneer we de resultaten verkregen met de G2 en MN test vergelijken stellen we vast dat er geen correlatie bestaat tussen de G2 en G0-MN methode.

Table 2. Mean values, standard deviations, ranges and percentage radiosensitivity of

1) breast cancer patients with a family history and a BRCA 1 or 2 mutation, 2) non-BRCA patients with a family history and 3) young breast cancer patients without a family history

assay	parameter	BRCA1	BRCA2	BRCA1+BRCA2	non-BRCA	Young
G2	Population size ^a	4	7	11	43	10
	Mean ± SD ^b	1.20 ± 0.34	1.32 ± 0.18 *	1.28 ± 0.24 *	1.23 ± 0.26 *	1.24 ± 0.26 *
	Range ^b	0.78-1.6	1.18-1.68	0.78-1.68	0.76-1.82	0.8-1.65
	% sensitive ^c	25	29	27	47 **	50 **
MN-HDR	Population size ^a	2	7	9	40	8
	Mean ± SD ^d	787 ± 140	827 ± 144	818 ± 136	846 ± 146 *	940 ± 165 *
	Range ^d	688-886	644-1050	644-1050	546-1166	621-1166
	% sensitive ^c	50	29	33	48 **	75 **
MN-LDR	Population size ^a	2	7	9	42	9
	Mean ± SD ^d	457 ± 42	470 ± 130 *	467 ± 114 *	437 ± 83 *	472 ± 95 *
	Range ^d	427-487	263-635	263-635	267-579	305-576
	% sensitive ^c	100 **	71 **	78 **	57 **	78 **

^a number of successful blood samples; ^b number of chromatid breaks per cell;

^c 90th percentile of the controls was selected as cut off; ^d number of micronuclei (MN) per 1000 BN;

* Significantly different from controls (p<0.05) (unpaired t-test)

** Significantly different from controls (p<0.05) (Chi-square test)

No significant differences were found between the different subgroups(unpaired t-test and Chi-square test)

Patiënten die stralingsgevoelig zijn met de G2 test waren in de meeste gevallen niet stralingsgevoelig met G0-MN test en vice versa. Dit wijst er op dat verschillende DNA repair mechanismen en /of cel cyclus regulatie mechanismen werkzaam zijn wanneer lymfocyten worden bestraald in G0 of G2 fase van de celcyclus.

Wat de verschillende subgroepen betreft (familiale borstkankerpatiënten met een mutatie in het borstkankerpredispositie gen BRCA1 of 2, familiale borstkankerpatiënten zonder een mutatie in BRCA1 of 2, jonge sporadische borstkankerpatiënten) blijken de jonge sporadische borstkankerpatiënten het meest stralingsgevoelig te zijn en dit voor de verschillende eindpunten (Table 2). Het percentage gevoelige patiënten binnen deze groep van jonge patiënten bedraagt met de G2 test 50 %, met de HDR MN test 75 % en met de LDR MN test 78 %. Het laagste percentage van stralingsgevoelige individuen werd vastgesteld binnen de groep van familiale patiënten met een mutatie in BRCA1 of 2 met de G2 test (27%) (Table 2) wat erop zou wijzen dat BRCA 1 of 2 geen essentiële rol spelen in G2 stralingsgevoeligheid. Met de MN test werd enkel een hoog percentage stralingsgevoelige patiënten teruggevonden met het “low dose rate” protocol. De exacte rol van BRCA 1 en 2 in chromosomale

stralingsgevoeligheid is nog niet gekend en hieromtrent bestaat nog heel wat discussie. Het is dan ook onze bedoeling om deze studie nog verder uit te breiden en dit zowel naar de jonge patiënten toe als naar de patiënten met een mutatie in BRCA 1 of 2.

4. Intermediaire resultaten i.v.m. de validatie studie van de G0-MN test en de G2 test bij een populatie van radiotherapie patiënten.

Een tweede validatie studie werd opgestart bij radiotherapiepatiënten, dit in nauwe samenwerking met RUG 2, promotor Prof. Dr. H. Thierens. Deze studie had tot doel te bestuderen of de in vitro stralingsgevoelighed waargenomen met de G0-MN techniek en de G2 test correleert met de in vivo klinische stralingsgevoeligheid waargenomen bij 1 % van de patiënten die radiotherapie ondergaan. De bruikbaarheid van deze cytogenetische testen voor predictie van acute radiotoxiciteit bij radiotherapiepatiënten is nog controversieel of niet gekend. Het collecteren van gegevens over zowel de in vivo als in vitro stralingsrespons is essentieel voor een succesvol verder onderzoek van de onderliggende genetische factoren voor stralingssusceptibiliteit.

Karakterisatie van genetische factoren geassocieerd met stralingstoxiciteit bij hogere doses zullen een wetenschappelijke basis vormen voor het begrijpen a) van de gezondheidseffecten die worden waargenomen bij lage dosis / laag dosistempo blootstelling van de werknemer en b) hoe informatie over individuele stralingsgevoeligheid moet geïncorporeerd worden bij het management van 'risk assessment'. Deze kennis zal tevens gebruikt kunnen worden om technieken te ontwikkelen voor de identificatie van individuen met een verhoogd risico op nadelige gezondheidseffecten t.g.v. straling.

Voor deze studie werd reeds gestart met het verzamelen van bloedstalen. Tot nu toe werden reeds een 30 tal bloedstalen verzameld. Op deze stalen wordt de MN en G2 test toegepast. Van een deel van het bloedstaal worden lymfocyten geïsoleerd en ingevroren voor verdere genetische analyse. De tot nu toe reeds verkregen preliminaire resultaten worden uitvoerig besproken in verslag RUG2 (promotor Prof. Dr. H. Thierens) en zullen verder afgewerkt worden gedurende de komende maanden.

5. Onderzoek naar het mechanisme verantwoordelijk voor de vorming van G2 chromatide breuken.

Door de onderzoeksgroep RUG1 (promotor Prof. L. De Ridder) en RUG 2 (promotor Prof. H. Thierens) werd tevens fundamenteel onderzoek verricht naar de correlatie tussen een verhoogd aantal chromatide breuken in de G2 test en DNA herstel deficiëntie, een zeer belangrijk aspect bij radiosensitiviteit. De resultaten van deze studie werden gepubliceerd in Int. J. Rad. Biol. (**artikel 8** in bijlage II).

Korte bespreking van de resultaten en discussie:

In deze studie werd het aantal chromatide breuken geïnduceerd door lage LET (low energy transfer) γ -stralen en hoge LET neutronen met mekaar vergeleken alsook de kinetiek van het verdwijnen (herstel) van deze breuken na lage en hoge LET straling. Hiervoor werd de G2 test toegepast op bloedstalen van 4 gezonde donoren. In een eerste reeks van experimenten werden dosisrespons curven opgesteld voor γ -stralen en neutronen met doses gaande van 0.1 tot 0.5Gy (Table 1). In een tweede reeks van experimenten werd de kinetiek geanalyseerd van het vormen en verdwijnen van chromatide breuken. Voor deze experimenten werd een dosis van 0.5 Gy gebruikt en postbestralingstijden variërend van 0.5h tot 3.5h (Table 2). Voor de hoogste dosis van 0.5 Gy werd ook het aantal isochromatide breuken bepaald.

Table I. Dose response for the formation of chromatid breaks following irradiation with Co-60 Gamma rays and fast neutrons.

Dose (Gy)	Donor 1 chromatid breaks*		Donor 2 chromatid breaks*		Donor 3 chromatid breaks*		Donor 4 chromatid breaks*		Mean + S.D. chromatid breaks*	
	Co-60	neutron	Co-60	neutron	Co-60	Neutron	Co-60	neutron	Co-60	neutron
	0,1	0,3	0,32	0,48	0,28	0,52	0,36	0,34	0,48	0,41 ± 0,11
0,2	0,74	0,7	0,72	0,52	0,9	0,68	0,72	0,88	0,77 ± 0,09	0,70 ± 0,15
0,5	1,55	1,61	1,65	1,61	1,88	2,1	1,63	1,67	1,68 ± 0,14	1,75 ± 0,24

* number of chromatid breaks are given per metaphase ; per donor 50 metaphases were scored.

Table II. Chromatid break rejoining in function of the time (h) after irradiation with a dose of 0,5 Gy Co-60 gamma rays or fast neutrons.

Time (h) after IR	Donor 1 chromatid breaks*		Donor2 chromatid breaks*		Donor3 chromatid breaks*		Donor 4 Chromatid breaks*		Mean ± S.D. chromatid breaks*	
	Co-60	neutron	Co-60	neutron	Co-60	neutron	Co-60	neutron	Co-60	neutron
	0,5	1,06	1,58	1,02	1,36	1,62	1,48	1,74	0,86	1,36 ± 0,37
1	1,76	1,54	1,52	1,48	2,6	2,16	1,78	1,76	1,92 ± 0,47	1,74 ± 0,31
1,5	1,55 (0)	1,61(0)	1,65 (0)	1,61(0)	1,88 (0)	2,1(0)	1,63 (0)	1,67 (0)	1,68 ± 0,14	1,75 ± 0,24
2,5	0,66 (4)	0,38 (0)	0,62 (0)	0,6 (0)	0,74 (3)	0,46 (2)	0,7 (10)	0,56 (2)	0,68 ± 0,05	0,5 ± 0,1
3,5	0,2 (2)	0,2 (12)	0,34 (8)	0,42 (22)	0,6 (10)	0,3 (10)	0,36 (23)	0,42 (4)	0,38 ± 0,17	0,34 ± 0,11

* number of chromatid breaks are given per metaphase ; per donor 50 metaphases were scored.
() : % of labelled metaphases (per donor 50 metaphases were scored).

Geen significante verschillen in aantallen chromatide breuken werden vastgesteld tussen lage LET γ -stralen en hoge LET neutronen en dit voor de 4 donoren voor alle doses. De dosisrespons curven voor de vorming van chromatide breuken waren lineair voor beide stralingskwaliteiten. Tevens konden geen verschillen in RBE (relative biological efficiency) worden vastgesteld tussen γ -stralen en neutronen. Voor de vorming van isochromatide breuken vonden we wel een RBE waarde van 6.2 vaststellen. Dit betekent dat neutronen enkel meer effectief zijn in de vorming van isochromatiden. De herstelexperimenten toonden verder aan dat ook de kinetiek van het verdwijnen van chromatide breuken niet afhankelijk is van de LET van de stralingskwaliteit. $T_{1/2} = 0.92h$ voor γ -stralen en $t_{1/2} = 0.84h$ voor neutronen werden bekomen. Uit onze resultaten kunnen we besluiten dat de inductie en het verdwijnen

van G2 chromatide breuken onafhankelijk is van de LET van de gebruikte stralenkwaliteiten (0.24 keV/ μm ^{60}Co - γ -stralen en 20 keV/ μm snelle neutronen) dit in tegenstelling tot het duidelijke LET effect dat waargenomen wordt bij de vorming en het verdwijnen van MN en chromosoomaberraties. Aangezien deze stralenkwaliteiten initieel hetzelfde aantal dsb induceren ondersteunen onze resultaten het "signal model" (Bryant 1998) dat suggereert dat chromatide breuken het resultaat zijn van een uitwisselings (exchange) proces dat gestart wordt door één enkele dsb.

6. Preliminair resultaten i.v.m. de correlatie tussen verhoogde chromosomale stralingsgevoeligheid en defecten t.h.v. van genen betrokken bij het proces van stralingsgeïnduceerde DNA schade.

Het onderzoek naar de onderliggende mechanismen van chromosomale stralingsgevoeligheid werd in het eerste werkjaar van dit project reeds gestart. Aangezien bij de start van dit project nog geen informatie beschikbaar was van individuen die een verhoogde chromosomale stralingsgevoeligheid vertonen werd dit onderzoek in een eerste fase uitgevoerd op verschillende lymfocytenpopulaties, namelijk B en T lymfocyten, waarvan geweten is dat ze een verschil vertonen in chromosomale stralingsgevoeligheid. Uit een vorige studie (Vral et al. IJRB, 73, 549-555, 1998) is immers gebleken dat B lymfocyten een hoger aantal micronuclei vertonen na gamma-bestraling dan T lymfocyten. Aangezien verschillen in chromosomale radiosensitiviteit waarschijnlijk gecorreleerd zijn met verschillen in herstelcapaciteit van de door straling geïnduceerde DNA-dsb werd het niet homologe endjoining (NHEJ) mechanisme, dat volgens literatuur de voornaamste rol speelt bij het herstel van stralingsgeïnduceerde DNA-dsb, onderzocht in B en T lymfocyten. De proteïne expressie van de 3 belangrijkste genen betrokken bij NHEJ nl. Ku 70/86 en DNA-PK werd geanalyseerd via Western Blot. Ook werden activiteitsmetingen gedaan van het DNA-PK repair enzyme. Uit onze resultaten konden we besluiten dat de verhoogde chromosomale radiosensitiviteit in B cellen niet te wijten is aan defecten t.h.v. DNA-PK en Ku70/86. De resultaten van dit werk werden gepubliceerd in Int. J. Rad. Biol. (**artikel 2** in bijlage II).

Vanaf de start van het project werden ook biomonitoring studies opgestart waarbij bloedstalen werden verzameld bij een populatie van borstkankerpatiënten en een populatie van stralingswerknemers. Bij deze populaties werd de chromosomale stralingsgevoeligheid geanalyseerd met de G2 en de G0-MN test (zie resultaten 2 en 3). De finale doelstelling van dit project was uiteindelijk na te gaan of de verhoogde chromosomale stralingsgevoeligheid vastgesteld met de G2 en de G0-MN test bij bepaalde patiënten en werknemers gecorreleerd is met een veranderde expressie (mRNA) van DNA repairgenen en celcyclus 'checkpoint' genen. Deze veranderde expressie op RNA niveau zal onderzocht worden via real-time kwantitatieve PCR (Q-PCR) op RNA geïsoleerd uit IL2-lymfoblastoïede cellen opgekweekt uit ingevroren lymfocyten stalen van controle donoren en stralingsgevoelige patiënten. Er werd geopteerd om te werken op IL2 lymfoblastoïede cellen dit omdat het ons zal toelaten om over een grote hoeveelheid celmateriaal te beschikken wat als voordeel heeft dat experimenten kunnen herhaald worden. IL2 lymfoblastoïede cellen worden verkozen boven EBV getransformeerde cellijnen dit omdat ze het dichtst aanleunen bij het materiaal (lymfocyten in vers bloedstaal) dat gebruikt wordt voor cytogenetische analyse.

Reeds bekomen intermediaire resultaten en bespreking:

1) PCR primers werden ontwikkeld voor de volgende genen: 1) genen betrokken bij homologe recombinatie (RAD51, XRCC2, XRCC3, RAD52), 2) genen betrokken bij niet-homologe 'endjoining' (NHEJ) (XRCC4-XRCC7, Ligase 4), 3) celcyclus checkpoint genen

(G2/M: Chk1, Chk2, cdk1(cdc2/cyclin B) en 4) andere genen betrokken bij het herstel van DNA schade zoals: ATM, CDKN1A (=p21/waf1), GADD45, PARP, XRCC1, DDB2.

2) Preliminaire real-time kwantitatieve PCR experimenten werden reeds uitgevoerd. Grondige analyse van deze eerste resultaten bracht echter aan het licht dat het RNA materiaal waarvan we vertrokken niet optimaal was. Via Agilent technologie zagen we dat het RNA sterk gedegradieerd is. Momenteel zijn we de oorzaak hiervan aan het opsporen. Aangezien we willen nagaan of de verhoogde in vitro chromosomale stralingsgevoeligheid gecorreleerd is met een veranderde genexpressie moeten we zeker zijn dat de IL2 lymfoblastoïede cellen dezelfde in vitro chromosomale stralingsrespons vertonen als de oorspronkelijke T lymfocyten. Om dit na te gaan werden: A) de cytogenetische testen geoptimaliseerd voor IL2 lymfoblastoïede cellen en B) de chromosomale stralingsrespons vergeleken tussen rustende T-lymfocyten in een vers bloedstaal en de hiervan afgeleide IL2 gestimuleerde lymfoblastoïede cellen.

3A) Optimalisatie van de cytogenetische technieken voor IL2 lymfoblastoïede cellen.

Geoptimaliseerd protocol: lymfocyten worden geïsoleerd uit het verse bloedstaal en ingevroren in vloeibare stikstof. Voor het opstarten van IL2 cellijnen worden de ingevroren lymfocyten in cultuur gebracht en gestimuleerd met PHA en interleukine 2 (IL2). PHA wordt enkel bij de start toegevoegd terwijl IL2 telkens wordt toegevoegd wanneer de culturen worden ververst. Deze gestimuleerde lymfocytculturen worden gekweekt gedurende 17-20 dagen vooraleer ze worden bestraald en de MN en G2 testen worden toegepast. Voor wat de MN test betreft wordt er na bestraling (2Gy) onmiddellijk cytochalasine B toegevoegd en na 48 uur worden de cellen gefixeerd en gekleurd. Met dit protocol werden goede resultaten verkregen. Wat de G2 test betreft waren we niet in staat om een voldoende hoge opbrengst aan delende cellen te krijgen met de verschillende protocols die werden uitgetoet. Vandaar dat we de vergelijkende studie enkel hebben uitgevoerd voor de MN test.

3B) Vergelijkende studie: vers bloedstaal vs. IL2 lymfoblastoïede cellen.

Voor deze vergelijkende studie werden bloedstalen geselecteerd van 20 controle donoren en 11 borstkankerpatiënten waarbij een verhoogde stralingsgevoeligheid gedetecteerd werd in het verse bloedstaal met de MN test. De resultaten tonen aan dat voor wat betreft de bestraling van lymfocyten in het vers bloedstaal het aantal stralingsgeïnduceerde MN na een in vitro dosis van 2 Gy (= aantal MN na 2Gy bestraling – aantal spontane MN) gemiddeld hoger ligt bij de patiënten in vgl. met de gezonde controle individuen (408 vs. 292). Deze significant verhoogde stralingsrespons waargenomen in de patiëntenpopulatie vinden we echter niet meer terug wanneer de MN test wordt toegepast op de IL2 lymfoblastoïede cellen van dezelfde patiënten- en controle groep: patiënten: 382 MN vs. controle: 400 MN. De oorzaak voor het verdwijnen van deze stralingsgevoeligheid is nog niet duidelijk maar zal verder onderzocht worden.

In dit kader zullen eerst en vooral de problemen die opdoken ivm. het gebruik van IL2 lymfoblastoïede cellijnen verder worden aangepakt. Andere alternatieven zoals o.a. het gebruik van EBV getransformeerde cellijnen worden momenteel onderzocht. Indien ook hier de chromosomale stralingsrespons verdwijnt zullen we de mogelijkheid om het moleculaire werk uit te voeren op de stock van ingevroren lymfocyten (geïsoleerd uit het bloedstaal) na gaan. Dit heeft echter als nadeel dat de hoeveelheid materiaal beperkt is.

De resultaten van deze studies uitgevoerd op IL2 lymfoblastoïede cellijnen en EBV getransformeerde cellijnen worden voorbereid voor publicatie.

7. Toekomstperspectieven

In het kader van dit DWTC project werd in een eindfase het onderzoek gestart naar de **correlatie tussen chromosomale stralingsgevoeligheid**, waargenomen bij bepaalde individuen (patiënten en werknemers,) **en de expressie van genen betrokken bij het herstel van DNA schade**. Aangezien deze onderzoeken nog in een preliminaire fase staan zullen zij verder worden uitgewerkt in toekomstige onderzoeksprogramma's. De detectie van mutaties, polymorfismen in DNA herstel genen gecorreleerd met in vitro chromosomale stralingsgevoeligheid blijft een zeer interessante topic in het kader van stralingssusceptibiliteit bij werknemers en patiënten.

Een andere belangrijke topic die nog verder moet worden uitgewerkt in toekomstige stralingsbeschermings- en gezondheidsprogramma's van werknemers is de bruikbaarheid van chromosoomaberratie testen voor '**individual risk assessment**'. Alhoewel de huidige studies hebben aangetoond dat de G2 en G0-MN test bruikbaar en betrouwbaar zijn voor het bepalen van de stralingsgevoeligheid van bepaalde populaties (zoals borstkankerpatiënten), is de waarde van deze testen voor individuele risico bepaling nog onduidelijk.



Promotor: Prof. Dr. D. Lison

Université catholique de Louvain
Unité de Toxicologie industrielle et Médecine du Travail

I. INLEIDING

I.1. Context en algemeen kader van het onderzoek

De algemene doelstelling van dit programma was het ontwikkelen van nieuwe methoden voor het bepalen van interindividuele variabiliteit/susceptibiliteit in de arbeidsgeneeskunde. Zoals gesteld wordt in de algemene inleiding, is het belangrijk met variabiliteit rekening te houden bij het evalueren van blootstelling (variabiliteit in blootstellingsbiomonitoring) of de gevolgen van blootstelling (variabiliteit van de effecten of susceptibiliteit).

Onder de verschillende oorzaken van variabiliteit spelen genetische factoren (genetische polymorfismen) een significante rol. De duidelijkste voorbeelden hiervan zijn de polymorfismen voor GSTM1 en GSTT1 glutathion-S transferases, die afwezig zijn in respectievelijk 50 en 20% van de Caucasische bevolking. De introductie van moleculaire biologie methoden laat toe deze polymorfismen makkelijk te detecteren (genotypering). Het UCL onderzoeksploeg was verantwoordelijk voor de ontwikkeling van de meeste genotyperingsmethoden noodzakelijk voor dit programma.

Naast genetische polymorfismen kunnen andere factoren de functionele activiteit van een enzym betrokken in xenobiotische transformatie of DNA repair beïnvloeden. In het bijzonder kan de expressie of activiteit van het enzym *in vivo* gemeten worden (fenotyperingsmethoden). Tijdens dit programma besteedde de UCL onderzoeksploeg lange tijd aan het ontwikkelen van een methode die de fenotypering van CYP2E1 mogelijk zou maken. CYP2E1 is één van de belangrijkste enzymen betrokken in de biotransformatie van industriële verbindingen, en de uitdrukking ervan wordt zowel op gen niveau als post-transcriptioneel gereguleerd.

De methoden ontwikkeld aan de UCL werden geïmplementeerd in verschillende experimentele en veldstudies in samenwerking met andere partners. De UCL groep was verantwoordelijk voor twee specifieke studies die de rol van interindividuele variabiliteit onderzochten: de eerste bestudeerde biomerkers voor blootstelling aan styreen in vrijwilligers, de tweede bestudeerde de respiratoire effecten in arbeiders blootgesteld aan kobaltstof.

I.2. Theoretische beschouwingen.

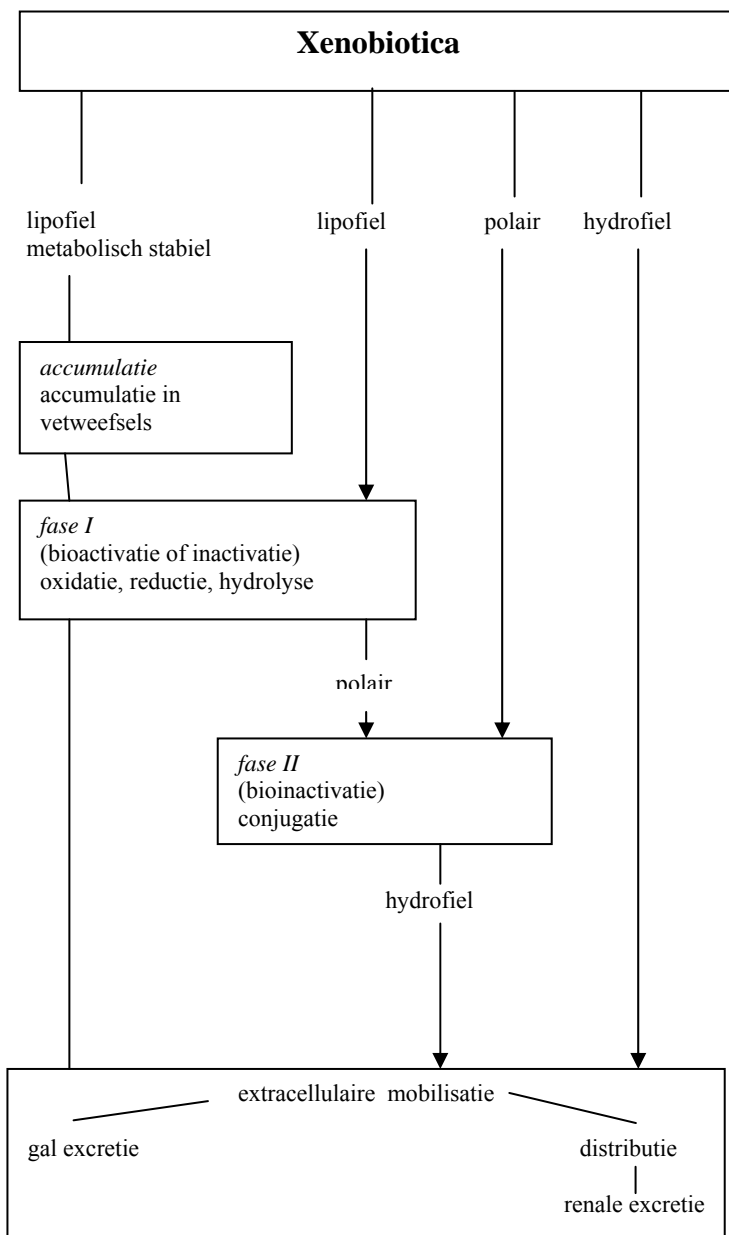
Voor de interpretatie van biologische monitoring data moeten de gemeten waarden vergeleken worden met referentie limietwaardes, gebaseerd op het toelaten van de opname van een bepaalde hoeveelheid van een chemische substantie die als aanvaardbaar beschouwd wordt voor het behoud van de gezondheid van het individu. Zo'n referentie limietwaardes worden vooropgesteld door verschillende nationale en internationale organisaties zoals de "American Conference of Governmental Industrial Hygienist" (ACGIH), die "Biological exposure indices" (BEI) voortstelt, of de "Deutsche Forschungsgemeinschaft" (DFG) die "Biologischer Arbeitsstoff-Toleranz-Wert" (BAT) voorstelt.

De nuttigste biomerkers voor blootstelling zouden "gezondheidsgericht" moeten zijn, d.w.z. afgeleid uit lange termijn follow-up studies van arbeiders die de definiëring toelaten van een blootstellingslimiet zonder nadelige effecten voor de meerderheid van de arbeiders. Onder deze voorwaarden kunnen limietwaardes bepaald worden op basis van dosis-effect/respons relaties, en deze waarden worden meestal '*biological action levels*' genoemd (BAL). Voorbeelden van biomerkers waarvoor een kwantitatieve relatie tussen interne dosis en nadelige effecten werd geïdentificeerd zijn relatief schaars: lood in bloed, cadmium in urine of carboxyhemoglobine.

Voor de meeste stoffen is de dosis-effect/respons relatie echter onvoldoende nagegaan, en biologische limietwaarden zijn daarom afgeleid van de limietwaarden voor beroepsblootstelling (*occupational exposure limits*, OEL) in lucht, zoals de *threshold limit values* (TLVs) voorgesteld door het ACGIH. Deze limietwaarden worden dan **biological exposure indexes** (BEI) genoemd, aangezien ze de concentratie van de substantie voorstellen die in de lichaamsvochten zal voorkomen na een acht uur tijdsgewogen gemiddelde blootstelling via inademing op de OEL waarde. Onder deze omstandigheden is biologische monitoring meer een bepaling van de intensiteit van de blootstelling dan van het potentieel risico voor de gezondheid.

Totnogtoe werden BEI's ontwikkeld in de veronderstelling dat individu's niet significant verschillen in hun capaciteit tot biotransformatie. Het is echter duidelijk dat dit niet het geval is, omdat er grote interindividuele verschillen bestaan in de metabolisatie van xenobiotica. Oorzaken van variabiliteit zijn o.a. interindividuele verschillen in opname (long, darm of huid) en nutritionele heterogeniteit. Een fractie van de variabiliteit waargenomen tussen de concentratie van een biomarker in lichaamsvocht en de concentratie van de overeenkomstige toxische stof in de omgeving zou ook verklaard kunnen worden door verschillen in capaciteit tot biotransformatie. Wanneer men deze interindividuele variabiliteitsfactoren wil in acht nemen, moet men twee situaties duidelijk onderscheiden: (a) de gemeten biomarker is rechtstreeks betrokken in het toxiciteitsmechanisme van de chemische substantie. In dit geval is de kennis van zijn concentratie voldoende voor gezondheidsevaluatie, zonder dat men rekening moet houden met enige interindividuele variabiliteitsfactor, daar de biomarker zelf deze variabiliteitsfactoren integreert. Om deze reden biedt dit soort biomarker een duidelijk voordeel in vergelijking met omgevingsmonitoring. De specifieke carboxylzuren die *in vivo* geproduceerd worden uit ethyleen glycol afgeleide ethers (bv. methoxyacetic zuur in urine voor het bepalen van blootstelling aan methoxyethanol, ...), of 2,5-hexanedione als specifieke urinaire metaboliet voor n-hexaan blootstelling illustreren deze situatie; (b) wanneer deze link niet duidelijk aangetoond of zelfs afwezig is, is het noodzakelijk de bronnen van de interindividuele variabiliteit te identificeren om zodanig de individuele blootstelling beter in te schatten. Dit is van belang en blijft een beter aanpak dan omgevingsmonitoring, in het bijzonder om residuele blootstelling te bepalen wanneer individuele beschermingsapparatuur gedragen wordt (wat een steeds frequentere praktijk is in vele landen). Integratie van data

over individuele metabolische capaciteit zou een significante verbetering betekenen van de interpretatie van de huidig gebruikte BEI, bv. door het integreren van data over het genotype en/of fenotype van metabolische enzymen relevant voor de biotransformatie van de betrokken chemische substantie.



Om adequate genotyperings- en/of fenotyperingsmethoden te selecteren is een gedetailleerde karakterisering van de biotransformatie pathways gevolgd door de bestudeerde chemische substantie, en de identificatie van bijzondere enzyme isovormen betrokken in elke stap van het metabolisme uiteraard van groot belang. De meeste van deze preliminaire studies worden *in vitro* uitgevoerd, gebruik makende van menselijke levermicrosomen. De reacties gekatalyseerd door xenobiotica-biotransformerende enzymen worden algemeen verdeeld in twee groepen, fase I en fase II. In fase I reacties zijn hydrolyse, reductie en oxidatie betrokken. Deze reacties voegen een functionele groep in of stellen er één bloot (-OH, -NH₂, -SH or -COOH), en resulteren meestal in een slechts kleine toename van de hydrofiliciteit.

Fase II biotransformatie reacties zijn o.a. glucuronidatie, sulfatatie, acetylatie, methylatie, conjugatie met glutathion (mercapturic acid synthese) en conjugatie met aminozuren (zoals glycine, taurine en glutaminezuur). De cofactor voor deze fase II reacties reageert met functionele groepen die ofwel in het xenobiotica aanwezig zijn, ofwel ingevoegd/blootgesteld worden door fase I biotransformatie. De meeste fase II biotransformatie reacties resulteren in een grote toename aan hydrofiliciteit van de xenobiotica, en daarom bevorderen ze de excretie van vreemde chemische substanties.

Van alle enzymen betrokken in de biotransformatie van xenobiotica zijn er verschillende van primordiaal belang voor de biotransformatie van toxische agentia uit de industrie en/of de omgeving (over het algemeen kleinere moleculen dan drugs). Voor fase I reacties is cytochroom P450 (CYP), en in het bijzonder de isovormen CYP1A1 en CYP2E1, betrokken bij de metabolische activatie van vele precarcinogenen, zoals polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) voor CYP1A1 en benzeen, dimethylnitrosamine en vinyl chloride voor CYP2E1. Een ander fase I enzym dat grotendeels betrokken is in de biotransformatie van toxische agentia uit de industrie en/of de omgeving is microsomale epoxide hydrolase (mEH of EPHX1). Dit enzym katalyseert de hydrolyse van reactieve alifatische en arene epoxiden gegenereerd door CYP enzymen tot meer wateroplosbare dihydrodiol afgeleiden (detoxificatie pathway). In bepaalde gevallen kunnen chemische producten van EPHX1 metabolisme (*trans*-dihydrodiols) echter verder omgezet worden tot secundaire epoxide species die slechte substraten zijn voor EPHX1. Deze diol-epoxiden zijn vaak zeer reactief en zijn betrokken in processen zoals teratogenese en initiatie van kanker. Glutathion S-transferases (GST's) zijn een familie van dimerische enzymen die een belangrijke rol spelen in de detoxificatie van vele toxische agentia uit de industrie en/of de omgeving. Deze enzymen katalyseren de conjugatie van elektrofielen met glutathion, zo potentieel cytotoxische en/of genotoxische substanties inactiverend. Andere enzymen van belang voor de biotransformatie van industriële chemicaliën zijn N-acetyl transferases, UDP-glucoronyl transferases, sulfotransferases, ...

Voor alle hiervoor vermelde enzymen zijn verschillen in de gen nucleotide sequentie, genetische polymorfismen genaamd, beschreven in de algemene bevolking, Cauciërs inbegrepen. Elk gen kan gevonden worden onder een wildtype en meest voorkomende allel, het "wildtype allel" genaamd, of onder één (voor bi-allelische polymorfismen) of meerdere (voor multi-allelische polymorfismen) variante vormen, "variante allelen". Als elk gen aanwezig is in dubbel exemplaar wordt een bepaald genotype gedefinieerd als de combinatie van twee allelen (hetero- of homozygoten). Zulke polymorfismen kunnen een effect hebben op de enzymatische functie, en in het ideaal geval zou de relatie tussen een bepaald genotype en fenotypische katalytische activiteit van het enzym ten minste *in vitro* moeten vastgesteld worden. Voor CYP1A1 (op chromosoom 15) werden twee polymorfische loci uitgebreid bestudeerd. Het belangrijkste polymorfisme bevindt zich in de katalytische regio van CYP1A1 (exon 7) en leidt tot de substitutie van isoleucine door valine (Ile/Val). De aanwezigheid van valine verhoogt vermoedelijk de katalytische activiteit van het enzym. Deze mutatie is nauw gelinkt met een ander polymorfisme dat gedetecteerd kan worden door een MspI *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) analyse en gekarakteriseerd is door twee allelen: m1 (afwezigheid van MspI site) en m2 (aanwezigheid van MspI site). Het m2 allel is vermoedelijk geassocieerd met een hogere induceerbaarheid van het enzym. Voor CYP2E1 (op chromosoom 10) werden drie verschillende polymorfismen detecteerbaar met de TaqI (A2/A1), DraI (D/C), RsaI en PstI (c1/c2) restrictie enzymen, evenals een 96 bp-insertie polymorfisme beschreven. Een verlaagde CYP2E1 activiteit in aanwezigheid van het zeldzame C allel (*CYP2E1**6) werd voorgesteld, maar de *in vivo* significantie van de meeste

van deze polymorfismen is, totnogtoe, verre van duidelijk. Voor EPHX1 (op chromosoom 1) werden twee polymorfische site waargenomen in exon 3 (Tyr113/His113) en exon 4 (His139/Arg139). Gebaseerd op *in vitro* studies, correleerde het variante allel van één van deze sites (exon 3) met gereduceerde EPHX1 activiteit, terwijl de variant in de andere site (exon 4) resulteerde in een verhoogde EPHX1 activiteit. Tenslotte werden voor de cytosolische GST's, die vijf subfamilies bevatten (A, alpha; M, mu; P, pi; T, theta; Z, zeta), twee polymorfische genen uitgebreid bestudeerd, nl. *GSTM1* en *GSTT1*, en er werd ingeschat dat deze genen in respectievelijk ongeveer 50 en 15% van Caucasiërs ontbreken

II. DOELSTELLINGEN VAN HET ONDERZOEK

De *algemene doelstelling* van het programma was het onderzoeken van de mogelijkheid om nieuwe methoden te ontwikkelen voor het bepalen van interindividuele susceptibiliteits-/variabiliteitsfactoren, en om hun nut in de arbeidsgeneeskunde te bepalen.

Gebaseerd op de vroegere ervaringen van de partners werden twee test toxische agentia, styreen en kobalt, gekozen voor dit onderzoek.

de *specifieke doelstellingen* voor de UCL groep waren:

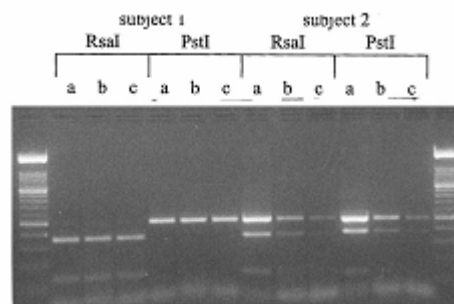
1. ontwikkeling van fenotyperings- (CYP2E1) en genotyperingsmethodes (CYP2E1, CYP2B6, GST's en EPHX1, DNA repair enzymen en HLA polymorfismen).
2. verkenning van de "DNA array microchips" technologie voor genotypering en fenotyping in de arbeidsgeneeskunde (in samenwerking met de VUB).
3. experimentele studie (*in vitro* and *in vivo*) van de impact van de beschouwde polymorfismen (CYP2E1, GST's en EPHX1) op de biotransformatie van styreen (in samenwerking met de andere partners).
4. experimentele studie van de impact van polymorfismen op de repair van oxidatieve schade geïnduceerd door kobalt (in samenwerking met de VUB).
5. biomonitoring studie van de susceptibiliteit in een populatie van arbeiders blootgesteld aan styreen (in samenwerking met de andere partners).
6. biomonitoring studie van de susceptibiliteit in een populatie van arbeiders blootgesteld aan kobalt.
7. studie van de ethische en juridische implicaties van het invoeren van susceptibiliteitstests in de arbeidsgeneeskunde (in samenwerking met de andere partners van het netwerk, in het bijzonder de juristen).

III. BEKOMEN RESULTATEN

1. Ontwikkeling van fenotyperings- and genotyperingsmethoden.

1.1. Genotypering

Genotypering werd uitgevoerd na extractie van genomisch DNA uit een bloedstaal met EDTA. Methoden gebaseerd op klassieke PCR *restriction fragment polymorphism* (RFLP) werden ontwikkeld voor een brede reeks van biotransformatie enzymen (CYP2E1 c1/c2, D/C, A1/A2 en insertiepolymorfismen of CYP2E1*5B, *6, *1B en *1D, respectievelijk), *GSTM1*, *GSTT1*, *EPHX1* exon 3 Tyr113/His113 en exon 4 His139/Arg139) en voor een enzym betrokken in de repair van oxidatieve DNA schade (hOGG1 Ser326/Cys326).



Voorbeeld van een RFLP analyse voor CYP2E1 polymorfismen

Een Real Time PCR methode voor allelische discriminatie werd ook ontwikkeld om de PCR RFLP resultaten voor het exon 4 polymorfisme in het EPHX1 gen te bevestigen dat kon beïnvloed worden door een ander polymorfisme in codon 119. Deze methoden werden geïmplementeerd in verschillende van de hieronder besproken experimentele en veldstudies. CYP2B6 genotypering werd elders ontwikkeld in het kader van de specifieke KUL-studie over de biotransformatie van fentanyl.

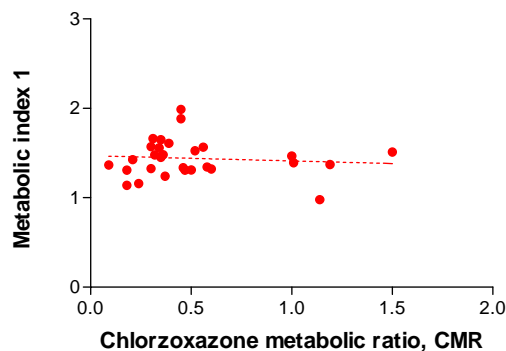
De aanwezigheid van de polymorfismen leidend tot de expressie van Glu69 β werd gedetermineerd met een reverse-sequentie specifieke oligonucleotide (SSO) test, gebruik makend van een probe die specifiek is voor de GAG sequentie in exon 2 van het HLA-DPB1 gen (Innolipa, Innogenetics). De resultaten werden uitgedrukt als aan- of afwezigheid van de polymorfismen, zonder rekening te houden met de allelische combinaties (zie punt 6 hieronder).

1.2. Fenotypering

Hoewel de meest accurate bepaling van CYP2E1 activiteit gebaseerd is op rechtstreekse hepatische meting van 2E1, en dus een leverbiopsie vereist, werden alternatieve benaderingen ontwikkeld om op grote schaal gebruikt te worden met niet-invasieve methoden. Totnogtoe vereiste de “gouden standaard” methode het gebruik van een probe drug (chlorzoxazone, CZX) die toegediend moet worden aan het individu waarvoor een fenotyperingstest nodig is. CZX is een drug die vroeger werd gebruikt als spierontspannend middel, en die in de lever gemetaboliseerd wordt tot 6-hydroxychlorzoxazone (HCZX), een reactie die gemedieerd wordt door CYP2E1. De chlorzoxazone test is algemeen gebaseerd op het toedienen van een

enkele orale dosis van 500 mg (of 250 mg) aan vastende individu's. Verschillende CZX farmacokinetische indices werden voorgesteld om CYP2E1 activiteit te weerspiegelen: plasma CZX $t_{1/2\beta}$, renale excretie van HCZX, orale clearance van CZX, fractionele clearance tot HCZX, en de HCZX zone onder de concentratiecurve (AUC). Van al deze is fractionele clearance van CZX tot HCZX de meest directe maat van CYP2E1 activiteit, en deze dient vaak als standaardmethode waarmee andere voorgestelde methodes worden vergeleken. Deze procedure is echter tijdrovend, onpraktisch (urine collectie, ...), en vereist aanvaarding door de patiënt en catheterisatie gedurende maximaal 12 uur. De ratio aan plasma CZX/HCZX concentraties (chlorzoxazone metabolische ratio, CMR) gemeten 2 uur na de orale CZX dosis wordt algemeen gebruikt als alternatief voor de fractionele clearance van CZX, maar de correlatie tussen beide methoden is relatief laag ($r^2 = 0.16-0.28$), wat erop wijst dat enkel-punt ratio's de CYP2E1 activiteit niet nauwkeurig meten. Bovendien wijzen recente *in vitro* studies erop dat CYP1A1, CYP1A2 en mogelijk CYP3A betrokken zijn in CZX 6-hydroxylatie, wat de specificiteit van CZX voor CYP2E1 fenotypering limiteert.

We voerden een veldstudie uit om de waarde van de CMR te bepalen voor het verfijnen van blootstellingsbiomonitoring. Blootstelling aan styreen werd geselecteerd als modelsituatie (Haufroid et al. 2002a). 31 arbeiders uit een glasvezel versterkte plastic bedrijf namen deel aan de studie. De omgevingsconcentratie aan styreen werd bepaald gedurende de hele werkschift door passieve sampling. Elke arbeider kreeg een 500 mg chlorzoxazone (CZX) tablet aan het begin van de werkdag, en bloed werd na 2 u afgenomen voor het bepalen van de CMR en de CYP2E1 genotypes. Urine werd geïncubated op het einde van de shift voor het bepalen van styreen-specifieke metabolieten. De integratie van de CMR waarde als onafhankelijke variabele om de interindividuele variabiliteit aan excretie van metabolieten in de urine te verklaren was niet conclusief.

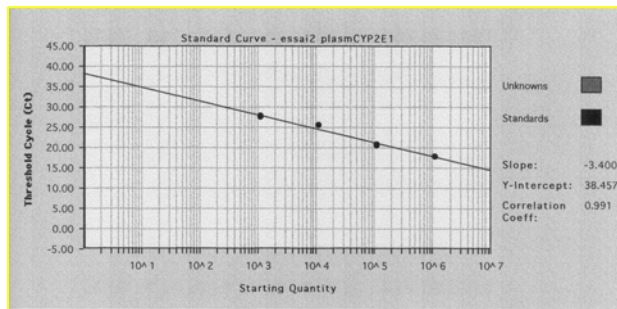


De metabolisatie van styreen (metabolische index 1 : amandel- en fenylglyoxylzuur/styreen in de lucht) is niet gecorreleerd met de chlorzoxazone metabolische ratio (CMR)

Een bijkomende doelstelling was het analyseren van de relatie tussen CYP2E1 activiteit, bepaald met de CMR, en frequente CYP2E1 genotypes (CYP2E1*5B, *6, *1B and *1D). Terwijl de enige arbeider die heterozygoot was voor het CYP2E1*1D allel de hoogste CMR waarde vertoonde, vond men een trend tot lagere CMR waardes voor individu's met minstens één mutant CYP2E1 *6 allel in vergelijking met homozygote wildtypes.

Er werd geconcludeerd dat de CMR test in deze populatie van arbeiders in staat was een kleine invloed van sommige genotypes op de CYP2E1 activiteit te detecteren, maar er moet erkend worden dat deze methode niet gepast is voor het verfijnen van de biologische monitoring van industriële verbindingen die gemetaboliseerd worden door CYP2E1.

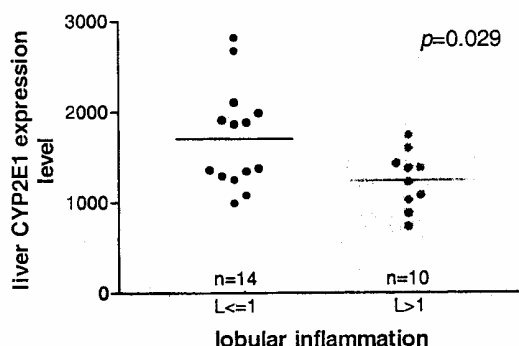
CYP2E1 fenotypering op grote schaal, zoals voor de screening van een groot aantal stalen, voor epidemiologische studies, of zelfs als bijkomende methode voor het verbeteren van een biologisch monitoringprogramma, vereist de implementatie van meer praktische methodes. Een methode voor CYP2E1 fenotypering via reverse transcriptie en real-time PCR werd ontwikkeld, en uitgebreid analytisch en biologisch gevalideerd. Deze methode laat de quantificatie toe van het aantal mRNA kopieën die coderen voor CYP2E1 in menselijke circulerende lymfocyten, en werd gepubliceerd in de internationale literatuur (Haufroid et al. 2001).



Voorbeeld van een calibratiecurve voor CYP2E1 mRNA quantificatie via RT-real time PCR

De biologische validiteit van deze methode werd bestudeerd in verschillende klinische situaties waarvan men weet of vermoedt dat er veranderingen in CYP2E1 expressie in betrokken zijn:

- diabetici : we hebben in een groep van 30 diabetici met onstabiele ziekte (glycosyleerde Hb >6%) aangetoond dat de RT-PCR test op een lymfocytenstaal in staat was om de systemische inductie van CYP2E1 expressie te detecteren die verwacht kon worden in deze ziekte,
- hepatitis : dezelfde methodologie werd toegepast in 30 gepaarde leverbiopsie- en lymfocytenstalen van patiënten met virale hepatitis of controles. In de patiëntengroep werd een vermindering van CYP2E1 expressie waargenomen, in het bijzonder in associatie met centrolobulaire lesies, wat consistent is met onze kennis van de distributie van dit enzym in de leverweefsels. In contrast hiermee werd, zoals verwacht, geen verandering waargenomen in perifere lymfocyten die niet aangetast waren door dit type pathologie,



CYP2E1 expressie niveaus volgens Ludwig's histologische score voor lobulaire inflammatie

- fenotype-genotype relatie: we hebben ook aangetoond dat de expressie van CYP2E1 in lymfocyten van individu's drager van een C allel (D/C polymorfisme van het CYP2E1

gen) significant gereduceerd is (Haufroid et al. 2002a), wat consistent is met de gepubliceerde data,

- N-methylpyrrolidone (NMP): de quantificatie van mRNA voor CYP2E1 werd ook geïmplementeerd in een studie uitgevoerd in vrijwilligers uit ons laboratorium, betreffende het metabolisme van NMP na aanbrengen via de huid en de rol van CYP2E1 in de biotransformatie van deze industriële solvent (Ligocka et al. 2003). Er werden drie experimentele benaderingen gebruikt: in de rat, *in vitro* in menselijke microsomen, en in menselijke vrijwilligers. NMP werd via de huid aangebracht (40 mg/kg) bij OFA ratten om de invloed van CYP2E1 inhibitie (5 mg/kg diethyldithiocarbamate, DETC, 30 min ervoor) en CYP2E1 inductie (na 4 dagen vasten) na te gaan. De voornaamste NMP metaboliet 5-hydroxy- N-methylpyrrolidone (5HNMP) in de urinefracties verzameld gedurende de volgende 48 u werd geanalyseerd via gas chromatografie-massa spectrometrie. CYP2E1 inhibitie leidt tot een statistisch significante vertraging van 5HNMP excretie in urinefracties gecollecteerd gedurende de eerste 12 u. In de groep vastende ratten werd een tweevoudige toename aan CYP2E1 activiteit waargenomen in vergelijking met de controlegroep. Gedurende de eerste 6 u na dermale toediening van NMP aan vastende ratten werd ongeveer 33% van de dosis geëxcreteerd in urine versus 22% in controles. *In vitro* werd NMP (15 mM) geïncubeerd (tot 120 min) met menselijke levermicrosomen, en de vorming van 5HNMP volgde de Michaelis-Menten kinetiek met een $V(\max)$ van 1.1 nmol/min per mg proteïne en een $K(m)$ van 2.4 mM. De vorming van 5HNMP werd voor 35% geïnhibeerd in aanwezigheid van een monoklonaal antilichaam tegen CYP2E1, maar niet door CYP1A2 antilichaam. In een experiment met dermale toediening werden 12 menselijke vrijwilligers blootgesteld aan 300 mg NMP via een huidpatch; vijf urinestalen werden verzameld gedurende de 48 u na de start van de toediening om de voornaamste metabolieten 5HNMP en 2-hydroxymethylsuccinimide (2HMSI) te meten. Vóór toediening van NMP werd een bloedstaal afgenomen voor de quantificatie van CYP2E1 mRNA in perifere bloedlymfocyten (PBL's). De gemiddelde dermale absorptie aan NMP was 67.9%. De hoogste hoeveelheid aan 5HNMP werd geëxcreteerd in de urine van de fractie verzameld tussen 6 en 12 u (12.6%), terwijl 2HMSI pekte in de fracties 12-24 u en 36-48 u (respectievelijk 3.3 en 3.2% van de dosis). Er werd een significante relatie gevonden tussen de hoeveelheid CYP2E1 mRNA in PBL's en de hoeveelheid van beide metabolieten geëxcreteerd in urine binnen de 24u ($r^2=0.54$, $P<0.01$). Er werd geconcludeerd dat CYP2E1 betrokken is in de eerste stappen van het NMP metabolisme in de rat en, in mindere mate, bij de mens. Aangezien er grote variaties in CYP2E1 activiteit bestaan in menselijke populaties (een tenminste vijfvoudige range), lijkt het verantwoord om rekening te houden met de activiteit van dit enzym voor de accurate interpretatie van biologische monitoring van blootstelling aan NMP wanneer men gebruik maakt van het bepalen van 5HNMP en/of 2HMSI in urine.

Over het algemeen ondersteunen deze data de validiteit van de ontwikkelde methode die toelaat om responsen te detecteren die consistent zijn met de biologie van de onderzochte situaties. Deze waarnemingen werden samengevat in twee publicaties (Ligocka et al. 2003, Haufroid et al. 2003).

Deze data werden ook voorgesteld op het international symposium over biomonitoring dat plaatsvond in Banff in september 2001.

Hiernaast werd deze methodologie toegepast in het kader van een Europees onderzoeksprogramma waarin vrijwilligers blootgesteld aan een gecontroleerde concentratie aan styreen en arbeiders werden gemonitord voor een range aan blootstellingsbiomerkers (Haufroid et al. 2002b).

De genotyperingsmethoden ontwikkeld voor dit programma werden ook gevaloriseerd in een studie uitgevoerd in samenwerking met een Japans team dat geïnteresseerd was in de biotransformatie van dimethylformamide (DMF) in arbeiders (Nomyiama et al., 2001). Deze studie bestudeerde of het belangrijk is rekening te houden met het *1C/*1D CYP2E1 insertie polymorfisme voor het interpreteren van de biologische monitoring van blootstelling aan N,N-dimethylformamide (DMF) in Japanse arbeiders. Het insertie genotype, blootstelling aan DMF in de lucht gedurende de laatste dag van een werkweek, en NMF in urinestalen vlak na de laatste werkshift van de week werden bepaald in 44 mannelijke en vrouwelijke Japanse arbeiders. De allelische frequentie van dit CYP2E1 polymorfisme was 0.261 in deze Japanse arbeiderspopulatie. Het CYP2E1 insertie polymorfisme had geen invloed op de NMF niveaus, zelfs na het in rekening brengen van de BMI of alcoholconsumptie.

De resultaten wijzen erop dat het CYP2E1 insertie polymorfisme geen belangrijke determinant blijkt te zijn voor de interpretatie van biologische blootstelling aan DMF via meting van NMF in urine.

2. verkenning van de "DNA array microchips" technologie voor genotypering en fenotypering in de arbeidsgeneeskunde.

In samenwerking met Prof. Kirsch-Volders (VUB) werden verschillende contacten opgenomen om de mogelijkheden te verkennen voor het overbrengen van onze resultaten, bekomen met artisanale genotyperings- en fenotyperingsmethoden, naar een meer gesofisticeerde technologie.

Twee soorten technologieën werden verkend:

- DNA microchips die de quantificatie van gen expressie toelaten
- Genotypering macroarrays ontworpen om single nucleotide polymorfismen (SNP's) te detecteren

Er werd contact opgenomen met 3 partners: de onderzoeksgroep van Prof. J. Remacle (Facultés ND de la Paix in Namur), de groep van Dr. P. Van Hummelen (Centre for Microarray Technology, VIB) in Leuven, samen met een partner uit de industrie.

Tonogtoe zijn onze contacten nog steeds verkennend aangezien het aantal genen of polymorfismen bestudeerd in het kader van onze projecten gelimiteerd blijft, en het gebruik van zulke gesofisticeerde en kostelijke technologieën daarom niet verantwoord leek.

3. experimentele studie van de impact van de beschouwde polymorfismen (CYP2E1, GST's and EPHX1) op de biotransformatie van styreen.

Een studie werd uitgevoerd in menselijke vrijwilligers die blootgesteld werden aan styreendampen in het kader van een Europees project (Suscepstyrene) (Haufroid et al. 2002). Styreen is één van de chemicaliën waarvoor biologische monitoringprogramma's gevalideerd en geïmplementeerd werden in omgevingsstudies en arbeidsgeneeskunde. Er bestaan echter interindividuele verschillen in de urinaire excretie van zowel de voornaamste eindproducten (amandelzuur en fenylglyoxylzuur) als voor zijn specifieke mercapturische zuren (phenylhydroxyethylmercapturic acids, PHEMA). Dit limiteert in zeker mate het gebruik van deze metabolieten voor een accurate bepaling van blootstelling aan styreen. In een groep van 26 vrijwilligers, geselecteerd met relevante genotypes en blootgesteld aan styreendampen (50 mg/m³, 8 h) in een inhalatiekamer, evalueerden we of genotypering/fenotypering van

relevante drug-metaboliserende enzymen (CYP2E1, EPHX1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1) de geobserveerde interindividuele variabiliteit aan urinaire metabolietenexcretie zou kunnen helpen verklaren. PBL's werden gebruikt voor genotypering en als reporter cellen voor de fenotypering van CYP2E1 en EPHX1.

Het GSTM1 genotype was duidelijk de meest significante parameter voor het verklaren van de variantie aan urinaire PHEMA excretie (6-maal lager in GSTM1 null individuen; $P < 0.0001$), zodat systematische genotypering voor GSTM1 zou moeten aanbevolen worden voor een correcte interpretatie van niveaus aan PHEMA in urine.

De variante allelen CYP2E1*6 (7632T>A) en His113EPHX1 waren geassocieerd met een significante vermindering van respectievelijk de expressie ($P = 0.047$) en activiteit ($P = 0.022$) van het enzym in PBL's.

In combinatie met genotypering van GSTM1, contribueerde de fenotypering ook tot het verbeteren van de interpretatie van urinaire resultaten, zoals geïllustreerd door het gecombineerd effect van CYP2E1 expressie en de GSTM1 allelische status die 77% van de variantie aan PHEMA excretie verklaren, en het aanraden van mercapturaten toelaat als specifieke en betrouwbare biomerkers voor blootstelling aan styreen.

Determinanten van de urinaire excretie van styreen metabolieten (CYP2E1 fenotypering inbegrepen).

Dependent variables	Independent variables	Partial r^2	Slope	p value*
MA excretion	CYP2E1 mRNA	0.22 Model r^2 : 0.22	positive	0.016
Total VP excretion	BMI	0.13	negative	0.066 ^a
Total mercapturic acids	GSTM1 Tobacco consumption	0.71	positive	0.0001
		0.07 Model r^2 : 0.78	negative	0.014
Total mercapturic acids**	GSTM1*CYP2E1 mRNA	0.77 Model r^2 : 0.77	positive	0.0001

* partiële r^2 p waarde.

De geteste onafhankelijk variabelen waren vijf niet verwante polymorfismen (GSTM1, GSTT1, GSTP1, EPHX1(exon3 and 4)), CYP2E1 mRNA expressie in PBL's, BMI, alcohol consumptie, tabaksconsumptie en leeftijd.

** Dezelfde onafhankelijke variabelen werden geselecteerd met drie first order interaction termen GSTM1*CYP2E1 mRNA, GSTM1*GSTT1 en GSTM1*GSTP1 (na uitsluiting van één "outlier").

^a eerste onafhankelijke variabele geselecteerd door het model maat uitgesloten in de eerste stap omdat $p > 0.05$.

Dit werk werd gepubliceerd in de internationale literatuur, en de ECETOC science award 2003 werd uitgereikt aan V. Haufroid voor deze vernieuwende publicatie op gebied van toxicologie.

4. experimentele studie van de impact van polymorfismen op de repair van oxidatieve schade geïnduceerd door kobalt (in samenwerking met de VUB).

zie VUB verslag.

5. biomonitoring studie van de susceptibiliteit in een populatie van arbeiders blootgesteld aan styreen (in samenwerking met de KUL, ULg en VUB).

DE UCL onderzoeksploeg was verantwoordelijk voor de genotypering van de biotransformatie enzymen in een andere studie uitgevoerd op arbeiders blootgesteld aan styreen. Deze studie omvatte 44 arbeiders blootgesteld aan styreen en 44 *matched* referenten, en bestudeerde de invloed van genetische polymorfismen in biotransformatie en DNA repair enzymen op N-terminale Hb adductniveaus en genotoxische effecten (Godderis et al., submitted). De MA concentratie in urine was $201.57 \text{ mg/g cr} \pm 148.32$, wat overeenkomt met een berekende gemiddelde blootstelling aan styreen in de lucht van $9.5 \text{ ppm} \pm 9.6$. Individu's met een hoog gehalte aan N-terminale valine adducten vertoonden meer DNA schade geëvalueerd met de comet assay ($r=0.29$, $p=0.008$). Frequenties aan micronuclei (MN/1000 cellen) in mononucleaire lymfocyten (MNMC) (0.71 ± 0.88 vs. 0.11 ± 0.20 , $p<0.0001$), binucleaire lymfocyten (MNCB) (3.93 ± 2.75 vs. 2.65 ± 1.94 , $p=0.02$) en MN in nasale cellen (0.52 ± 0.49 vs. 0.23 ± 0.31 , $p=0.04$) verschilden significant tussen de blootgestelde en referentiegroep. Vroege en late *in vitro* repaircapaciteit werd ook beïnvloed door blootstelling aan styreen. De invloed van genetische polymorfismen van metaboliserende en repair enzymen werd bestudeerd. Hogere frequentie aan MNMC werden gevonden in individu's met een XRCC3 Met²⁴¹ allel, individu's met een XRCC1 Gln³⁹⁹ allel, en aan styreen blootgestelde arbeiders die homozygoot zijn voor EPHX1 His¹³⁹ ($p=0.044$). Analyse van de *in vitro* strand break repair fenotype data toonde een snellere start van DNA repair na 1 u in individu's heterozygoot voor XRCC1 Arg²⁸⁰ ($p=0.043$) en in individu's met GSTT1 ($p=0.043$). In individu's homozygoot voor XRCC1 Arg¹⁹⁴ werd hogere residuele DNA schade gevonden 24 u na *in vitro* blootstelling aan styreen oxide ($p=0.013$). Het moet vermeld worden dat multivariate analyse geen significante invloed van het genotype op de resultaten van de assays kon aantonen, wat waarschijnlijk te wijten is aan het geringe aantal deelnemers in deze studie.

Als besluit kan gesteld worden dat de data erop wijzen dat chromosoom-/genoommutaties gevormd worden in arbeiders blootgesteld aan lage concentraties styreen. De duur van blootstelling, leeftijd en rookgewoontes zijn belangrijke te beschouwen variabelen in studies die de genotoxische effecten op arbeiders evalueren. Genotypering van metaboliserende en DNA repair enzymen is belangrijk voor het bepalen van individueel risico voor styreen. Het in vitro strand break fenotype zou een waardevolle methode kunnen zijn om de repaircapaciteit van arbeiders in te schatten.

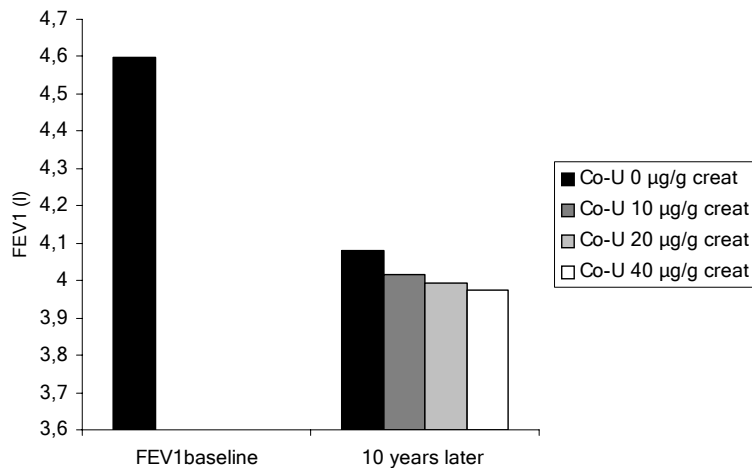
6. biomonitoring studie van de susceptibiliteit in een populatie van arbeiders blootgesteld aan kobalt.

De respiratorische ziekten die geassocieerd zijn met beroepsblootstelling aan kobalt zijn o.a. bronchiale astma, chronische bronchitis, en *hard metal disease* (HMD), een fibroserende alveolitis die vooral werd beschreven in arbeiders blootgesteld aan een mengsel van kobalt metaal en carbides in de hard metaalindustrie. Vanwege de karakteristieken van de ziekte, zoals haar lage prevalentie in blootgestelde arbeiders of het ontbreken van een correlatie met de intensiteit of de duur van de blootstelling, hebben auteurs het bestaan van een mogelijk genetische susceptibiliteit voor HMD voorgesteld. Met name de substitutie van een lysine residu door glutamaat op positie 69 in de HLA-DP beta keten (Glu69 β) zou zwak geassocieerd zijn met HMD. Een verhoogd risico op longkanker werd ook waargenomen in de hard metaalindustrie.

Een cross-sectionele studie uitgevoerd eind jaren '80 in een bedrijf dat metallisch kobalt, kobalt oxiden en zouten produceert detecteerde geen tekens van fibrotische ziekte in de 82 onderzochte Co-arbeiders, op basis van long radiografieën en metingen van longvolumes en diffusie capaciteit. Blootgestelde arbeiders klaagden echter vaker over ademhalings-symptomen dan controles, en er werd een negatieve relatie gevonden tussen longfunctie-parameters (vooral FEV1) en de intensiteit of duur van de blootstelling. Aangezien deze bevindingen een risico op respiratoire effecten suggereerden werden in dit bedrijf technische en hygiënische verbeteringen uitgevoerd om blootstelling te verminderen. Vanaf 1988 werd ook een periodieke monitoring van de longfunctie van de arbeiders geïmplementeerd. Arbeiders werden dus met intervallen onderzocht voor spirometrische parameters, en blootstelling aan kobalt werd tenminste jaarlijks bepaald door de meting van kobalturie. Gebaseerd op dit 13-jarig opvolgingsprogramma (1988-2001) was genoeg informatie beschikbaar om in een longitudinale studie een mogelijk effect van blootstelling aan kobalt op de longfunctieparameters te onderzoeken.

We analyseerden dus deze data met als doel het identificeren van de oorzaken van veranderingen in longfunctie in arbeiders uit dit kobalt-producerend bedrijf die betrokken waren in het respiratorisch monitoringprogramma tussen 1988 en 2001. 122 mannelijke arbeiders met tenminste drie longfunctie tests (FEV1, FVC) gedurende de opvolgingsperiode werden geëvalueerd. De mogelijke associatie tussen spirometrische veranderingen en blootstelling aan kobalt werd cross-sectioneel en longitudinaal bestudeerd, gebruik makend van een *random coefficient* model, rekening houdend met andere potentieel beïnvloedende variabelen als roken, leeftijd, voorafgaande ademhalingsziekte, blootstelling aan andere stoffen toxisch voor de longen, en de aanwezigheid van Glu69 β , een HLA-polymorfisme dat mogelijke geassocieerd is met door hard metaal geïnduceerde longziekten. Blootstelling aan kobalt verminderde significant gedurende de opvolgingsperiode, zoals weerspiegeld door de metingen in lucht en urine. De cross-sectionele analyse in 2001 toonde geen associatie aan.

De voornaamste bevinding was dat blootstelling aan kobalt bijdroeg tot vermindering van FEV1, maar niet FVC, met de tijd, en dit enkel in rokers. Er werd geen invloed van Glu69 β polymorfisme waargenomen. Hoewel de amplitude van de bijkomende vermindering geassocieerd met blootstelling relatief klein was (<20%) in vergelijking met de verwachte vermindering in rokers, wezen de resultaten erop dat verdere inspanningen om blootstelling te verlagen en arbeiders te motiveren om te stoppen met roken nog steeds gerechtvaardigd zijn.



Verwachte verminderingen in FEV1 (ml) na 10 jaar blootstelling aan kobalt berekend voor een 30-jarige rokende arbeider, gebaseerd op de schattingen bekomen uit het random coefficient model.

7. studie van de ethische en juridische aspecten van het invoeren van susceptibiliteitstesten in de arbeidsgeneeskunde.

De UCL-onderzoekers betrokken in dit programma waren constant in contact met de partners die de ethische en juridische aspecten van het testen op susceptibiliteit en genotoxiciteit in de arbeidsgeneeskunde onderzochten. Uitwisseling van informatie en meningen vonden plaats ter gelegenheid van de regelmatige meetings georganiseerd door de coördinator, en door de meer frequente en informele meetings tussen de onderzoekers. D. Lison was lid van het begeleidend doctoraal comité van N. Hautenne (Prof P. Vielle, UCL).

D. Lison werd ook uitgenodigd door de Commissie van sociale zaken van de Belgische Senaat om de senatoren te adviseren over het wetsproject betreffende genetische tests in de arbeidsgeneeskunde ingediend door senatoren Mahoux en Van Lerberghe. Dit voorstel werd nu gepubliceerd in de vorm van een Koninklijk Besluit.

D. Lison gaf ook een presentatie over het gebruik van genetische tests in de arbeidsgeneeskunde gedurende de workshop georganiseerd door het DWTC in oktober 2003 (zie annex II).

8. valorisatie

doctoraatsthesisen

De meeste data betreffende genotypering, fenotypering en styreen metabolisme werden opgenomen in de doctoraatsthesis van V. Haufroid (promotor D. Lison, l'UCL), verdedigd op 27 november 2002.

D. Lison was ook co-promotor van de doctoratsthesis van M. De Boeck (promotor M. Kirsch-Volders, VUB), verdedigd op 29 oktober 2002.

De data betreffende longwerking in arbeiders blootgesteld aan kobaltverbindingen zullen geïntegreerd worden in de doctoraatsthesis van Dr. V. Verougstraete (promotor D. Lison, UCL).

Publicaties

De data bekomen gedurende dit onderzoeksprogramma werden gevaloriseerd door een totaal aan 21 wetenschappelijke publicaties (zie Annex II).



Promotor: Prof. Dr. P. Vielle
Wetenschappelijk medewerker: N. Hautenne

Université catholique de Louvain
Département de Droit Economique et Social

VERANDERINGEN VAN HET BEGRIP BEROEPSRISICO GETOETST AAN DE GENETICA EN JURIDISCHE IMPLICATIES OP GEBIED VAN PREVENTIE EN VERGOEDING VAN BEROEPSZIEKTEN.

INLEIDING

1- Context en algemeen kader van het onderzoek

Het huidige onderzoek betreft het gebruik van genetische tests in werkrelaties. Dit onderzoek werd uitgevoerd in het kader van een interdisciplinair (biologie, genetica, arbeidsgeneeskunde, toxicologie, ...) en Belgisch interuniversitair netwerk.

Het wetenschappelijk deel van het project betreft de mogelijkheid en het nut te beschikken over genetische tests in de context van preventie inzake gezondheid op het werk. Het juridische deel van het project heeft als doel het begeleiden van dit wetenschappelijk werk met een studie van de voorwaarden voor het toepassen van deze tests. Deze vraag leidt vandaag de dag tot meerdere wetgevende tussenkomsten zowel op Belgisch als internationaal vlak. Als voorbeelden vermelden we het recente ontwerp voor een internationale verklaring van UNESCO, het advies van de Europese groep voor ethiek, de Belgische wet van 28 januari 2003 betreffende medische onderzoeken in het kader van de werkrelaties, ... (UNESCO, 2003; groupe européen d'éthique, 2003) Deze interventies benadrukken de angst die een niet-omkaderd gebruik van genetische tests oproept, en tonen aan hoe dringend het is na te denken over de principes en waarden die de basis vormen van een juridisch duidelijk en geruuststellend kader.

2- Doel van het onderzoek

Het juridische luik van het project is bestemd voor het evalueren van de verschillende parameters die toelaten de vraag van de "toepasbaarheid" van genetische tests in de beroepsomgeving te beantwoorden. Wat zijn de betrokken waarden? Wat zijn de regulatorische middelen die toelaten hierop te antwoorden? Zijn deze voldoende?

Meer specifiek willen we de potentiële gevolgen van de introductie van genetische tests in de werkrelaties weergeven vanuit de manier waarop het sociaal recht het begrip "beroepsrisico" definieert, en waarop dit risico aangepakt wordt in systemen voor preventie en vergoeding van beroepsziekten.

THEORETISCHE KADER

1. In een eerste fase werd het theoretische kader van fundamentele rechten, en meer bepaald het recht op respect van het privé-leven, gekozen om te analyseren wat er op het spel staat bij het gebruik van genetische tests in de beroepsomgeving. Medische, en *a fortiori* genetische tests vormen een inbreuk op de fysieke integriteit en het privé-leven van een persoon. In deze mate zijn ze in principe verboden. Bepaalde tests zijn echter rechtmatig wanneer ze beantwoorden aan wettelijk vastgelegde voorwaarden. Dit werk heeft ons toegelaten te antwoorden op bepaalde vragen en om bepaalde voorwaarden voor het toepassen van genetische tests te formuleren.

2. In een tweede fase werd het perspectief van het sociaal recht aangenomen. Het theoretische kader steunt op het begrip van beroepsrisico zoals deze voortkomt uit de analyse van F. Ewald in zijn werk over de ‘verzorgingsstaat’.

De verzorgingsstaat ontstaat volgens F. Ewald als gevolg van de historische conjunctie van twee gebeurtenissen: een wetenschappelijke ontdekking enerzijds: probabiliteiten en statistiek, en anderzijds het besef van de tekortkoming van het liberaal model en de noodzaak een ander model te vinden ten gevolge van de problematiek van de ontwikkeling van de industrialisering en het fenomeen werkongevallen.

De ontdekking van statistieken en probabiliteiten is het technische middel dat zal toelaten om gerechtigheid in termen van mutualisering te herdenken, en dus de verandering van de manier waarop de verdeling van lasten tussen individu's, de markt en de staat gebeurt. In het liberale model zocht men immers de oorzaak van de schade, en werd de kost hiervan aangerekend aan de schadeverwekker, uitgaande van het principe dat “natuurlijke” verdeling van het recht en het onrecht een beginsel van gerechtigheid was. Met probabiliteiten en statistiek wordt het mogelijk het verband tussen het individu en de maatschappij te herdenken.

Anderzijds, wijzen de ontwikkeling van de industrialisering en de ongevallen/rampen die hiermee gepaard gaan op de gebreken van het liberale model, en zorgen ze voor een scheiding tussen het recht en de meest voor de hand liggende vereisten van billijkheid.

Door deze vereniging van factoren ontstaat het begrip van beroepsrisico gebaseerd op het idee dat het vrijheidsprincipe niet voldoende beantwoordt aan de sociale vragen. Men zou zich voortaan moeten wenden tot de plicht, en dus tot de wet. Het begrip beroepsrisico bevat een verdeeldheid tussen causaliteit en het toerekenen van de lasten verbonden aan risico's. Een toerekeningprincipe refereert dus niet meer naar de objectieve causaliteit van de schade (nieuwe verhouding van de mens t.o.v. de natuur).

Dit systeem brengt een nieuwe gelijkheidsregel met zich mee. Niet meer een formele gelijkheid, noodzakelijk bij het opstellen van het contract, of een gelijkberechtigtheid, maar een feitelijke gelijkheid gebaseerd op de voorafgaande en feitelijke opsporing van ongelijkheden. Gelijkheid meet zich af aan een concept van gemiddelde en evenwicht, door een regelmatige vaststelling van de relatie van de maatschappij met zichzelf. Gelijkheid wordt concreet bepaald door een gemiddelde.

J. Rawls legt uit dat ons begrip van gerechtigheid, gebaseerd op gelijkheid, pas begrepen wordt vanuit een principe dat men compleet onwetend is over onze individuele toekomst (Rawls, 1997). Het is hier dat de vraag van genetische tests en hun gevolg op het solidariteitsprincipe en het sociale contract zich stelt (Ewald, 1993).

Onze voornaamste hypothese is de volgende: de conjunctie tussen het gebruik van genetische informatie in de beroepsomgeving en de huidige socio-economische context, die een rol speelt in de transformatie van het begrip risico (door het toelaten/accentueren van een anticipatie en individualisatie van dit risico), zal een transformatie van het beheer van preventie en vergoeding van beroepsrisico met zich meebrengen.

METHODE

1- Historische en beschrijvende benadering

Analyse van de evolutie van het begrip beroepsrisico doorheen opeenvolgende wetgevingen, evenals de parlementaire werken zowel op gebied van preventie als van vergoeding van het risico op een beroepsziekte.

2 – Multidisciplinaire en prospectieve benadering

Multidisciplinair

- Studie van de rol en werking van genen in pathologische processen dankzij gesprekken met de biologen, genetici en geneesheren betrokken bij het DWTC project en na consultatie van verschillende populair-wetenschappelijke bijdragen.
- Integratie van een sociologische dimensie met het oog op het begrijpen van de constructiemodellen van het begrip risico en van de genetica in de werkrelaties.

Prospectief

- Rekening houden, in de huidige socio-economische context, met de transformaties van het begrip « beroepsrisico » voor het gebruik van genetische tests in het kader van de werkrelaties, om er verschillende modellen uit te halen voor de evolutie van systemen van preventie en vergoeding.

3 – Een met de context rekening houdende benadering

- In perspectief zetten van de resultaten in de huidige economische en sociale context (productiviteit, competitiviteit, flexibiliteit, globalisering, ...) die de werkomstandigheden bepaalt.

RESULTATEN EN BESPREKING

1- Wetenschappelijke benadering van de genetica

Het eerste deel van dit onderzoek werd gewijd aan het begrijpen van de genetica vanuit een wetenschappelijk standpunt. De samenwerking in een interdisciplinair netwerk liet regelmatige discussies en contacten toe die een goed verstaan van deze begrippen heeft vergemakkelijkt.

- Begrip van bepaalde wetenschappelijke noties : onderscheid tussen een monogene en multifactoriële ziekte, genetisch polymorfisme, susceptibiliteitstests en monitoringtests, biomerkers voor vroege effecten, adducten, metabolisatieprocessen, gevoeligheid van een test, specificiteit, betrouwbaarheid, predictieve waarde, prevalentie, vals positieven, mutagene/genotoxische stoffen, ...

- Begrip van bepaalde mechanismen : metabolisatie van stoffen, maat van blootstelling, rol en grenzen van de genetica in de pathologische processen van beroepsziekten.

- Onderscheid tussen genetische tests voor susceptibiliteit en voor monitoring. Susceptibiliteitstests hebben als doel het identificeren, op niveau van het genoom, van bepaalde genen betrokken in pathologische processen. Monitoringtests hebben betrekking tot de analyse van vroegtijdige effecten van bepaalde zogeheten genotoxische of mutagene stoffen op het genetisch materiaal. Dit zijn biomerkers van vroege effecten. Deze genetische “lesies” zouden het bestaan kunnen verklaren van een verhoogd risico op het verschijnen van een ziekte (bv. bepaalde beroepskankers).

2- Analyse van het internationaal, Europees, en Belgisch juridisch kader

Een analyse van het geheel aan maatregelen toepasbaar op deze problematiek werd uitgevoerd om de buitenlijnen te bepalen van een bestaand juridisch kader, evenals de uitgebrachte voorwaarden in de verschillende juridische ordes. Deze studie is een noodzakelijke voorafgaande stap voor het begrijpen van wat er allemaal op het spel staat, met het oog op het kiezen van een regulatorisch kader. Deze bepalingen werden vervolgens gebruikt om drie belangrijke kwesties betreffende de toepassing van genetica in de gezondheidspreventie op het werk te bestuderen, nl. discriminatie, monitoring van de gezondheid op het werk, en toestemming. Deze analyse liet ons toe de coherentie tussen de regulatorische systemen in vraag te stellen.

- Wat discriminatie betreft, hebben we een unanimitieit waargenomen wat betreft het verbieden van elke discriminatie op basis van genetische karakteristieken. Er bestaan evenwel grote divergenties tussen de middelen die zouden moeten toegepast worden om dit verbod waar te maken (verbod op alle toegang tot genetische informatie, verbod een test uit te voeren en/of informatie te vragen die elders bekomen werd, beperking van de toegang tot een test met bepaalde doeleinden (controleprobleem), duidelijke en ingelichte toestemming van de persoon, ...)

- Wat de monitoring van de gezondheid op het werk betreft, vergemakkelijkt het bestaan van meerdere bronnen de coherentie en enigheid van de concepten niet steeds. Vele vragen blijven onbeantwoord voor wat betreft de precieze omtrek van de monitoring van gezondheid op het

werk: Wat zijn de finaliteiten die het uitvoeren van een genetisch/HIV test zouden verantwoorden voor in dienst name, en dus een selectie op basis ervan? Wat betekent het begrip “onmiddellijke bescherming” van het individu? Kunnen preventie van de gezondheid van de werknemer en/of werkcollega’s en/of derden (leveranciers, klanten, ...) ook aangevoerd worden? Moeten deze tests door de wet uitdrukkelijk voorzien of uitdrukkelijk verboden worden? Is monitoring van de gezondheid op het werk van openbare orde? En is dat geval, zouden genetische tests dan noodzakelijkerwijs verplicht of facultatief zijn? Bestaat er een exclusiviteit van de competentie van een arbeidsgeneesheer?

- Tenslotte, wat de kwestie toestemming betreft, verschillen de bepalingen sterk. Sommigen beschouwen het toestemmen als een uitzondering op het verbod op genetische tests. Anderen maken het een voorwaarde voor de validiteit van de test. Anderen tenslotte beschouwen dat toestemmen op zich, gezien de ongelijkheid tussen werkgever en werknemer, onvoldoende is voor het rechtvaardigen van het uitvoeren van genetische tests.

3- Genetische tests en het recht op het respect van het privé-leven

Dit deel bestond eruit het begrip privé-leven en zijn toepassing op de werkrelatie vanuit een theoretische standpunt te bestuderen en te begrijpen. De vraag was: bieden de fundamentele rechten en meer bepaald de rechten betreffende het privé-leven, in afwezigheid van een specifieke wetgeving betreffende genetische tests in het kader van het aannemen of van het uitvoeren van het werkcontract, een voldoende antwoord op de vragen die opkomen bij het toepassen van genetische tests door de werkgever?

Zo hebben wij het gebruik van genetische tests geconfronteerd met de voorwaarden gesteld in artikel 8 van de Europese Conventie van de mensenrechten, betreffende het recht op respect van het privé-leven. Deze studie heeft ons toegelaten na te gaan of aan de voorwaarden vereist in deze maatregel voldaan wordt bij het toepassen van genetische tests in een professionele context (Convention de sauvegarde des droits de l’homme et des libertés fondamentales, 1950). Deze voorwaarden luiden als volgt: legaliteit, finaliteit en proportionaliteit. Ze laten toe om reeds in een eerste stap bepaalde vragen te beantwoorden, en het gebruik van bepaalde tests (bv. genetische susceptibiliteitstests voor niet-beroepsgebonden ziekten voor het aannemen van een werknemer, zie *infra*) uit te sluiten. Dit eerste deel van het onderzoek heeft ook toegelaten de grenzen te bepalen van het theoretische kader van “fundamentele rechten” in de context van de professionele verhoudingen tussen een werkgever en werkgevers/kandidaten voor een job. We denken dat dit kader niet toelaat het geheel aan vragen die ontstaan bij het toepassen van genetica in de professionele context te beantwoorden.

4- Sociologische benadering van de genetica

Dit deel liet ons toe het gebruik van genetica in de context van de werkrelatie te beschouwen, er de gevolgen en implicaties van te bestuderen, en verder:

- De mechanismen en wat op het spel staat in de sociale voorstellingen van de genetica op het werk (sociale aspecten van de genetica) als instrument voor gezondheid op het werk te begrijpen. De werkrelatie wordt gekenmerkt door een zekere verdeling van macht en controle. Sociologische studies (Lebeer et al., 1997; Draper, 1986) hebben aangetoond dat de sociale voorstellingen van de genetica (susceptibiliteits- en monitoringtests) van werknemers en werkgevers opmerkelijk verschillen. Deze studies tonen aan dat syndicaten vooral gekant

zijn tegen genetische susceptibiliteitstests om redenen van discriminatie, en voornamelijk positief staan t.o.v. monitoringtests om redenen van bescherming van de gezondheid. In tegenstelling hiermee staan werkgevers eerder positief t.o.v. susceptibiliteitstest om redenen verbonden met de kost van preventie, en negatief t.o.v. monitoring, die ze als “ontmoedigend” voor de werknemers beschouwen. In plaats van de wetenschappelijke “objectiviteit”, zijn het over het algemeen deze sociale voorstellingen die aan de basis van het wetgevende werk liggen.

- De verschillende argumenten analyseren die naar voren gebracht werden in het kader van het debat over *genetisch exceptionalisme*. Is genetische informatie zo verschillend van andere medische informatie dat een nieuwe specifieke wetgeving nodig is zoals onlangs werd gedaan door de Belgische wetgever (wet van 28 januari 2003). De voornaamste argumenten en tegenargumenten bestudeerd in dit debat kunnen als volgt kort samengevat worden:

- Het eerste argument is gebaseerd op de predictieve kracht van genetica, de capaciteit van genetische informatie om de toekomstige gezondheid van individu's te “voorspellen”. Genetische informatie is echter niet de enige informatie met betrekking tot de toekomstige gezondheid van een individu. Deze voorspelling kan inderdaad resulteren uit informatie over familiale antecedenten of op andere medische en niet-medische criteria.
- De tweede reden voor het verantwoordelijk van een specifieke verwerking van genetische informatie betreft de implicaties van deze genetische informatie op familieleden. Maar, opnieuw is deze informatie niet de enige die gevolgen heeft voor de familie, bv. informatie betreffend HIV (risico op besmetting), of kanker ontwikkeld als gevolg van blootstelling aan bepaalde toxines aanwezig in de familiale omgeving
- Het potentieel discriminatorische karakter van genetische informatie. Dit is echter weer geen specificiteit van de genetica. Discriminatie bestaat en zal blijven bestaan zolang er verschillen bestaan tussen individu's of deze nu van genetische oorsprong zijn of niet.
- Er werd ook vermeld dat de specificiteit van de genetische informatie zou steunen op de individuele aard ervan. Maar andere informatie heeft een nog sterkere identificerende aard dan genetische informatie (die identiek is bij tweelingen): menselijke irisanalyse die uniek is, zelfs bij tweelingen.

Het lijkt er dus op dat genetische informatie niet fundamenteel verschilt van andere medische informatie. wat niet inhoudt dat het niet noodzakelijk, en zelfs wenselijk is, om ze anders te behandelen dan andere medische informatie (Murray, 2001; Lemmens & Austin, 2001; Gostin & Hodge, 1999).

Sommigen zijn echter van mening dat de genetica onze opvatting van gezondheid en ziekte radicaal verandert. Er bestaat nu inderdaad een “gezonde risicogroep” (Ross, 1992; Nelkin, 1992). Deze verandering accentueert de noodzaak om de geneeskunde te transformeren, gaande van een geneeskunde van *post facto* interventie naar een geneeskunde van preventie en vermindering van risico's. L. Lazzarini stelt dat de specificiteit van genetische informatie is ons te sturen tot het onderzoeken, in één enkele context, naar alle bedreigingen voor onze autonomie en ons privé-leven die zich de laatste 50 jaar opgestapeld hebben (Lazzarini, 2001).

Wij denken dat, hoewel genetica « objectief » niet verschilt van andere medische technieken, het onderscheid zich maakt in de sociale voorstelling ervan die onze epistemologische categorieën verandert. Verandering van het begrip risico zal ons verplichten systemen voor preventie en vergoeding te herdenken. De voorstelling van genetica is doordrongen met het idee dat we binnenkort zullen beschikken over simpele en goedkope tools die een zekere voorspelling zullen mogelijk maken van ziektes maar eventueel ook andere niet-pathologische eigenschappen (homoseksualiteit, wetenschappelijke nieuwsgierigheid, ...). De genetica wordt gezien als een voorspellingsmiddel van al onze toekomstige ziekten, een techniek om lichamen “transparant” te maken, met positieve aspecten verbonden aan deze “transparantie”, zoals uitroeiing van ziektes, en negatieve aspecten, zoals het gevoel dat onze toekomst volledig in onze genen geschreven staat. Deze voorstelling van genetica speelt een rol/zal een rol spelen in het aanvaarden van genetische diagnostische technieken door de maatschappij, maar zal ook onderliggend zijn aan elke eventuele wetgevende tussenkomst.

5- Genetische tests en beroepsrisico

Dit deel had voor doel het analyseren en begrijpen, in het sociaal recht, van de opbouw en het begrip van beroepsrisico in mechanismen van preventie van gezondheid op het werk (*ex ante* risico) en de beroepsziekten (*ex post* risico) evenals hun banden.

1°- Het beroepsrisico in het systeem van preventie van de gezondheid op het werk

De studie van de Belgische (wetten van 1899, A.R.A.B., wet van 1952, wet van 1996, wetboek over het welzijn, ...) en Europese (kaderrichtlijnen, ...) reglementering op gebied van preventie van de gezondheid op het werk, en van referentiewerken over het onderwerp hebben toegelaten het begrip risico en zijn evolutie te definiëren.

De voorstelling van het risico is niet meer gebaseerd op een technisch risicomodel met één enkele oorzaak, maar uit een geheel van risicofactoren die onderling afhankelijk en van verschillende aard zijn. Preventie van beroepsrisico wordt dus een multicausale en pluridisciplinaire benadering waarvan het onderwerp de “man op het werk” is.

De kwestie van invoegen van “genetisch risico” in de studie, analyse en preventie van beroepsziekten kadert in de problematiek van evenwicht tussen collectief en individueel risico.

Een studie van de respectievelijke competenties van alle preventiedeskundigen werd eerst uitgevoerd om de rol en verantwoordelijkheid van elk van deze beter te leren kennen. We vermelden kort dat de uiteindelijk verantwoordelijkheid van preventie van gezondheid op het werk bij de werkgever ligt. Deze heeft echter een voornamelijk symbolische rol sinds het aannemen van het stelsel van beroepsziekten. Men kan de rol van de preventieadviseur – arbeidsgeneesheer als volgt samenvatten: epidemiologisch onderzoek, preventie en monitoring van de gezondheid. Werknemers zelf werken ook mee aan de politiek van welzijn op het werk.

In het kader van monitoring van de gezondheid van werknemers (KB 28 mei 2003, *M. B.*, 16 juni 2003) verbiedt geen enkele bepaling expliciet het gebruik van genetische tests door een arbeidsgeneesheer, die trouwens, onder voorwaarde van het principe van proportionaliteit, over een zekere vrijheid beschikt in zijn keuze van uit te voeren onderzoeken.

De vraag die hierop volgde was te weten of, rekening houdende met de huidige economische en sociale context, een overwaarding van het individueel risico (het genetisch risico inbegrepen) in het kader van preventie niet van die aard is de principes van preventie en selectiepraktijken te veranderen.

Wat moet men bv. doen met geïndividualiseerde genetische informatie in het kader van een preventiemodel dat verondersteld is “voorrang te geven aan collectieve preventiemaatregelen t.o.v. individuele preventiemaatregelen” en “het werk aan te passen aan de persoon, en niet omgekeerd” (artikel 6 2 d) en h) van de Europese kaderrichtlijn en artikel 5 e) en f) van de wet van 4 augustus 1996 betreffende het welzijn)?

En hoe kan men, gezien de kosten die preventie met zich meebrengt, een verschuiving vermijden naar selectie- of uitsluitingspraktijken in plaats van collectieve preventiepraktijken zoals het verlagen van de blootstellingsdosis tot een drempelwaarde die aanvaardbaar is voor alle werknemers?

2°-Het beroepsrisico in het systeem van vergoeding van beroepsziekten

A. Het begrip beroepsrisico in het stelsel van beroepsziekten

De systematische analyse van wetgevingen (1927, 1963, 1970, 1990) en parlementaire werken betreffende beroepsziekten, en het lezen van vele artikels en diverse rechtsleer over dit onderwerp hebben toegelaten de evolutie van het begrip beroepsrisico aan te tonen zoals deze wordt beschouwd in het stelsel van beroepsziekten (extensie, normalisatie, evolutie van causaliteit, collectivisatie vs. socialisatie van het risico, ...).

Uit deze analyse hebben we de volgende waarnemingen gehaald:

- Het is het begrip beroepsrisico uit het stelsel van werkongevallen (het enige dat toen bestond) dat gebruikt werd als “model” voor het stelsel van beroepsziekten. Voor meerdere aspecten redeneert de wetgever op analoge wijze.
- Het systeem leidt tot een normalisatie van het risico. Preventie wordt dan een simpele kost die moet worden ingerekend in het beheer van het bedrijf. De waarden verbonden aan deze gezondheidspreventie op het werk worden van secundair belang.
- Het begrip risico wordt opgebouwd volgens de wetgevingen betreffende beroepsziekten volgens een collectief, vroeger en milieu-model.
- De uitbreiding van het begrip risico hangt fundamenteel af van de context en politieke en sociale keuzen
(uitbreiding van het stelsel, verhoging van het aantal gedekte ziektes) (Vogel, 1994).
- De causaliteit blijft een centraal probleem in het kader van het stelsel van vergoeding van beroepsziekten, terwijl de keuze van het model van beroepsrisico ze er volledig van zou moeten vrijmaken.

- De dissociatie preventie – vergoeding of het tekort aan coördinatie tussen deze twee luiken lijkt ons van die aard te zijn dat de werkgever zijn aansprakelijkheid kan ontvluchten in plaats van verplicht te waken over de gezondheid van zijn werknemers.

Het huidige Belgisch vergoedingssysteem voor beroepsziekten houdt geen rekening met risico's: de dekmantel van onwetendheid is een noodzakelijke voorwaarde voor het beginsel van gelijkheid en gerechtigheid van het vergoedingssysteem (Lois coordonnées du 3 juin 1970 relatives à la réparation des dommages résultant des maladies professionnelles; Rawls).

In het kader van het lijststelsel volstaat het inderdaad dat het slachtoffer blootgesteld werd aan het risico op een beroepsziekte – in de mate waarop deze blootstelling volgens de algemeen aanvaarde medische voorwaarden van die aard is de ziekte te veroorzaken – opdat deze van een vergoeding zou kunnen genieten. Bovendien wordt de beroepsziekte, vanaf er wordt aangetoond dat ze tenminste deels de oorzaak is van de werkonbekwaamheid, volledig beoordeeld en niet enkel voor het professionele deel. Dit principe, het principe van onverschilligheid van de voorgaande toestand, versterkt nog de dekmantel van onwetendheid met betrekking tot eventuele genetische aanleg (Demet et al., 1996).

B. Genetische tests en beroepsziekten

Zal het gebruik van genetische tests in het kader van beroepsziekten een invloed hebben op de beslissing aangaande de vergoeding van een ziekte? Deze vraag betreft de limiet van de dekmantel van onwetendheid t.o.v. genetische gegevens.

Aangezien het systeem blind is voor risico's en vergoeding mogelijk maakt zodra er beroepsblootstelling plaatsvindt, vormt genetische aanleg voor een beroepsziekte momenteel geen obstakel voor de vergoeding ervan, noch is het een oorzaak voor een vermindering van de vergoeding.

Wij vinden desondanks dat deze vraag verdient gedebatteerd te worden om verschillende redenen:

- Tijdens het bepalen van het beroepsgebonden karakter van een ziekte met het oog op het toevoegen ervan aan de lijst, wordt een factor van verband tussen de beroepsblootstelling en de ziekte geanalyseerd. Zijn genetische factoren niet geneigd deze link te “verstoren”, en te verhinderen dat bepaalde ziekten op de lijst van beroepsziekten terecht zouden komen?

Zoals A. Thébaud-Mony onderlijnt, bestaat er in het stelsel van beroepsziekten een onveranderlijke tegenstelling: « la loi dispense la victime de la charge de la preuve par l'application de la présomption d'origine mais l'expert chargé de l'appliquer est constamment à la recherche de critères « objectifs », techniques ou médicaux, apportant la preuve de la causalité entre le travail et la maladie» (Thébaud-Mony, 1991).

- Bovendien verschijnt het probleem van het verband opnieuw in het open systeem dat, in België, coëxisteert met het lijststelsel. In dit geval moet het slachtoffer bewijzen dat de aandoening waaraan hij lijdt zijn directe en determinerende oorzaak vindt in zijn professionele activiteit. Het uitvoeren van het beroep moet de ware, doorslaggevende en beslissende oorzaak van de ziekte zijn (Vandeweert, 2002). Is dit altijd het geval wanneer een individuele predispositiefactor zich tussenvoegt tussen ziekte en blootstelling?

- Tenslotte, is het een politieke en sociale keuze die het aannemen van zo'n systeem bepaald. Wij weten echter dat de werking van het stelsel van beroepsziekten o.a. verbeterd zou kunnen worden door de vermindering van het fenomeen van "niet-aangiften" en door een betere duidelijkheid. Deze transformaties zouden een belangrijke verhoging van de kosten met zich meebrengen. Het vooruitzicht van privatisering van bepaalde risico's en de contaminatie van het stelsel van solidariteit door redeneringen eigen aan privé-verzekeringen dreigen het principe van onwetendheid in gevaar te brengen (in de Verenigde Staten hangt het verzekeringssysteem grotendeels af van de werkgever, die geneigd is vele medische tests te laten uitvoeren).

Deze redenering verder zettend, zou men een systeem kunnen indenken dat gebaseerd is op individuele verantwoordelijkheid met betrekking tot zijn gezondheidstoestand. Sinds de ontdekking van de genetica is al vaak gesteld dat elke persoon verplicht is zijn "gezondheidstoestand te kennen" om deze te beheren als goede huisvader. Tot het uiterste gedreven zou deze redenering kunnen leiden tot een erkenning van de individuele verantwoordelijkheid van elke persoon om zijn werkomgeving te kiezen, rekening houdend met zijn gezondheidstoestand en bereid er de gevolgen van te dragen. Dit zou als gevolg hebben dat het stelsel van sociale zekerheid van beroepsziekten vervangen zou worden door een systeem van individuele verantwoordelijkheid in een vrij onderhandelende risicomarkt. Dit punt brengt ons op de vraag van de autonomie van de persoon op het werk.

3°- Genetische tests en de rol van autonomie in het systeem van preventie en bescherming van de gezondheid op het werk

Om het doel van preventie en bescherming van de gezondheid op het werk te bereiken, kan de wetgever opteren voor een interventionistisch model gebaseerd op imperatieve maatregelen of maatregelen van openbare orde die opgelegd worden aan alle partijen, of voor een model dat individuele onderhandeling mogelijk maakt (*Self Regulation*). Deze dubbele opvatting van gezondheid op het werk schemert door in de kwestie van toestemming van een werk met risico's.

Het antwoord van de syndicaten op de vraag van toestemming voor het uitvoeren van genetische tests is dubbelzinnig (Lebeer et al., 1997). Wat traditionele medische onderzoeken betreft, geven de syndicaten voorrang aan bescherming van de gezondheid. Ze zouden een beschermingssysteem van openbare orde aanvaarden dat hun zou opgelegd worden. Wat genetische tests betreft, zijn de meningen verdeeld: sommigen vinden dat individuele vrijheid ongemoeid moet blijven. Het ligt bij de werknemer te kiezen tussen zijn gezondheid en toegang tot werk. Voor anderen is deze vrijheid denkbeeldig omdat ze te vaak gediceerd wordt door economische nood ten koste van de gezondheid.

Wat de kwestie betreft van de vrije keuze te werken in een risicosector of de vrijheid te kiezen tussen zijn gezondheid en zijn werk, stellen sommigen, volgens het *Self Regulation* principe, dat de Staat niet moet tussenkomen en dat de keuze bij het individu ligt (Viscusi, 1984; Posner; Epstein, 1994).

Volgens deze auteurs moet de keuze te werken in een risico-omgeving vrij onderhandelbaar zijn in het kader van een markt die risico's en lonen in balans brengt, en gefundeerd op een goede verspreiding van informatie. Zo kan een evenwicht bekomen worden wanneer een

werknemer een risicopost aanvaardt tegen betaling van een zeker salaris. Dit is wat men de “risicopremie” noemt.

Daartegenover zijn andere auteurs van mening dat de vrijheid van werknemers slechts fictie is, en dat de Staat moet tussenkomen om een ware autonomie toe te laten. Zij stellen inderdaad vast dat in de werkelijkheid, een persoon die zich kandidaat stelt voor een job (evenals de werknemer) zich gezien de economische afhankelijkheid niet op gelijke voet met de werkgever bevindt. Hij is integendeel vaak gedwongen om soms nadelige voorwaarden te aanvaarden om zijn job te behouden (Nelkin & Brown, 1984).

Verscheidene argumenten uit onze studie blijken deze laatste hypothese te ondersteunen:

- In het besef van de ontoereikendheid van de burgerlijke ficties van vrijheid en gelijkheid, is het de basis van het sociaal recht om zich te manifesteren vanuit een interventionalistisch perspectief. Het sociaal recht is gebaseerd op de waarneming van een diepe ongelijkheid tussen werkgever en werknemer, en heeft als doel deze te verhelpen door de werknemer te beschermen (onegalitair recht in het voordeel van de werknemer). In deze context stelt zich de vraag van de waarde van toestemming en van de realiteit betreffende de vrijheid tot toestemming, aangewakkerd door de huidige neoliberale opvatting van het bedrijf en de dwang die de financiële markt, werkloosheid en algemene onzekerheid uitoefenen op loontrekkers (Coutrot, 1999). Het herdiscuteren van dit fundament wordt echter gevraagd door sommige auteurs, die een evolutie waarnemen van de responsabilisering van de sociaal verzekerde in een perspectief van een sociaal actieve Staat.

- De economische afhankelijkheid resulteert o.a. uit de huidige context van de arbeidsmarkt die de vrijheid van keuze denkbeeldig maakt. Zo tonen Nelkin en Brown aan dat buitenstaande omstandigheden zoals economische instabiliteit of werkgelegenheid, maken dat werken in één of ander risicosector verre van een vrije keuze is (Nelkin & Brown, 1984). Volgens E. Draper: « *Industrial workers are unable to choose alternative protection policies, and instead are given the dubious choice between their health and their jobs—a choice that is so heavily constrained by economic pressures that it is not a real choice at all* » (Draper, 1986; Basset-Stanford, 1981).

- Het is fout te denken dat informatie betreffende werkrisico's goed verspreid is, en dit om meerder redenen : deze informatie is niet altijd gekend, ze is vaak complex en moeilijk communiceerbaar, de werkgever heeft er niet vaak baat bij, ... (Draper, 1984; Nelkin & Brown, 1984; Draper, 1986)

- Tenslotte, is het systeem van vrij en geïnformeerde keuze van de werknemer gebaseerd op het idee dat deze in staat is om een rationele keuze te maken door een balans op te maken van uitlopende belangen zoals gezondheid, werk, de economische toekomst van het gezin, enz... , wat volgens ons betwistbaar is (Duraffourg, 1985).

- Zo stelt West dat het noodzakelijk kan zijn het machtsonevenwicht te corrigeren tussen werkgevers, die er vaak baat bij hebben een risicowerkomgeving te behouden, en werknemers die zelden andere keuzes hebben of de mogelijkheid om betere werkomstandigheden te eisen (West, 1985 ; Lemmens, 1997).

In navolging van deze auteurs denken wij dat de vraag moet zijn: hoe kunnen we de werkomstandigheden omvormen en verbeteren opdat werknemers niet meer zouden moeten kiezen tussen werk en gezondheid?

4°- Analyse van de wet van 28 januari 2003

De Belgische wetgever is onlangs tussengekomen om bepaalde genetische tests, nl. 'previsionele' genetische tests (met het oog op de toekomst), te verbieden in de werkcontext. De analyse van deze maatregelen heeft ons echter aangetoond dat de kwestie van het gebruik genetica op het werk daarom niet opgelost is.

Uit de diverse vragen die deze wetgeving oproept, citeren we er slechts één: het toepassingsgebied van deze wet, of nog het type genetische tests die door het verbod gevisieerd worden. Een analyse van de wet en de voorbereidende werken laat veronderstellen dat de gevisieerde tests zijn voor susceptibiliteit voor niet-beroepsziekten. Wij betreuren echter de dat de tekst dit niet duidelijker stelt, en indien deze definitie correct is, betreuren wij ook de beperkte draagwijdte van deze wet.

Ondanks dit alles voorziet de wet een uitzondering op dit verbod. Een genetische test op opsporing van HIV zou kunnen uitgevoerd worden door het goedkeuren van een koninklijk besluit overlegd in Ministerraad. Het zijn echter deze hypotheses die drager zullen zijn van het risico op discriminatie. Deze zouden moeten gedebatteerd worden in het parlement, omdat ze niet enkel de fundamentele rechten (recht op respect van het privé-leven, recht op fysieke integriteit) betreffen, maar ook omdat ze dreigen de volgorde van prioriteit van onze preventieprincipes, namelijk het aanpassen van het werk aan de mens en niet omgekeerd, te veranderen.

CONCLUSIE

Als conclusie kunnen we een paar synthesebeschouwingen opsommen die nuttig zouden kunnen zijn bij het goedkeuren van een juridisch kader voor regeling van genetische tests.

A- Geschiktheid, bescherming van de gezondheid van de werknemer en derden

Een eerste onderzoek kan uitgevoerd worden op grond van de drie rechtmatige finaliteiten uit artikel 8 van de Europese Conventie van mensenrechten betreffende het recht of respect van het privé-leven (bekwaamheid, bescherming van de gezondheid van de persoon, bescherming van de gezondheid van derden), die als verantwoording zouden kunnen dienen voor het uitvoeren van genetische tests en de principes van legaliteit et proportionaliteit (nuttigheid, noodzakelijkheid en proportionaliteit) (Convention de sauvegarde des droits de l'homme et des libertés fondamentales, 1950).

1/ Susceptibiliteitstests voor niet-beroepsgebonden ziekten

In het kader van de werkrelaties, vinden genetische susceptibiliteitstest voor niet-beroepsgebonden ziekten geen rechtvaardiging in het bepalen van de geschiktheid, aangezien de geteste persoon op dat ogenblik geen symptomen vertoont (**principe van nuttigheid**). Ze hebben ook niet als doel de bescherming van de gezondheid van de geteste persoon aangezien de ziekte niet gelinkt is met de werkomstandigheden. Deze persoon de functie weigeren zou geen positief effect hebben op de ontwikkeling van zijn gezondheidstoestand (**principe van nuttigheid**).

Het vaak geciteerde voorbeeld van de piloot drager van het gen voor de *Huntington* ziekte toont dat veiligheid van derden de voornaamste verantwoording blijft voor afwijkingen op het verbod op dit type tests. Als deze personen – hiermee bedoelen we alle werknemers in risicoposten en niet enkel werknemers die genetische geïdentificeerd werden – regelmatig onderworpen worden aan onderzoeken van monitoring van de gezondheid, lopen ze niet meer kans plots symptomen van de *Huntington* ziekte te vertonen dan andere eventuele gezondheidsproblemen (**principe van proportionaliteit**).

Om deze redenen denken we dat susceptibiliteitstests voor niet-beroepsgebonden ziekten verboden moeten worden zowel voor als na aanwerving.

2/ Tests voor susceptibiliteit voor beroepsziekten

Om dezelfde redenen kunnen noch geschiktheid, noch bescherming van derden aangegrepen worden als verantwoording voor het uitvoeren van tests voor genetische susceptibiliteit op beroepsziekten in het kader van de werkrelaties.

Daarentegen stelt zich de vraag of we een persoon kunnen blootstellen aan een substantie terwijl ze een hypersusceptibiliteit vertoont voor een beroepsziekte veroorzaakt door deze blootstelling? Kan preventie van de gezondheid van de werknemer ingeroepen worden om ofwel aanwerving te weigeren, ofwel een preventieve verwijdering uit te voeren? Kan men personen blootstellen waarvan men weet – of zal weten – dat ze een veel hoger risico vertonen dan het gemiddelde? Wat zouden hier de gevolgen van zijn? Moet men de werknemer inlichten? We worden hier geconfronteerd met de grenzen van dit analysekader.

3/ Tests voor genetische monitoring

Op dezelfde wijze laten monitoringtests toe om de vroegtijdige effecten van bepaalde mutagene substanties waar te nemen. Zulke effecten blijken precursors te zijn van het verschijnen van beroepsziekten. Een doel van preventie van de gezondheid rechtvaardigt ook hier het gebruik van deze tests. Toch blijven vragen identiek aan deze hierboven gesteld hangende.

B- Monitoring van de gezondheid op het werk

Laten we een arbeidsgeneesheer beschouwen die geconfronteerd wordt met een genetische susceptibiliteitstest voor een beroepsziekte enerzijds, en een vroegtijdige opsporing van genetische lesies als gevolg van een blootstelling aan mutagenen anderzijds.

In de twee gevallen zal hij in het bezit zijn van informatie betreffende het eventueel verschijnen van een beroepsziekte. De susceptibiliteitstest toont immers een verhoogd risico aan om zo'n ziekte te ontwikkelen na blootstelling aan een bepaalde toxische substantie.

Monitoringtests laten eveneens toe om de vroege effecten van bepaalde mutagenen aan te tonen die het ontstaan van beroepsziekten lijken aan te kondigen. Het essentiële verschil met susceptibiliteitstests voor beroepsziekten is dat in monitoringtests een pathologisch proces wordt geobserveerd, zelfs als het zich in een vroeg stadium bevindt, terwijl bij susceptibiliteitstest het slecht om een probabiliteit gaat.

Wij denken dat deze vragen binnen de arbeidsgeneeskunde zelf moeten beantwoord worden. Ze hebben betrekking tot de bevoegdheid en grenzen van de arbeidsgeneesheer in zijn rol van preventie en monitoring van de gezondheid. Ook het evenwicht tussen collectief en individueel risico evenals het gepaste interventiemoment moeten worden beschouwd.

Wanneer wordt de arbeidsgeneesheer verondersteld in te grijpen: vanaf de ontdekking van een susceptibiliteit, vanaf het verschijnen van de eerste vroegtijdige effecten, of moet men wachten tot het verschijnen van de eerste symptomen?

Welk type informatie moet een weigering van aanwerving of beslissing van verwijdering staven: is een susceptibiliteit op zich voldoende, of moet men wachten tot het opstarten van een onstopbaar proces?

Welke antwoorden kan een arbeidsgeneesheer geven bij zo'n ontdekking: aanpassing van de werkpost, verlaging van de blootstellingsdrempels, tijdelijke of definitieve verwijdering, mogelijkheden tot herklassering?

Is het technisch en economisch gezien mogelijk om de blootstellingsdrempels voor schadelijke stoffen te verlagen om mensen met genetische susceptibiliteit toe te laten te werken in omstandigheden geschikt voor hun gezondheid?

Th. Murray herinnert ons aan wat hier op het spel staat: « *The danger is that we blame the person and exonerate the environmental or workplace conditions that precipitated the disease. All disease depends on the interaction of organism and environment. Which of the two we focus on is a social and political choice with important ethical consequences* » (Murray, 1983).

De opbouw van ons systeem voor preventie van de gezondheid op het werk zal afhangen van het antwoord op deze vragen. Momenteel kan men het schematisch zo samenvatten: dit systeem is van openbare orde en onafhankelijk van de wil van de betrokken partijen. Het is gefundeerd op meerdere onderling verbonden risicofactoren. Het bevoorrecht collectieve

maatregelen t.o.v. individuele maatregelen en dringt aan op een vermindering van de blootstellingsdosissen tot het laagst mogelijke niveau.

In ons model, denken we dat het coherent zou zijn om alle susceptibiliteitstests voor aanwerving te verbieden, omdat ze eerder passen in een logica van selectie en niet van preventie.

Na aanwerving moeten susceptibiliteitstests volgens ons verboden blijven. Ze verschaffen enkel een probabilistische informatie, wat wil zeggen dat bepaalde mensen met een predispositie voor een bepaalde ziekte deze nooit zullen ontwikkelen. Zij riskeren dus onjuist verwijderd te worden van een job. Anderzijds kunnen ook mensen zonder genetische aanleg ervoor een ziekte ontwikkelen. Het toepassen van susceptibiliteitstests en het vermijden van mensen met genetisch aanleg voor een ziekte zouden ook toelaten de blootstellingsdosissen op een bepaalde grenswaarde te behouden, of in elk geval niet aansporen tot ze meer dan noodzakelijk is te verlagen. Het beleid om blootstellingsdosissen tot het laagst mogelijk niveau terug te brengen zou hierdoor ernstig aangetast zijn.

Wat monitoringtests betreft, denken we dat er een risico op tegenstrijdigheden bestaat met het principe van prioriteit van collectieve maatregelen t.o.v. individuele maatregelen indien deze tests enkel leiden tot de verwijdering van werknemers met een genetische aanleg voor een ziekte. Wij denken echter dat ze door de arbeidsgeneesheer gebruikt moeten kunnen worden in de mate waarin ze een correctere interpretatie van blootstellingsmetingen, een beter begrip van de pathologische mechanismen, en een efficiëntere preventie van de gezondheid op het werk toelaten. Er moet ook gezorgd worden de arbeidsgeneesheer de nodige competenties, middelen en autonomie te verschaffen om deze nieuwe technologieën te gebruiken ten dienste van gezondheidspreventie, en het gebruik van de preventie voor selectieve doeleinden te vermijden.

VALORISATIE

De bekomen resultaten in het kader van het juridisch luik van het project zijn het onderwerp geweest van verschillende valorisaties via publicaties en medewerkingen op conferenties en colloquia. Ontmoetingen met specialisten hebben een begrip toegelaten van bepaalde concepten, en een kritische aanpak van de resultaten.



Promotor: Dr. Ch. Laurent

Université de Liège
Laboratoire d'Oncologie, Radiobiologie
et Mutagenèse Expérimentale

Er is geen nederlands verslag van deze onderzoeksploeg beschikbaar.

Bijlagen

Bijlage I: Methoden

Test	Determination of the opioids in air samples					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
	X					
Developed by	KUL	UCL	UG	ULg	VUB	
	X					
Principle	During production and formulating activities, workers can be exposed to potent opioid narcotics through inhalation of opioid containing dusts or aerosols. The airborne concentration of the opioid compounds can be determined by personal or environmental air sampling. Airborne opioid are collected by drawing a known quantity of air through a 25 mm glass fiber filter mounted in an IOM sampler at a flow rate of 2L/min. The analytes are subsequently extracted from the filters and are analyzed using a highly specific and sensitive gas chromatographic mass spectrometric GC-MS method.					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> Air sampling remains a rapid and simple standard tool in the assessment of external occupational exposure. The results of the measurements can be compared with in-the-house established occupational exposure limits (OELs) for airborne concentrations.			<u>DISADVANTAGES</u> Attention should be drawn to the fact that air-sampling focuses on one possible route of exposure, namely through inhalation. When the possibility exists of opioid absorption through the skin, following dermal contact, biomonitoring should be evaluated as a complementary technique.		
Importance	A rapid and reliable quantitative assessment of external occupational exposure to potent opioid analgesics, in which airborne concentrations can be compared with established OELs.					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionizing Radiation	Opioid Analgesics	
	<u>In vitro</u> human lymphocytes					
	<u>In vivo</u> rat lymphocytes rat pneumocytes					
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes					
	<u>External monitoring</u> workers breathing air				X	
	<u>Patients</u>					

Bijlage I: Methoden

Test	Urinary mandelic acid					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
		X				
Developed by	KUL X	UCL	UG	ULg	VUB	
Principle	Mandelic acid is one of the major urinary excretion products after styrene absorption. The activation and deactivation of Styrene occurs mainly through the intermediate formation of styrene oxide and further styrene glycol. Mandelic acid is related to styrene glycol. As a consequence mandelic acid is the preferred metabolite to be sampled for biomonitoring purposes. Mandelic acid in the urine is detected through High-pressure liquid chromatography (RSD: < 10%). The detection limit is 50 mg/l					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> <ul style="list-style-type: none"> • Mandelic acid is a metabolite derived from styrene oxide (the reactive metabolite of styrene) • It takes into account absorption by all routes • Mandelic acid refers to recent exposure • Availability: simple urine sample collection • Automatisated • Cheap method 			<u>DISADVANTAGES</u> <ul style="list-style-type: none"> • Possible interference (smoking) 		
Importance	The level of mandelic acid in the urine provides a measure for the internal dose after styrene exposure. Mandelic acid is easy to analyse through HPLC. Mandelic acid is an metabolite of styrene oxide. Styrene oxide is the reactive metabolite of styrene which is possibly responsible for the carcinogenic effects of styrene. Intensive research executed by the KUL has shown that urinary mandelic acid is better biomarker than other metabolites as e.g. phenylglyoxylic acid. As a consequence urinary mandelic acid is the recommended biomarker for the evaluation of internal dose of styrene exposure.					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics	
	<i>In vitro</i>					
	<i>In vivo</i>					
	<u>Biomonitoring urine</u>		X			
	<u>Patients</u>					

Bijlage I: Methoden

Test	Adducts (DNA and Haemoglobin)s					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
		Biological effective dose				
Developed by	KUL	UCL	UG	ULg	VUB	
	X					
Principle	<p>Adducts are covalent bounds between genotoxic agents and nucleophilic molecules, e.g. DNA (target site adduct) and Haemoglobin, Albumin (nontarget site adduct). The formation of stable carcinogen-DNA adducts are considered critical events in the initiation of the carcinogenic process. DNA adducts correlate with tumor incidence. Haemoglobin and Albumin adducts are used as surrogates for DNA adducts when they correlate quantitatively with target site adducts (DNA adducts). Adducts determination occurs through GC-MS analysis or other techniques (³²P-postlabeling, HPLC,...) depending on the agent and the type of adduct.</p>					
Choice	<p><u>ADVANTAGES</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • DNA is a target molecule in carcinogenesis • It takes into account absorption by all routes • It integrates exposure from all sources • Adducts show individual exposure, metabolic capacity, and DNA repair capacity. • Adduct forming chemicals, e.g. many anticancer agents, are potentially dangerous. • Adducts can show active ingredients in complex mixtures • Data obtained may be directly related to adverse effects • Haemoglobin adducts refer to the exposure of the previous 4 months • DNA adducts refer to recent exposure • Haemoglobin and DNA of lymphocytes are easily available through venous bloodpunction 			<p><u>DISADVANTAGES</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • DNA adducts are subjected to repair • labour intensive • Possible interference • Existence of background adduct levels 		
Importance	<p>Assays for the level of carcinogen-adducts provide a measure of the biologically effective dose for certain carcinogens. Human adduct formation is a promising biomarker for molecular cancer epidemiology. Satisfactory analytical techniques now exist for the measurement of many DNA and protein adducts caused by human exposure to genotoxic agents. These will likely lead to improved risk assessment for groups of exposed individuals and may indicate opportunities for chemoprevention.</p>					

Bijlage I: Methoden

Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics
	<i>In vitro</i> human haemoglobin rat haemoglobin mouse haemoglobin		X X X		
	<i>In vivo</i> rat haemoglobin mouse haemoglobin		X X		
	<u>Biomonitoring</u> human haemoglobin		X		
	<u>Patients</u>				

Bijlage I: Methoden

Test	CYP2E1 genotyping					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
Developed by	KUL	UCL X	UG	ULg	VUB X	
Principle	Detection by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the 3 most frequent allelic variants of CYP2E1 (CYP2E1*1B or A1/A2, CYP2E1*5A or c1/c2, CYP2E1*6 or D/C) on a PCR amplification product obtained from a blood sample.					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> Simple Does not necessitate expensive equipment			<u>DISADVANTAGES</u> Time consuming		
Importance	Detection of variant genotypes with possibly increased or decreased metabolic activity					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics	
	<i>In vitro</i> human lymphocytes		X			
	<i>In vivo</i> rat lymphocytes rat pneumocytes					
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes		X			
	<u>Patients</u>		X			

Bijlage I: Methoden

Test	HLADR Glu ⁶⁹ genotyping					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
					X	
Developed by	KUL	UCL	UG	ULg	VUB	
		X				
Principle	Detection of the presence of glutamic acid on position 69 of the β chain of the DP β 1 molecule (GAG sequence of codon 69 of exon 2 of the <i>DPB1</i> gene (reverse-sequence specific oligonucleotide (SSO) probe line-blot method).					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> Simple and accurate			<u>DISADVANTAGES</u> Expensive		
Importance	Detection of variant genotypes with possibly increased or decreased metabolic activity					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics	
	<u>In vitro</u> human lymphocytes					
	<u>In vivo</u> rat lymphocytes rat pneumocytes					
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes	X				
	<u>Patients</u>					

Bijlage I: Methoden

Test	GST genotyping					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
					X	
Developed by	KUL	UCL X	UG	ULg	VUB	
Principle	Detection by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the allelic variants of glutathione S-transferases isoforms (GSTT1, GSTM1 and GSTP) on a PCR amplification product obtained from a blood sample.					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> Simple Does not necessitate expensive equipment			<u>DISADVANTAGES</u> Time consuming		
Importance	Detection of variant genotypes with possibly increased or decreased metabolic activity					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics	
	<i>In vitro</i> human lymphocytes		X			
	<i>In vivo</i> rat lymphocytes rat pneumocytes					
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes		X			
	<u>Patients</u>		X			

Bijlage I: Methoden

Test	Epoxide hydrolase genotyping					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
					X	
Developed by	KUL	UCL X	UG	ULg	VUB	
Principle	Detection by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the allelic variants of microsomal epoxide hydrolase (at residues 113 and 139) on a PCR amplification product obtained from a blood sample.					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> Simple Does not necessitate expensive equipment			<u>DISADVANTAGES</u> Time consuming		
Importance	Detection of variant genotypes with possibly increased or decreased metabolic activity					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics	
	<i>In vitro</i> human lymphocytes		X			
	<i>In vivo</i> rat lymphocytes rat pneumocytes					
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes		X			
	<u>Patients</u>		X			

Bijlage I: Methoden

Test	OGG1 genotyping					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
Developed by	KUL	UCL	UG	ULg	VUB	
Principle	Detection by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the most frequent allelic variants of OGG1 (Ser/Cys) on a PCR amplification product obtained from a blood sample.					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> Simple Does not necessitate expensive equipment			<u>DISADVANTAGES</u> Time consuming		
Importance	Detection of variant genotypes with possibly increased or decreased metabolic activity					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics	
	<i>In vitro</i> human lymphocytes					
	<i>In vivo</i> rat lymphocytes rat pneumocytes					
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes	X	X	X		
	<u>Patients</u>					

Bijlage I: Methoden

Test	XRCC1/3 genotyping					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
					X	
Developed by	KUL	UCL	UG	ULg	VUB	
					X	
Principle	Detection by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the most frequent allelic variants of XRCC1 (codon 194 , Arg/Trp ; codon 399, Gln/Arg; codon 280, Arg/His) and XRCC3 (codon 241, Thr/Met) on a PCR amplification product obtained from a blood sample.					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> Simple Does not necessitate expensive equipment			<u>DISADVANTAGES</u> Time consuming		
Importance	Detection of variant genotypes with possibly increased or decreased metabolic activity					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics	
	<i>In vitro</i> human lymphocytes					
	<i>In vivo</i> rat lymphocytes rat pneumocytes					
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes	X	X	X		
	<u>Patients</u>					

Bijlage I: Methoden

Test	COMET assay					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
			X			X
Developed by	KUL	UCL	UG	ULg	VUB	
					X	
Principle	Single cell gel (SCG) electrophoresis or 'Comet assay' is a rapid and very sensitive fluorescent microscopic method to examine DNA damage and repair at individual cell level. This technique is used for detecting various forms of DNA damage (<i>e.g.</i> , single- and double-strand breaks, oxidative DNA base damage, and DNA-DNA/DNA-protein/DNA-Drug crosslinking) and DNA repair in virtually any eukaryotic cell.					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> cell/cell approach, applicable on many cell types, no obligation in vitro cultivation step required, possible estimation of DNA repair capacity after in vitro challenging, low cost, fast, simple, gives some indication of cell death			<u>DISADVANTAGES</u> detected DNA damage \neq fixed mutations, low specificity, need for internal standard to minimise experimental variation, controversial confounding factors (age, smoking,...)		
Importance	Detection of recent DNA damage (alkali labile sites) and is applicable on many cell types This assay has critically important applications in fields of toxicology ranging from aging and clinical investigations to genetic toxicology and molecular epidemiology.					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics	
	<u>In vitro</u> human lymphocytes	X	X	X		
	<u>In vivo</u> rat lymphocytes rat pneumocytes	X X				
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes	X	X	X		
	<u>Patients</u>					

Bijlage I: Methoden

Test	Sister Chromatid exchange Assay					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
Developed by	KUL	UCL	UG	X ULg	VUB	
Principle	The Sister Chromatid Exchange assay is sensitive but not specific method to examine the effects induced at a cytological level by chemical DNA lesions (that were not repaired during the G0/G1 phase) and that persist up to the S-phase. This assay is used to screen molecular DNA damages such as DNA-adducts, alkylation or methylation of DNA bases. Under some instances, it may also give some indications of DNA repair sensitivity: cells of patients with DNA repair defects (Xeroderma Pigmentosum) show a larger induced SCE frequency than “normal” individuals.					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> Theoretically applicable on any cells able to divide twice (2 S-phases) in culture; this assay is mainly used in human lymphocytes and cell lines. Every cell display a SCEs number, therefore, the mean value expressed is based on many observations. Also, this methodology requires BrdU and gives to possibility to check cytotoxicity by scoring the proliferation rate index. Low cost. Biomarker of exposure or early biological effects. Gives insights in potentially damaged subpopulation of cells.			<u>DISADVANTAGES</u> Low specificity, time consuming, controversial confounding factors (age, smoking,...) but that may be under control. Absence of cancer risk predictivity.		
Importance	Detection of non repaired DNA damages applicable on many cell types This assay has applications in fields of toxicology, genetic toxicology and molecular epidemiology.					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics	
	<i>In vitro</i> human lymphocytes		X			
	<i>In vivo</i> rat lymphocytes rat pneumocytes					
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes		X			
	<u>Patients</u>					

Bijlage I: Methoden

Test	P53 hotspots					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
					X	
Developed by	KUL	UCL	UG	ULg	VUB	
		X			X	
Principle	Restriction site mutation (RSM) assay based on the PCR amplification of a fragment of a selected gene mutated on a specific restriction site.					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> Specific, very sensitive, rapid Detects gene mutations and therefore complements other genotoxicity assays (CA, MN, comet, ...)			<u>DISADVANTAGES</u> Cannot detect unsuspected mutations		
Importance	Detection of variant genotypes with possibly increased or decreased metabolic activity					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics	
	<i>In vitro</i> human lymphocytes	X				
	<i>In vivo</i> rat lymphocytes rat pneumocytes					
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes	X	X			
	<u>Patients</u>					

Bijlage I: Methoden

Test	Conventional Chromosome Aberration Assay					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
				X		
Developed by	KUL	UCL	UG	ULg	VUB	
Principle	Methods allowing the early detection or evaluation of induced genetic damages in human contributive for identifying heavily (or more susceptible?) exposed subjects to ionising radiations. These biological tests allow a biological retrospective dosimetry after exposure to IR. Up to recently, the frequency of chromosomal aberrations (dicentric chromosomes) was used to detect or quantify radiation-induced effects. <i>In vitro</i> cultured lymphocytes are “harvested “ at the first metaphase and the structural and/or numerical chromosome aberrations are scored during microscopic evaluation.					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> When used in human lymphocytes it gives a clear indication of chromosomal rearrangements. Biomarker of exposure and early biological effects. Low cost, high specificity. Indicator of cancer risk predictivity when used in biomonitoring studies included in molecular epidemiological studies. Indicator of mutagenic/ clastogenic properties when used in screening chemicals. Gives indication of both stable or unstable aberrations types.			<u>DISADVANTAGES</u> Time consuming, controversial confounding factors in biomonitoring studies (age, smoking,...). Requires very experienced scorer and a large number of cells to be scored.		
Importance	Detection of non repaired DNA damages applicable on many cell types This assay has applications in fields of toxicology, genetic toxicology, and molecular epidemiology.					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics	
	<u>In vitro</u> human lymphocytes			X		
	<u>In vivo</u> rat lymphocytes rat pneumocytes					
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes			X		
	<u>Patients</u>					

Bijlage I: Methoden

Test	FISH Chromosome Aberration Assay					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
Developed by	KUL	UCL	UG	X ULg	VUB	
Principle	Methods allowing the early detection or evaluation of induced genetic damages in human contributive for identifying heavily (or more susceptible?) exposed subjects to ionising radiations. The fluorescent <i>in situ</i> hybridisation (FISH) technique using DNA chromosome-specific DNA probes has increased the sensitivity of the technique and eased the detection limit of stable chromosome aberrations (especially translocations) in human. FISH analysis of the chromosome aberrations is generally performed with a cocktail of chromosome-specific probes for different sets of chromosomes (e.g. WCP 2 spectrum green, WCP 2 spectrum orange, WCP 4 spectrum green, and WCP 8 spectrum orange). These biological tests – need some more extensive data - to allow a precise biological retrospective dosimetry after exposure to IR.					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> When used in human lymphocytes it allows a clear indication of one of the peculiar stable chromosomal rearrangements such as translocations; such translocations are known to be important in carcinogenic processes. Biomarker of exposure and early biological effects. Required less experienced cytogeneticist than conventional technique, automation possible. High sensitivity. Indicator of cancer risk predictivity when used in biomonitoring.			<u>DISADVANTAGES</u> Time consuming, controversial confounding factors in biomonitoring studies (age, smoking,...). Requires experienced scorer and a very large number of cells to be scored. Very high cost. Additional data needed to assess if the fraction of the genome analysed (generally $\pm 20\%$ of the genome is considered by using 3 different chromosome sets -ch 2, 4 and 8 for example) is representative of the entire genome. Use a prerequisite that every chromosome is randomly involved in translocation; such clear assessment is still under consideration.		
Importance	Detection of non repaired DNA damages applicable on many cell types This assay has applications in fields of toxicology, genetic toxicology and molecular epidemiology.					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics	
	<i>In vitro</i> human lymphocytes			X		
	<i>In vivo</i> rat lymphocytes rat pneumocytes					
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes			X		
	<u>Patients</u>					

Annex I: Methods

Test	Micronucleus assay					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
					X	
Developed by	KUL	UCL	UG	ULg	VUB	
			X		X	
Principle	A micronucleus (MN) is formed during the metaphase/anaphase transition of mitosis (cell division). It may arise from a whole lagging chromosome (aneugenic event leading to chromosome loss) or an acentric chromosome fragment detaching from a chromosome after breakage (clastogenic event) which do not integrate in the daughter nuclei.					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> <ul style="list-style-type: none"> • Cell/cell approach • Simultaneous detection of chromosome + genome mutations • Discrimination between clastogen/ aneugen • Possible co-detection of apoptosis/necrosis • Applicable on many cell types • Rapidity • Cheap • Simplicity • Potential for automation • Statistical power • Discrimination between cells which underwent nuclear division and cells which did not • Enables detection of dicentric bridges as nucleoplasmic bridges • Assessment of cell proliferation (% binucleated cells) 			<u>DISADVANTAGES</u> <ul style="list-style-type: none"> • Does not detect all structural chromosome aberrations (only acentric fragments) • Requires cell division for expression of MN • Possible interference of cyto-B with test chemical; like spindle poisons • Possible interference with other inhibitors of cytokinesis • Cytotoxicity of cytochalasin B itself varies between cell types and sometimes even between subtypes of the same cell type 		

Annex I: Methods

Importance	<p>The micronucleus test detects chromosome and genome mutations</p> <p>Scoring of micronuclei can be performed relatively easily and on different cell types relevant for human biomonitoring: lymphocytes, fibroblasts and exfoliated epithelial cells, with/without extra in vitro cultivation step. MN observed in exfoliated cells are not induced when the cells are at the epithelial surface, but when they are in the basal layer.</p> <p>The combination of the micronucleus assay with fluorescence in situ hybridisation (FISH) with a probe labelling the (peri-)centromeric region of the chromosomes (FISH assay) allows discrimination between micronuclei containing a whole chromosome (centromere positive micronucleus) and an acentric chromosome fragment (centromere negative micronucleus).</p>					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics	
	<i>In vitro</i> human lymphocytes	X		X		
	<i>In vivo</i> rat lymphocytes rat pneumocytes	X X				
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes	X	X	X		
	<u>Patients</u>					

Annex I: Methods

Test	Gene expression analysis with real-time RT-PCR					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
Developed by	KUL	UCL	UG	ULg	VUB	
Principle	<p>The RNA is extracted from in vitro irradiated IL-2 cell cultures, followed by a DNase treatment to remove contaminants. This treated RNA is converted in cDNA ,that is used as a template in the RT-PCR.</p> <p>This technology combines the DNA amplification with the detection of the products. The detection method is based on changes in fluorescence proportional to the increase in product.</p>					
Choice	<p><u>ADVANTAGES</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Less time consuming than gel based analysis • No need of post-PCR manipulations • Reduces contamination opportunities • Good accuracy • Very sensitive method • High-throughput capacity • Applicable on many cell types • Rapidity • Simultaneous measurement of gene expression in many different samples • High degree of potential automation • Statistical power 			<p><u>DISADVANTAGES</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • This technique requires good quality RNA • Use of different housekeeping genes to normalize the gene expression data • More expensive than classical PCR 		
Importance	<p>Several literature data have shown that a high percentage of breast cancer patients is radiosensitive. As this radiosensitivity may be linked with the expression pattern of genes involved in the processing of DNA damage (DNA repair, cell-cycle checkpoint and stress genes) it would be interesting to investigate differential gene expression. By using the RT-PCR technology it is easy to analyse the gene expression pattern of these specific genes in radiosensitive individuals and compare it with the expression pattern of the non sensitive ones.</p>					

Annex I: Methods

Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics
	<u>In vitro</u> human lymphocytes			X	
	<u>In vivo</u> rat lymphocytes rat pneumocytes				
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes			X	
	<u>Patients</u>			X	

Annex I: Methods

Test	CYP2E1 phenotyping					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
						X
Developed by	KUL	UCL X	UG	ULg	VUB	
Principle	Real-time quantification of mRNA by RT-PCR in human peripheral mononucleated cells isolated from blood.					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> Specific Very sensitive Rapid			<u>DISADVANTAGES</u> Necessitate expensive equipment and reagents Does not measure the protein or the enzyme activity		
Importance	Detection of variant genotypes with possibly increased or decreased metabolic activity					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics	
	<i>In vitro</i> human lymphocytes					
	<i>In vivo</i> rat lymphocytes					
	rat pneumocytes					
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes		X			
	<u>Patients</u>					

Annex I: Methods

Test	Determination of the opioids and their metabolites in urine					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
		X				X
Developed by	KUL X	UCL	UG	ULg	VUB	
Principle	The main metabolic pathway of the opioid analgesics is the oxidative N-dealkylation at the piperidine nitrogen, resulting in the formation of nor-metabolites. Only a few percent of the opioids are excreted unchanged in urine. The opioids and their nor-metabolites are extracted from urine using a simple, one step solid phase extraction procedure (SPE). The analytes are subsequently analyzed using a highly specific and sensitive gas chromatographic mass spectrometric GC-MS method.					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> In the assessment of occupational exposure to opioid analgesics, one of the major advantages of biological monitoring is the fact that it takes into account absorption by other routes of exposure than the lungs. In view of the highly lipophilic nature of especially sufentanil and fentanyl and to a less extent of alfentanil, absorption through the skin could present an important concomitant route of exposure. Selecting the appropriate biomarker of exposure could potentially provide additional information on the individual susceptibility of exposed workers.			<u>DISADVANTAGES</u> Especially in a production environment, precautions should be taken to avoid external contamination of the urine samples with the opioid compounds. The use of the nor-metabolites as biomarkers could theoretically circumvent the risk of external contamination but in some production processes these compounds are also present as neat reagents in the working environment. In view of compliance measurements, a quantitative acceptable biological exposure index (BEI) is not yet determined.		
Importance	A rapid and reliable quantitative assessment of occupational exposure to potent opioid analgesics which takes into account absorption by various routes.					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionizing Radiation	Opioid Analgesics	
	<u>In vitro</u> human lymphocytes					
	<u>In vivo</u> rat lymphocytes rat pneumocytes					
	<u>Biomonitoring</u> human urine				X	
	<u>Patients</u>				X	

Annex I: Methods

Test	G2 assay					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
				X		X
Developed by	KUL	UCL	UG	ULg	VUB	
			X			
Principle	In the G2 assay the cells are in vitro irradiated in the G2 phase of the cell cycle and chromatid breaks are scored in the subsequent metaphases. The short post-irradiation time of 90 min assures you that the metaphases analysed were in G2 phase of the cell cycle when irradiated. Per sample chromatid breaks are scored in 50 metaphases. Although the exact mechanism involved in the formation of G2 chromatid breaks is not completely elucidated yet, processes such as DNA dsb repair and cell cycle control are involved.					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> <ul style="list-style-type: none"> • Cell/cell approach • Low background frequencies; low background variability • No age effect on the background and radiation induced chromatid break frequency • Very short post irradiation time (90 min): no interference with radiation induced apoptotic cells • The assay is performed at a low irradiation dose (0.4 Gy) • Applicable on many cell types: lymphocytes, fibroblasts, lymphoblastoid cell lines • Rapidity • Cheap • Simplicity • Automated selection of metaphases is possible; also potential for automated detection of the chromatid breaks • Discrimination between cells which went into mitosis and cells which did not • Assessment of cell proliferation: mitotic index 			<u>DISADVANTAGES</u> <ul style="list-style-type: none"> • Does not detect all structural chromosome aberrations (only chromatid breaks are scored) • Requires stimulation of resting cells; chromatid breaks are scored in metaphases • At the moment the exact mechanism of chromatid break formation is not completely known 		
Importance	The G2 chromosomal radiosensitivity assay is a cell-cycle based technique which has been used by several groups investigating links between human chromosomal radiosensitivity and increased cancer susceptibility. Although requiring stringent experimental conditions to achieve good reproducibility the G2 assay has potential as a sensitive marker for cancer susceptibility and is particular useful in population studies.					

Annex I: Methods

Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics	
	<i>In vitro</i> human lymphocytes			X		
	<i>In vivo</i> rat lymphocytes rat pneumocytes					
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes			X		
	<u>Patients</u>			X		

Annex I: Methods

Test	DNA Strand Break Repair Phenotype Assay					
Biomarker of	External exposure	Internal exposure	Early effects	Genetic effects	Susceptibility: genotype	Susceptibility: phenotype
			X			X
Developed by	KUL	UCL	UG	ULg	VUB	
					X	
Principle	In vitro repair phenotype based on the Single cell gel (SCG) electrophoresis or Comet assay. The in vitro repair capacity is assessed after in vitro exposure to the challenging mutagen. It is possible to detect with one test, three parameters: initial DNA damage at the base level, DNA vulnerability after in vitro exposure and repair capacity.					
Choice	<u>ADVANTAGES</u> Offers the possibility to estimate whole repair phenotype as a result of the complex interaction of different repair enzymes. Cell/cell approach, applicable on many cell types, low cost, fast, simple, gives some indication of cell death			<u>DISADVANTAGES</u> Not a direct measure of DNA repair but rather a measure of the percentage of unrepaired damage to DNA. The cell types used are not necessarily same as the target organ. For population monitoring, possibility of selection bias. Small sample sizes may affect the power of the tests.		
Importance	Detection of recent DNA damage (alkali labile sites) and is applicable on many cell types. Determination of inter-individual differences in DNA repair capacity. This assay has critically important applications in fields of toxicology ranging from aging and clinical investigations to genetic toxicology and molecular epidemiology.					
Applied in		Cobalt	Styrene	Ionising Radiation	Opioid Analgesics	
	<u>In vitro</u> human lymphocytes	X	X	X		
	<u>In vivo</u> rat lymphocyte rat pneumocytes					
	<u>Biomonitoring</u> human lymphocytes		X	X		
	<u>Patients</u>					

VUB

Publicaties:

M. DE BOECK, S. LARDAU, J.P. BUCHET, M. KIRSCH-VOLDERS, D. LISON. Absence of significant genotoxicity in lymphocytes and urine from workers exposed to moderate levels of cobalt-containing dust: a cross-sectional study. *Env. Mol. Mutagenesis*, 36(2):151-160, 2000

M. KIRSCH-VOLDERS, M. AARDEMA, A. ELHAJOUJI. Concepts of threshold in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research* 464:3-11, 2000

N. TOUIL, A. ELHAJOUJI, H. THIERENS, M. KIRSCH-VOLDERS. Analysis of chromosome loss and chromosome segregation in cytokinesis-blocked human lymphocytes: non-disjunction is the prevalent mistake in chromosome segregation produced by low dose exposure to ionizing radiation. *Mutagenesis* 15(1): 1-8, 2000

G. SPEIT, H. AUTRUP, R. CREBELLI, L. HENDERSON, M. KIRSCH-VOLDERS, S. MADLE, J.M. PARRY, A.M. SARRIF, H. VRIJHOF. Thresholds in genetic toxicology - concluding remarks. *Mutation Research* 464:149-153, 2000

M. KIRSCH-VOLDERS, T. SOFUNI, M. AARDEMA, S. ALBERTINI, D. EASTMOND, M. FENECH, M. ISHIDATE Jr., E. LORGE, H. NORPPA, J. SURRALES, W. VON DER HUDE, A. WAKATA. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Env. Mol. Mutagenesis* 35:167-172, 2000

M. DE BOECK, N. TOUIL, G. DE VISSCHER, P. AKA VANDE and M. KIRSCH-VOLDERS. Validation and Implementation of an internal standard in Comet assay analysis.. *Mutation Research* 469:181-197, 2000

M. KIRSCH-VOLDERS and M. FENECH. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis-block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*, 16(1):51-58, 2002

S. BONASSI, M. FENECH, C. LANDO, Y.P. LIN, M. CEPPI, W.P. CHANG, N. HOLLAND, M. KIRSCH-VOLDERS, E. ZEIGER, R. BARALE, M.P. BIGATTI, C. BOLOGNESI, C. JIA, M. DI GIORGIO, L.R. FERGUSON, A. FUCIC, O. GARCIA LIMA, P. HRELIA, A.P. KRISHNAJA, T.K. LEE, L. MIGLIORE, L. MIKHALEVICH, E. MIRKOVA, P. MOLESSO, W.U. MULLER, Y. ODAGIRI, M.R. SCARFI, E. SZABOVA, I. VOROBTSOVA, A. VRAL and A. ZIJNO. The Human MicroNucleus project. International Data Base comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes. I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronulcei. *Environ. Mol. Mutagen*, 27:31-45, 2001.

M.J. AARDEMA and M. KIRSCH-VOLDERS The *in vitro* micronucleus assay.. in : *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*. 8:161-184, 2001 by M. Dekker, inc. New York-Basel (ed. Wai Nang Choy).

Bijlage II: Lijst van Publicaties

D. LISON, M. DE BOECK, V. VEROUGSTRAETE and M. KIRSCH-VOLDERS. Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occupational and Environmental Medicine*, 58:619-625, 2001.

M. KIRSCH-VOLDERS, M. DE BOECK et D. LISON. Génotoxicité et activité professionnelle. *Encyclopédie Médico-chirurgicale*, Paris, 16-537C-10 and 16-537C-11, 2001.

N. TOUIL, P. VANDE AKA, J.P. BUCHET, H. THIERENS and M. KIRSCH-VOLDERS. Assessment of genotoxic effects related to chronic low level exposure to ionising radiation using biomarkers for DNA damage and repair. *Mutagenesis*, 17(3):223-232, 2002.

M. KIRSCH-VOLDERS, A. VANHAUWAERT, M. DE BOECK and I. DECORDIER. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research* 9334:1-12, 2002.

M. FENECH, S. BONASSI, J. TURNER, C. LANDO, M. CEPPI, W.P. CHANG, N. HOLLAND, M. KIRSCH-VOLDERS, E. ZEIGER, M.P. BIGATTI, C. BOLOGNESI, C. JIA, G. DE LUCA, M. DI GIORGIO, L.R. FERGUSON, A. FUCIC, O. GARCIA LIMA, V.V. HADJIDEKOVA, P. HRELIA, A. JAWORSKA, G. JOKSIC, A.P. KRISHNAJA, T.K. LEE, J. SURALLES, A. MARTELLI, M.J. MCKAY, L. MIGLIORI, E. MIRKOVA, W.U. MULLER, Y. ODAGIRI, T.T. ORSIERE, M.R. SCARFI, M.J. SILVA, T. SOFUNI, E. SZABOVA, G. TRENATA, I. VOROBTSOVA, A. VRAL and, A. ZIJNO. HUMN Project: Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutation Research* 534(1-2): 45-64, 2003

FENECH M, CHANG WP, KIRSCH-VOLDERS M, HOLLAND N, BONASSI S, ZEIGER E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 534(1-2): 65-75, 2003

S. BONASSI, M. NERI, C. LANDO, M. CEPPI, Y. LIN, W.P. CHANG, N. HOLLAND, M. KIRSCH-VOLDERS, E. ZEIGER, M. FENECH and the HUMN COLLABORATIVE GROUP. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes : results from the Human MicroNucleus Project. *Mutation Research*, *Mutation Research* 543(2): 155-66, 2003

DE BOECK M., LOMBAERT N., DE BACKER S., FINSY R. , LISON D., KIRSCH-VOLDERS M. In vitro genotoxic effects of different combinations of cobalt and metallic carbide particles. *Mutagenesis* 18(2): 177-86, 2003

KIRSCH-VOLDERS, M., VANHAUWAERT, A., EICHENLAUB-RITTER, U. AND DECORDIER, I. Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicology Letters*, 140-141: 63-74, 2003

Bijlage II: Lijst van Publicaties

DE BOECK M, HOET P, LOMBAERT N, NEMERY B, KIRSCH-VOLDERS M, LISON D. In vivo genotoxicity of hard metal dust: induction of micronuclei in rat type II epithelial lung cells. *Carcinogenesis*. 24(11): 1793-800, 2003

KIRSCH-VOLDERS M., LISON D. Re: Hengstler, J.G., Bolm-Auorff, U., Faldum, A., Janssen, K., Reifenrath, M., Gotte, W., Jung, D., Mayer-Popken, O., Fuchs, J., Gebhard, S., Bienfait, H.G., Schlink, K., Dietrich, C., Faust, D., Epe, B. and Oesch, F. Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis*, 2003, 24, 63-73. *Carcinogenesis*. 2003 Nov; 24(11): 1853-4, 2003

KIRSCH-VOLDERS M, SOFUNI T, AARDEMA M, ALBERTINI S, EASTMOND D, FENECH M, ISHIDATE M JR, KIRCHNER S, LORGE E, MORITA T, NORPPA H, SURRALLES J, VANHAUWAERT A, WAKATA A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research* 540(2): 153-63, 2003

DE BOECK M, KIRSCH-VOLDERS M, LISON D. Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. *Mutation Research* 533(1-2): 135-52, 2003

LOMBAERT N., DE BOECK M., DECORDIER I., CUNDARI E., LISON D., KIRSCH-VOLDERS K. Apoptosis induced in vitro by hard metal dust (WC-Co), tungsten carbide and metallic cobalt in human peripheral mononucleated cells. *Toxicology and Applied pharmacology*, submitted

DECORDIER I., AKA P., LOMBAERT N., VANHAUWAERT A., MATEUCA R., KIRSCH-VOLDERS M. Simplicity and complexity of genetic susceptibility in the occupational environment. *Archives of Public Health*, submitted

AKA P., MATEUCA R., BUCHET J.-P., THIERENS H., KIRSCH-VOLDERS M. hOGG1³²⁶ and XRCC1³⁹⁹ genotypes and the DNA strand break repair phenotype are predictive for genotoxic effects in workers exposed to low dose ionising radiation. *Radiation Research*, submitted

GODDERIS L., DE BOECK M., HAUFROID V., EMMERY M., MATEUCA R., GARDINAL S., KIRSCH-VOLDERS M., VEULEMANS H., LISON D. Influence of genetic polymorphisms on biomarkers of exposure and genotoxic effects in styrene-exposed workers. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, submitted

MATEUCA R., AKA P., DE BOECK M., KIRSCH-VOLDERS M., LISON D. Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. In preparation.

Voordrachten:

M. KIRSCH-VOLDERS In vitro Micronucleus Test: EMS Environmental Mutagen Society, Washington D.C., March 1999

Bijlage II: Lijst van Publicaties

M. KIRSCH-VOLDERS Aneuploidy *in vitro* and *in vivo*: EEMS European Environmental Mutagen Society, Copenhagen, July 1999

M. KIRSCH-VOLDERS. Latest issues in the development of genotoxicity test guidelines. Report of the Washington workshops : recommendations on *in vitro* micronucleus test approaches. EEMS : European Environmental Mutagen Society, Copenhagen, July 1999.

M. KIRSCH-VOLDERS The federal OSTC programme for the biomonitoring of workers exposed to mutagens/carcinogens. European Science Foundation meeting on Genetic Susceptibility, Copenhagen, September 1999.

M. KIRSCH-VOLDERS. Apoptosis induced by spindle inhibitors : Annual joined meeting of the French Society of Toxicology and Mutagenesis, Paris, November 1999.

M. KIRSCH-VOLDERS, I. DECORDIER and E. CUNDARI. Activation of apoptosis signalling pathways by microtubule interfering agents. 30th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Budapest (Hungary), August 22-26, 2000.

M. KIRSCH-VOLDERS, N. TOUIL and M. DE BOECK. The global repair phenotype, assessed by the Comet assay, as a measurement of susceptibility. 2nd GENSUT Workshop (European Science Foundation), Cambridge (UK), September 14-17, 2000.

M. KIRSCH-VOLDERS Biomonitoring of Environmental Effects in Children. Conference on the Teplice Programme, Praha (Czech Republic), October 3-5, 2000.

M. KIRSCH-VOLDERS. Test d'aberrations de nombre de chromosomes. DEA National de Toxicologie, Paris, November 29-December 1, 2000.

M. KIRSCH-VOLDERS Perspectives in the application of the *in vitro* micronucleus test for hazard and risk assessment including IWGTP perspectives. Industrial Genotoxicology Group and Société Française de Toxicologie Génétique. Workshop on the *in vitro* Micronucleus Test, London, December 4, 2000.

M. KIRSCH-VOLDERS. Importance of detecting aneuploidy and polyploidy versus chromosome aberrations. Industrial Genotoxicology Group and Société Française de Toxicologie Génétique. Workshop on the *in vitro* Micronucleus Test, London, December 4, 2000.

M. KIRSCH-VOLDERS Consequences of air pollution on growth and on biomarkers of genotoxicity. Children Genotoxic Exposure Programme, WHO-INCHES, Copenhagen, January 2001.

M. KIRSCH-VOLDERS Micronucleus test as a multi end-point assay to detect apoptosis, necrosis, chromosome breakage and chromosome loss and its relevance to human biomonitoring studies, Turkish Society of Toxicology, Ankara, April 2001.

M. KIRSCH-VOLDERS The detection and hazard evaluation of aneuploidy induction by drugs and environmental chemicals. Department of Pharmacology of the Gazi University of Ankara, Ankara, April 2001.

Bijlage II: Lijst van Publicaties

M. KIRSCH-VOLDERS Relationship between a general repair phenotype and biomarkers of effects (DNA breakage and micronuclei) in low level chronic occupational exposure to ionising radiation. NATO Advanced Research Workshop, France, April 17-20, 2001.

M. KIRSCH-VOLDERS Cytogenetic biomarkers and human cancer risk. European Union Contact Meeting, IARC, France, April 20-21, 2001.

M. KIRSCH-VOLDERS Genotyping/phenotyping of DNA repair polymorphisms. European Union Contact Meeting, IARC, France, April 20-21, 2001.

M. KIRSCH-VOLDERS Micronucleus assay in human monitoring and the HUMN1 project. European Union Contact Meeting, IARC, France, April 20-21, 2001.

M. KIRSCH-VOLDERS Validation of the *in vitro* micronucleus assay for safety evaluation of clastogenic/aneugenic compounds. 8th International Conference on Environmental Mutagens, Shizuoka, Japan, October 21-26, 2001.

M. KIRSCH-VOLDERS Summary of the *in vitro* micronucleus group in the IWGT. 8th International Conference on Environmental Mutagens, Shizuoka, Japan, October 21-26, 2001.

M. KIRSCH-VOLDERS Micronucleus assay in human monitoring and the HUMN project. 8th International Conference on Environmental Mutagens, Shizuoka, Japan, October 21-26, 2001.

M. KIRSCH-VOLDERS Importance of detecting aneuploidy/polyploidy versus chromosome aberrations. 5th International symposium on Chromosomal aberrations - perspectives for the 21st century, Awaji Island, Japan, October 26-28, 2001.

M. KIRSCH-VOLDERS Application of the cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes : inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis. Shanghai satellite meeting for the 8th ICEM - 9th Alexander Hollander Course, Shanghai, China, October 30-31, 2001.

M. KIRSCH-VOLDERS Test des Comètes et CBMN. Atelier SFTG, Faculté de Pharmacie, Marseille, France, Mai 29, 2002.

M. KIRSCH-VOLDERS Caractéristiques, place et prédictivité des tests de génotoxicité au sein du biomonitoring des travailleurs exposés à des mutagènes-cancérogènes. Société Française de Toxicologie Génétique. Marseille, France, 2002.

M. KIRSCH-VOLDERS The micronucleus test : its use *in vitro* as an assay to assess genotoxicity and *ex vivo/in vitro* for biomonitoring purposes. XI Scientific Meeting of the Spanish Society of Environmental Mutagenesis, Bilbao, Spain, July 10-12, 2002.

M. KIRSCH-VOLDERS, A. VANHAUWAERT, U. EICHENLAUB-RITTER AND I. DECORDIER "Indirect Mechanisms of genotoxicity." Eurotox meeting 2002, Budapest, Hungary, September 15-18, 2002.

Bijlage II: Lijst van Publicaties

M. KIRSCH-VOLDERS, A. VANHAUWAERT, U. EICHENLAUB-RITTER AND I. DECORDIER “Exemples de génotoxiques indirects: quelques exemples”, SFTG meeting, Marseille, France, October 2002.

KIRSCH-VOLDERS M. Importance of genotyping and phenotyping in biomonitoring of occupational exposure. Fedichem meeting, November 2002

KIRSCH-VOLDERS M. Threshold evaluation and biomarkers in risk assessment. 7th Nordic Conference on Toxicology and Environmental Mutagens, Bornholm, June 2003

KIRSCH-VOLDERS M. Participation to the working group for the IARC evaluation of the evidence of carcinogenicity of metallic cobalt particles with or without tungsten carbide. IARC, Lyon, 7-14 October 2003

KIRSCH-VOLDERS M., DECORDIER I., AKA P., LOMBAERT N., VANHAUWAERT A., MATEUCA R., Simplicity and complexity of genetic susceptibility in the occupational environment. OSTC workshop on ethics, October 2003, Brussels

KIRSCH-VOLDERS M. Direct and indirect mechanisms of genotoxicity. 5th International Congress of the Turkish Society of Toxicology, Antalya, November 2003

Ph. D. Thesissen:

N. TOUIL

Application of genotoxicity biomarker for chronic occupational exposure to ionising radiation

PhD Thesis, Brussel, 2001

M. DE BOECK

Genotoxic effects of hard metal dust: possible relevance for lung cancer

PhD Thesis, Brussel, 2002

Verslagen in het kader van het DWTC project:

Audit summary report: Scientific support programme on the health protection of workers (1998-2003). Genotypic and phenotypic variability, individual susceptibility factors and industrial genotoxicants/neurotoxicants in occupational medicine. *M. KIRSCH-VOLDERS, L. DE RIDDER, C. LAURENT, D. LISON, H. THIERENS, H. VEULEMANS, P. VIELLE.* 2003.

Van gezondheidsrisico's... naar gezondheidsbescherming van de werknemers: 10 jaar federaal onderzoek inzake gezondheid, werk en milieu. *KIRSCH-VOLDERS M., VANHAUWAERT A., LISON D.* 2002

Bijlage II: Lijst van Publicaties

Des risques pour la santé... à la protection des travailleurs en matière de santé: 10 ans de recherche fédérale en santé, travail et environnement. *KIRSCH-VOLDERS M., VANHAUWAERT A., LISON D.* 2002

KUL

Publicaties:

VIAENE MK, PAUWELS W, VEULEMANS H, ROELS HA, MASSCHELEIN R. Neurobehavioural changes and persistence of complaints in workers exposed to styrene in a polyester boat building plant: influence of exposure characteristics and microsomal epoxide hydrolase phenotype, *Occup Environ Med.* 2001 Feb;58(2):103-12.

VAN NIMMEN-N, VEULEMANS-H. A highly sensitive gas chromatographic – mass spectrometric screening method for the determination of picogram levels of fentanyl, sufentanil and alfentanil in urine of potentially opioid exposed workers. In preparation.

VAN NIMMEN-N, VEULEMANS-H. Development and validation of a highly sensitive gas chromatographic – mass spectrometric method for the simultaneous determination of (sub-)nanogram levels of fentanyl, sufentanil and alfentanil in breathing air and hand wipes of opioid exposed workers. In preparation.

GODDERIS-L, BRAEKMAN-L, VIAENE-MK. Neurobehavioral and clinical effects in workers still exposed and formerly exposed to CS₂ in a viscose rayon industry. A cross-sectional study. In preparation.

GODDERIS-L, VANHAECHE-K, MASSCHELEIN-R, SERMEUS-W, VEULEMANS-H Prevention Pathways: Application of the Critical Path Methodology in Occupational Health Services. In preparation.

N. VAN NIMMEN, K. POELS, H. VEULEMANS. A highly sensitive gas chromatographic – mass spectrometric screening method for the determination of picogram levels of fentanyl, sufentanil and alfentanil and their major metabolites in urine of opioid exposed workers. Accepted for publication in *The Journal of Chromatography B*.

N VAN NIMMEN, H VEULEMANS. Development and validation of a highly sensitive gas chromatographic – mass spectrometric screening method for the simultaneous determination of nanogram levels of fentanyl, sufentanil and alfentanil in air and surface contamination wipes. Presently being revised for publication in the *Journal of Chromatography A*.

GODDERIS L., DE BOECK M., HAUFROID V., EMMERY M., MATEUCA R., GARDINAL S., KIRSCH-VOLDERS M., VEULEMANS H., LISON D. Influence of genetic polymorphisms on biomarkers of exposure and genotoxic effects in styrene-exposed workers. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, submitted

Voordrachten:

L GODDERIS 'Neurobehavioral and clinical effects in workers still exposed and formerly exposed to CS₂ in the viscose rayon industry: A cross-sectional study.' 8th International Symposium on Neurobehavioral Methods and Effects in Occupational and Environmental Health. Brescia, June 23-26, 2002

N VAN NIMMEN 'Het meten van blootstelling aan opium-achtige stoffen in de farmaceutische industrie'. Symposium Nederlandse Vereniging voor Arbeidshygiëne. Zeist, 20 en 21 maart 2003.

L GODDERIS Monitoring van genotoxische agentia: Een overzicht aan de hand van styreen. Symposium Nederlandse Vereniging voor Arbeidshygiëne. Zeist, 20 en 21 maart 2003.

RUG (promotor H. Thierens)

Papers in internationale journals:

VRAL A., THIERENS H., BRYANT P. AND DE RIDDER L. The higher micronucleus yield in B versus T lymphocytes after low dose γ -irradiation is not linked with defective Ku86 protein. *Int. J. Rad. Biol.*, 77(3), 329-339, 2001.

LAMBERT V., THIERENS H., MONSIEURS M., RONCACIO C. AND LAURENT C. Translocation frequencies measured in patients one year after radioactive iodine therapy for thyrotoxicosis. *Int. J. Radiat. Biol.* 77, 679-685, 2001.

VRAL A., THIERENS H., BAEYENS A. AND DE RIDDER L. The G2 and Micronucleus assays for human blood lymphocytes as biomarkers of individual sensitivity towards ionising radiation: limitations imposed by intra-individual variability. *Radiation Research*, 157, 472-477, 2002.

TOUIL N., AKA P., BUCHET J.-P., THIERENS H. and KIRSCH-VOLDERS M. Assessment of genotoxic effects related to chronic low level exposure to ionising radiation using biomarkers for DNA damage and repair. *Mutagenesis* 17, 223-232, 2002.

THIERENS H., VRAL A., BARBE M. and DE RIDDER L. Micronucleus assay reveals no radiation effects among nuclear power plant workers. *Health Physics* 83, 178-182, 2002.

VOISIN P., BARQUINERO F., BLAKELY B., LINDHOLM C., LLOYD D., LUCCIONI C., MILLER S., PALITTI F., PRASANNA P., STEPHAN G., THIERENS H., TURAI I., WILKINSON D., WOJCIK A. Towards a normalization of biological dosimetry by cytogenetics. *Cellular and Molecular Biology* 48, 501-504, 2002.

THIERENS H., VRAL A., BARBE M., MEIJLAERTS M., BAEYENS A. and DE RIDDER L. Chromosomal radiosensitivity study of temporary nuclear workers demonstrates the adaptive response induced by occupational exposure. *Int. J. Rad. Biol.*, 78, 12, 1117-1126, 2002.

Bijlage II: Lijst van Publicaties

BAEYENS A., THIERENS H., CLAES K., POPPE B., MESSIAEN L., DE RIDDER L. & VRAL A. Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. *British Journal of Cancer*, 87, 1379-1385, 2002.

VRAL A., THIERENS H., BAEYENS A. AND DE RIDDER L. Induction and disappearance of G2 chromatid breaks in lymphocytes after low doses of low LET gamma-rays and high LET fast neutrons. *Int. J. Rad. Biol.*, 78, 4, 249-257, 2002.

THIERENS H., VRAL A., AOUSALAH B., BARBE M. AND DE RIDDER L. A chromosomal radiosensitivity study of a population of radiation workers using the micronucleus assay. *International Journal of Low Radiation*, 1, 1, 102-112, 2003

VRAL A., BAEYENS A., THIERENS H. AND DE RIDDER L. What's the reliability of chromosomal aberration assays as biomarkers of sensitivity towards ionising radiation? *International Journal of Low Radiation*, 1, 2, 256-265, 2004.

Voordrachten op wetenschappelijke meetings en meetings in het kader van het programma:

THIERENS H., VRAL A., MONSIEURS M. AND DE RIDDER L. Patient studies in Ghent: results related to radiosensitivity. In *Proceedings of the 10th Gray Workshop on "Chromosomal Radiosensitivity: Mechanisms and Applications"*-St Andrews, Scotland, 13-16 July 2000.

THIERENS H., VRAL A., MONSIEURS M., DIERCKX R. AND DE RIDDER L. Application of the micronucleus assay in the treatment of patients with metabolic radiotherapy. In *Proceedings of the 30th Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology*, p.24- Warszawa, Poland, 27-31 August 2000

VRAL A., BAEYENS A., THIERENS H. AND DE RIDDER L. What's the reliability of chromosomal aberration assays as biomarkers of sensitivity towards ionising radiation? In "The effects of low and very low doses of ionizing radiation on human health." *Proceedings of the Second International Symposium held at the Dublin Institute of technology - Dublin, Ireland, 27-29 June 2001*, Edited by WONUC, World Council of Nuclear Workers.

THIERENS H., VRAL A., AOUSALAH B., BARBE M. AND DE RIDDER L. A chromosomal radiosensitivity study of a population of radiation workers using the micronucleus assay. In "The effects of low and very low doses of ionizing radiation on human health." *Proceedings of the Second International Symposium held at the Dublin Institute of technology - Dublin, Ireland, 27-29 June 2001*, Edited by WONUC, World Council of Nuclear Workers.

VRAL A., BAEYENS A., THIERENS H. AND DE RIDDER L. How reliable are chromosomal aberration assays as biomarkers of individual sensitivity towards ionising radiation? *Abstractbook*, p 77, S9/3 (oral presentation). 31th Annual Meeting of the

Bijlage II: Lijst van Publicaties

European Environmental Mutagen Society. "Genetic susceptibility at low dose exposure". Ghent, 1-5 September 2001.

THIERENS H., VRAL A., BARBÉ M., BAEYENS A. AND DE RIDDER L. Cytogenetic biomonitoring of external workers in the nuclear industry: study of exposure effects and susceptibility. Abstractbook, p 167, P3/11 (poster presentation). 31th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society. "Genetic susceptibility at low dose exposure". Ghent, 1-5 September 2001.

VRAL A., THIERENS H., BAEYENS A. AND DE RIDDER L. Inter-versus intra-individual variation in G2 assay scores. Oral presentation at the Technical Workshop on the G2 assay, St Andrews University, Bute Medical Buildings, Scotland, 21-23 September 2001.

BAEYENS A., THIERENS H., CLAES K., MESSIAEN L., DE RIDDER L. AND VRAL A. Chromosomal radiosensitivity in lymphocytes of breast cancer patients with a family history of breast cancer. Cancer Detection and Prevention: 2002 Symposium Volume, S-114 , nr. 231 (poster presentation). 6th International Symposium on Predictive Oncology and Intervention Strategies, Pasteur Institute, Paris, France, 9-12 February, 2002.

BAEYENS A., THIERENS H., CLAES K., MESSIAEN L., DE RIDDER L. AND VRAL A. Chromosomal radiosensitivity in lymphocytes of breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. Abstractbook p. 178, IILP.6. (poster presentation). DNA Damage and Repair, Fundamental aspects and contribution to human disorders. 32nd Annual Meeting of European Environmental Mutagen Society, September 3-7, 2002 Warsaw, Poland.

VRAL A., THIERENS H., BAEYENS A. AND DE RIDDER L. Induction and disappearance of G2 chromatid breaks in lymphocytes after low doses of low LET gamma-rays and high LET fast neutrons. Abstractbook p.21 (oral presentation). Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology (ESRB), September 4-7, 2002, Liège, Belgium.

VRAL A., BAEYENS A., THIERENS H., CLAES K., MESSIAEN L. AND DE RIDDER L. Chromosomal radiosensitivity in lymphocytes of breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. Abstractbook p.80 (oral presentation). Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology (ESRB), September 4-7, 2002, Liège, Belgium.

THIERENS H., VRAL A., BARBÉ M., BAEYENS A. AND DE RIDDER L. Short term occupational exposure induces *in vivo* adaptive response in PBLs of radiation workers. Abstractbook p.88 (oral presentation). Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology (ESRB), September 4-7, 2002, Liège, Belgium.

BAEYENS A., THIERENS H., CLAES K., POPPE B., MESSIAEN L., DE RIDDER L. AND VRAL A. Chromosomal radiosensitivity in lymphocytes of breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. Oral presentation at the BEMS meeting held in Brussels, October 3, 2002.

Bijlage II: Lijst van Publicaties

VRAL A., BAEYENS A., THIERENS H., CLAES K., MESSIAEN L. AND DE RIDDER L. Chromosomal radiosensitivity in lymphocytes of breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition (oral presentation). In: International Journal of Molecular Medicine, vl 10, suppl. 1, S8, 114, 2002. Proceedings of the abstracts of the 7th world congress on advances in oncology, 5th international symposium on molecular medicine, 10-12 October 2002, Hersonissos, Crete, Greece

VRAL A., THIERENS H., BAEYENS A. AND DE RIDDER L. Induction and rejoining of G2 chromatid breaks in lymphocytes after low doses of low LET gamma-rays and high LET fast neutrons (poster presentation). In: International Journal of Molecular Medicine, vl 10, suppl. 1, S8, 115, 2002. Proceedings of the abstracts of the 7th world congress on advances in oncology, 5th international symposium on molecular medicine, 10-12 October, 2002, Hersonissos, Crete, Greece

THIERENS H., VRAL A., BARBÉ M., MEIJLAERS M., BAEYENS A. AND DE RIDDER L. Chromosomal radiosensitivity is affected by recent exposures in nuclear workers. Abstractbook P17 (poster presentation), International Workshop: Biological basis of sensitivity to ionising radiation, DKFZ Heidelberg, May 9-10, 2003.

BAEYENS A., VRAL A., THIERENS H. AND DE RIDDER L., A comparison of the cytogenetic response of resting peripheral blood lymphocytes, IL-2 stimulated lymphocytes and EBV-transformed lymphoblastoid cells. Abstractbook P16 (poster presentation), International Workshop: Biological basis of sensitivity to ionising radiation, DKFZ Heidelberg, may 9-10, 2003.

BAEYENS A., VRAL A., THIERENS H. AND DE RIDDER L.. A comparison of the cytogenetic response to irradiation of resting peripheral blood lymphocytes, IL-2 stimulated lymphocytes and EBV-transformed lymphoblastoid cells. Abstractbook P59 p.81, From hazard to risk, European Environmental Mutagen Society, 33rd Annual meeting, Aberdeen, Scotland, UK, August 24-28, 2003

VRAL A., BAEYENS A., THIERENS H. AND DE RIDDER L.. Chromosomal aberrations and individual sensitivity towards ionising radiation. In: Toxicology Letters, vol 144 Suppl. 1, S9, 81, p. 25. Abstracts of the 41st Congress of the European Societies of Toxicology, EUROTOX 2003, Florence, Italy, Sept. 28-October 1, 2003., S9, 81

RUG (promotor L. de Ridder)

Publicaties:

paper 1

S. BONASSI, M. FENECH, C. LANDO, Y. LIN, M. CEPPI, W.P. CHANG, N. HOLLAND, M. KIRSCH-VOLDERS, E. ZEIGER, S. BAN, R. BARALE, M.P. BIGATTI, C. BOLOGNESI, C. JIA, M. DI GIORGIO, L.R. FERGUSON, KA. FUCIC, O.G. LIMA, P. HRELIA, A.P. KRISHNAJA, T-K. LEE, L. MIGLIORE, L. MIKHALEVICH, E. MIRKOVA, P. MOESSO, W-U. MÜLLER, Y. ODAGIRI, M.R. SCARFI, E. SZABOVA, I. VOROBTSOVA, A. VRAL AND A. ZIJNO. HUman MicroNucleus project: international database comparison for

Bijlage II: Lijst van Publicaties

results with the cytokines-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 37: 31-45 (2001).

paper 2

A. VRAL, H. THIERENS, P. BRYANT AND L. DE RIDDER. The higher micronucleus yield in B versus T lymphocytes after low dose γ -irradiation is not linked with defective Ku86 protein. *Int. J. Rad. Biol.*, 77(3), 329-339, 2001.

paper 3

A. VRAL, H. THIERENS, A. BAEYENS AND L. DE RIDDER, The G2 and Micronucleus assays for human blood lymphocytes as biomarkers of individual sensitivity towards ionising radiation : limitations imposed by intra-individual variability. *Radiation Research*, 157, 472-477, 2002.

paper 4

BRYANT, P.E., GRAY, L., RICHES, A.C., STEEL, C.M., FINNON, P., HOWE, O., KESTERTON, I., VRAL, A., CURWEN, G.B., SMART, V., TAWN, E.J., WHITEHOUSE, C.A., The G2 assay: a technical report. *Int. J. Rad. Biol.*, 78, 9, 863-866 (2002)

paper 5

FENECH M., BONASSI S., TURNER J., LANDO C., CEPPI M., CHANG W.P., HOLLAND N., KIRSCH-VOLDERS M., ZEIGER E., BIGATTI M.P., BOLOGNESI C., JIA C., DE LUCA G., DI GIORGIO M., FERGUSON L.R., FUCIC A., GARCIA LIMA O., HADJIDEKOVA V., HRELIA P., JAWORSKA A., JOKSIC G., KRISHNAJA A.P., LEE T-K., MARTELLI A., MCKAY M.J., MIGLIORE L., MIRKOVA E., MÜLLER W-U., ODAGIRI Y., ORSIERE T.T., SCARFÌ M.R., SILVA M.J., SOFUNI T., SURALLES J., TRENTA G., VOROBTSOVA I., VRAL A., ZIJNO A. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 534: 45-64, 2002.

paper 6

H. THIERENS, A. VRAL, M. BARBE, M. MEIJLAERTS, A. BAEYENS and L. DE RIDDER, Chromosomal radiosensitivity study of temporary nuclear workers demonstrates the adaptive response induced by occupational exposure. *Int. J. Rad. Biol.*, 78, 12, 1117-1126 (2002)

paper 7

A. BAEYENS, H. THIERENS, K. CLAES, B. POPPE, L. MESSIAEN, L. DE RIDDER & A. VRAL, Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. *British Journal of Cancer*, 87, 1379-1385 (2002)

paper 8

A. VRAL, H. THIERENS, A. BAEYENS AND L. DE RIDDER, Induction and disappearance of G2 chromatid breaks in lymphocytes after low doses of low LET gamma-rays and high LET fast neutrons. *Int. J. Rad. Biol.*, 78, 4, 249-257, 2002.

paper 9

STEFANO BONASSI, MONICA NERI, CECILIA LANDO, MARCELLO CEPPI, YI-PING LIN, WUSHOU P. CHANG, NINA HOLLAND, MICHELINE KIRSCH-VOLDERS, ERROL ZEIGER, MICHAEL FENECH, AND THE HUMN COLLABORATIVE GROUP. Members of the HUMN collaborative group are: Sadayuki Ban, Hiroshima, Japan; Roberto Barale, Pisa, Italy; Maria Paola Bigatti, Turin, Italy; Claudia Bolognesi, Genoa, Italy; Cao Jia, Chong Qing, China; Marina Di Giorgio, Buenos Aires, Argentina; Lynnette R. Ferguson, Auckland, New Zealand; Aleksandra Fucic, Zagreb, Croatia; Patrizia Hrelia, Bologna, Italy; Ayyathan P. Krishnaja, Mumbai, India; Tung-Kwang Lee, Greenville, NC, USA; Lucia Migliore, Pisa, Italy; Ludmilla Mikhalevich, Minsk, Belarus; Ekaterina Mirkova, Sofia, Bulgaria; Pasquale Mosesso, Viterbo, Italy; Wolfgang-Ulrich Müller, Essen, Germany; Youichi Odagiri, Kofu, Japan; Maria Rosaria Scarfi, Naples, Italy; Elena Szabova, Bratislava, Slovak Republic; Irena Vorobtsova, St. Petersburg, Russia; Anne Vral, Ghent, Belgium; Andrea Zijno, Rome, Italy. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus Project. *Mutation Research* 543: 155-166 (2003).

paper 10

H. THIERENS, A. VRAL, B. AOUSALAH, M. BARBE AND L. DE RIDDER. A chromosomal radiosensitivity study of a population of radiation workers using the Micronucleus assay. *International Journal of Low Radiation*, 1, 1, 102-112, 2003

paper 11

A. VRAL, A. BAEYENS, H. THIERENS AND L. DE RIDDER. What's the reliability of chromosomal aberration assays as biomarkers of sensitivity towards ionising radiation? *International Journal of Low Radiation*, 1, 2, 256-265, 2004.

Voordrachten op wetenschappelijke conferenties en seminars in het kader van het programma:

A. *VRAL*. Relationship between high chromosomal radiosensitivity in B lymphocytes and defective DNA repair(oral presentation). Radiation Research 2000, 10-12/4/2000, Bristol, UK

A. *VRAL*. Is there a correlation between high chromosomal radiosensitivity in B lymphocytes and defective DNA repair ? Oral presentation at 10th Gray Workshop-“Chromosomal Radiosensitivity: Mechanisms and applications”, 13-16 juli 2000, St Andrews, Schotland.

A. *VRAL*. Is there a correlation between high chromosomal radiosensitivity in B lymphocytes and defective DNA repair ? Oral presentation at 30th Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology: “European Radiation Research 2000”, 27-31 augustus 2000, Warschau, Polen.

A. *VRAL*, A. *BAEYENS*, H. *THIERENS* AND L. *DE RIDDER*. What’s the reliability of chromosomal aberration assays as biomarkers of sensitivity towards ionising radiation ? In “The effects of low and very low doses of ionizing radiation on human health.” Proceedings of the Second International Symposium held at the Dublin Institute of technology - Dublin, Ireland, 27-29 June 2001, Edited by WONUC, World Council of Nuclear Workers. Oral presentation of the paper during the meeting.

H. *THIERENS*, A. *VRAL*, B. *AOUSALAH*, M. *BARBE* AND L. *DE RIDDER*. A chromosomal radiosensitivity study of a population of radiation workers using the micronucleus assay. In “The effects of low and very low doses of ionizing radiation on human health.” Proceedings of the Second International Symposium held at the Dublin Institute of technology - Dublin, Ireland, 27-29 June 2001, Edited by WONUC, World Council of Nuclear Workers. Poster presentation.

A. *VRAL*, A. *BAEYENS*, H. *THIERENS* AND L. *DE RIDDER*. How reliable are chromosomal aberration assays as biomarkers of individual sensitivity towards ionising radiation? Abstractbook, p 77, S9/3 (oral presentation). 31th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society. “Genetic susceptibility at low dose exposure”. Ghent, 1-5 September 2001.

H. *THIERENS*, A. *VRAL*, M. *BARBÉ*, A. *BAEYENS* AND L. *DE RIDDER*. Cytogenetic biomonitoring of external workers in the nuclear industry : study of exposure effects and susceptibility. Abstractbook, p 167, P3/11 (poster presentation). 31th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society. “Genetic susceptibility at low dose exposure”. Ghent, 1-5 September 2001.

A. *VRAL*, H. *THIERENS*, A. *BAEYENS* AND L. *DE RIDDER*. Inter-versus intra-individual variation in G2 assay scores. Oral presentation at the Technical Workshop on the G2 assay, St Andrews University, Bute Medical Buildings, Scotland, 21-23 september 2001.

Bijlage II: Lijst van Publicaties

A. VRAL, H. THIERENS, A. BAEYENS AND L. DE RIDDER Induction and rejoining of G2 chromatid breaks in lymphocytes after low doses of low LET gamma-rays and high LET fast neutrons. Invited speaker at the International Workshop on Biological Effects of Ionising Radiation, Electromagnetic Fields and Chemical Toxic Agents, 2-6 october 2001, Sinaia, Romania.

A. BAEYENS, H. THIERENS, K. CLAES, L. MESSIAEN, L. DE RIDDER AND A. VRAL Chromosomal radiosensitivity in lymphocytes of breast cancer patients with a family history of breast cancer. Cancer Detection and Prevention : 2002 Symposium Volume, S-114 , nr. 231 (poster presentation). 6th International Symposium on Predictive Oncology and Intervention Strategies, Pasteur Institute, Paris, France, 9-12 Februari, 2002.

A. BAEYENS, H. THIERENS, K. CLAES, L. MESSIAEN, L. DE RIDDER AND A. VRAL Chromosomal radiosensitivity in lymphocytes of breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. Abstractbook p. 178, III.P.6. (poster presentation). DNA Damage and Repair, Fundamental aspects and contribution to human disorders. 32nd Annual Meeting of European Environmental Mutagen Society, September 3-7, 2002 Warsaw, Poland.

A. VRAL, H. THIERENS, A. BAEYENS AND L. DE RIDDER, Induction and disappearance of G2 chromatid breaks in lymphocytes after low doses of low LET gamma-rays and high LET fast neutrons. Abstractbook p.21 (oral presentation). Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology (ESRB), September 4-7, 2002, Liège, Belgium.

A. VRAL, A. BAEYENS, H. THIERENS, K. CLAES, L. MESSIAEN AND L. DE RIDDER. Chromosomal radiosensitivity in lymphocytes of breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. Abstractbook p.80 (oral presentation). Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology (ESRB), September 4-7, 2002, Liège, Belgium.

H. THIERENS, A. VRAL, M. BARBÉ, A. BAEYENS AND L. DE RIDDER. Short term occupational exposure induces in vivo adaptive response in PBLs of radiation workers. Abstractbook p.88 (oral presentation). Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology (ESRB), September 4-7, 2002, Liège, Belgium.

A. BAEYENS, H. THIERENS, K. CLAES, B. POPPE, L. MESSIAEN, L. DE RIDDER AND A. VRAL. Chromosomal radiosensitivity in lymphocytes of breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. Oral presentation at the BEMS meeting held in Brussels, October 3, 2002.

A. VRAL, A. BAEYENS, H. THIERENS, K. CLAES, L. MESSIAEN AND L. DE RIDDER. Chromosomal radiosensitivity in lymphocytes of breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition (oral presentation). In: International Journal of Molecular Medicine, vl 10, suppl. 1, S8, 114, 2002. Proceedings of the abstracts of the 7th world congress on advances in oncology, 5th international symposium on molecular medicine, 10-12 october, 2002, Hersonissos, Crete, Greece

Bijlage II: Lijst van Publicaties

A VRAL , H. THIERENS, A. BAEYENS AND L. DE RIDDER. Induction and rejoining of G2 chromatid breaks in lymphocytes after low doses of low LET gamma-rays and high LET fast neutrons (poster presentation). In: International Journal of Molecular Medicine, vl 10, suppl. 1, S8, 115, 2002. Proceedings of the abstracts of the 7th world congress on advances in oncology, 5th international symposium on molecular medicine, 10-12 october, 2002, Hersonissos, Crete, Greece

A. BAEYENS, H. THIERENS, K. CLAES, B. POPPE , L. MESSIAEN, L. DE RIDDER AND A. VRAL. Chromosomal radiosensitivity in lymphocytes of breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. Oral presentation presented on “ Workshop on Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients”, Universitätsklinikum Ulm, Germany, 25-26 november, 2002.

A. VRAL , H. THIERENS, A. BAEYENS AND L. DE RIDDER. What's the reliability of chromosomal aberration assays as biomarkers of individual sensitivity towards ionising radiation? Oral presentation presented on “Workshop on Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients”, Universitätsklinikum Ulm, Germany, 25-26 november, 2002.

H. THIERENS, A. VRAL, M. BARBÉ , M. MEIJLAERS, A. BAEYENS AND L. DE RIDDER. Chromosomal radiosensitivity is affected by recent exposures in nuclear workers. Abstractbook P17 (poster presentation), International Workshop: Biological basis of sensitivity to ionising radiation, DKFZ Heidelberg, may 9-10, 2003.

A. BAEYENS, A. VRAL, H. THIERENS AND L. DE RIDDER, A comparison of the cytogenetic response of resting peripheral blood lymphocytes, IL-2 stimulated lymphocytes and EBV-transformed lymphoblastoid cells. Abstractbook P16 (poster presentation), International Workshop: Biological basis of sensitivity to ionising radiation, DKFZ Heidelberg, may 9-10, 2003.

A. VRAL, A. BAEYENS, H. THIERENS, K. CLAES, B. POPPE , L. MESSIAEN AND L. DE RIDDER. Chromosomal radiosensitivity in BRCA1 and 2 patients and healthy carriers. P156 (poster presentation), International Workshop: Biological basis of sensitivity to ionising radiation, DKFZ Heidelberg, may 9-10, 2003.

A. BAEYENS, A. VRAL, H. THIERENS AND L. DE RIDDER. A comparison of the cytogenetic response to irradiation of resting peripheral blood lymphocytes, IL-2 stimulated lymphocytes and EBV-transformed lymphoblastoid cells. Abstractbook P59 p.81, From hazard to risk, European Environmental Mutagen Society, 33rd Annual meeting, Aberdeen, Scotland, UK, August 24-28, 2003

A.VRAL, A. BAEYENS, H. THIERENS, K. CLAES, B. POPPE , L. MESSIAEN AND L. DE RIDDER. Chromosomal radiosensitivity in BRCA1 and 2 patients and healthy carriers. Abstractbook P60, p.81, From hazard to risk, European Environmental Mutagen Society, 33rd Annual meeting, Aberdeen, Scotland, UK, August 24-28, 2003

A. VRAL, A. BAEYENS, H. THIERENS AND L. DE RIDDER. Chromosomal aberrations and individual sensitivity towards ionising radiation. In: Toxicology Letters, vol 144 Suppl. 1, S9, 81, p. 25. Abstracts of the 41st Congress of the European Societies of Toxicology, EUROTOX 2003, Florence, Italy, Sept. 28-October 1, 2003., S9, 81

A. VRAL, A. BAEYENS, H. THIERENS, K. CLAES, B. POPPE, L. MESSIAEN AND L. DE RIDDER. Chromosomal radiosensitivity in BRCA1 and 2 patients and healthy mutation carriers (oral presentation). In: International Journal of Molecular Medicine, vol 12, suppl. 1, S71, 366, 2003. Proceedings of the abstracts of the 8th world congress on advances in oncology, 6th international symposium on molecular medicine, 16-18 october, 2003, Hersonissos, Crete, Greece

UCL (promotor D. Lison)

Publicaties:

M. DE BOECK, S LARDAU, JP BUCHET, M. KIRSCH-VOLDERS, D. LISON (2000) Absence of significant genotoxicity in lymphocytes and urine from workers exposed to moderate levels of cobalt-containing dust : a cross-sectional study. Environ Mol Mutagen 36: 151-160.

LISON D. – Composés métalliques. In “Les cancers professionnels – Tome 1 – J.C. Pairon, P. Brochard, J.-P. Le Bourgeois, R. Ruffié. Edition Margaux Orange. chapitre 6, 81 –95, 2000.

HAUFROID V, GARDINAL S, LICOT C, VILLALPANDO ML, VAN OBBERGH L, CLIPPE A, LISON D (2000) Biological monitoring of exposure to sevoflurane in operating room personnel by the measurement of hexafluoroisopropanol and fluoride in urine. Biomarkers 5:141-151

D. LISON (2000) Lung fibrosis reported in a dental technician (letter). Am Industrial Hygiene Association J 61 : 158.

D. LISON (2000) letter to the Editor. Toxicol appl Pharmacol 168:173-175.

HAUFROID V, BUCHET JP, GARDINAL S, GHITTORI S, IMBRIANI M, LISON D (2001) Importance of genetic polymorphisms for enzymes involved in the biotransformation of styrene in humans and interest for interpretation of biomarkers of exposure. Biomarkers 6:236-249

T NOMIYAMA, V. HAUFROID, J-P BUCHET, H MIYAUCHI, S TANAKA, T YAMAUCHI, S IMAMIYA, Y SEKI, K OMAE, D LISON (2001) Insertion polymorphism of CYP2E1 and urinary N-methylformamide after N,N-dimethylformamide exposure in Japanese workers. Int Arch Occup Environ Health 74(3):224-228 .

HAUFROID V., TOUBEAU F., CLIPPE A., BUYSSCHAERT M., GALA JL., LISON D. (2001) Real-time quantification of cytochrome P4502E1 (CYP2E1) mRNA in human peripheral blood lymphocytes by RT-PCR : Method and practical application. Clin Chem 47:1126-1129

Bijlage II: Lijst van Publicaties

D LISON, M DE BOECK, V VEROUGSTRAETE, M KIRSCH-VOLDERS (2001) Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occup Environ Med* 58:619-625

LIGOCKA D., LISON D., HAUFROID V. (2001) Quantitative analysis of 5-hydroxy-N-methylpyrrolidone in urine for biological monitoring of N-methylpyrrolidone exposure. *J Chromat B* 778:223-230.

M KIRSCH-VOLDERS, M DE BOECK, D LISON (2002) Génotoxicité et activité professionnelle- l'Encyclopédie médico-chirurgicale (Paris). 16-537-C10, 9 pages.

KIRSCH-VOLDERS M, DE BOECK M, LISON D (2002) Tests de génotoxicité. Encyclopédie médico-chirurgicale 16-537-C11, 4 pages.

NEMERY B, BAST A, BEHR J, BORM PJA, BOURKE SJ, CAMUS PH, DE VUYST P, JANSEN HM, KINNULA VL, LISON D, PELKONEN O, SALTINI C (2001) Interstitial lung disease induced by exogenous agents : factors governing susceptibility. *Eur Respi J* 18:30s-42s.

V. HAUFROID, J.-P. BUCHET, S. GARDINAL AND D. LISON. (2002a) Cytochrome P4502E1 phenotyping by the measurement of the chlorzoxazone metabolic ratio: evaluation of its usefulness in workers exposed to styrene. *Int Arch Occup Environ Health* 75:453-458

HAUFROID V, JAKUBOWSKI M, JANASIK B, LIGOCKA D, BUCHET JP, BERGAMASCHI E, MANINIP, MUTTI A, GHITTORI S, ARAND M, HANGEN N, OESCH F, HIRVONEN A, LISON D (2002b) Interest of genotyping and phenotyping of drug-metabolizing enzymes for the interpretation of biological monitoring of exposure to styrene. *Pharmacogenetics* 12:691-702.

HAUFROID V AND LISON D. (2002c) Genotyping and phenotyping of metabolic enzymes relevant for the interpretation of biomarkers of exposure. *Arch Public Health*, 60, 187-202

DE BOECK M., LOMBAERT N., DE BACKER S., FINSY R. , LISON D., KIRSCH-VOLDERS M. (2003) In vitro genotoxic effects of different combinations of cobalt and metallic carbide particles. *Mutagenesis* 18:177-186

LIGOCKA D., LISON D, HAUFROID V. (2003) Contribution of CYP2E1 to N-Methyl-2-Pyrrolidone metabolism. *Arch Toxicol* 77: 261-266

HAUFROID V., LIGOCKA D., BUYSSCHAERT M., HORSMANS Y., LISON D. (2003) Cytochrome P4502E1 (CYP2E1) expression in peripheral blood lymphocytes : Evaluation in hepatitis C and diabetes. *Eur J Clin Pharmacol* 59: 29-33

L. GODDERIS, M. DE BOECK, V. HAUFROID, M. EMMERY, R. MATEUCA., S. GARDINAL, M. KIRSCH-VOLDERS, H. VEULEMANS, D. LISON. (2004) Influence of genetic polymorphisms on biomarkers of exposure and genotoxic effects in styrene-exposed workers. (submitted)

Bijlage II: Lijst van Publicaties

V. *VEROUGSTRAETE*, A. *MALLANTS*, J.-P. *BUCHET*, B. *SWENNEN*, D. *LISON* (2004) Determinants of lung function changes in workers exposed to cobalt compounds: a 13-year follow-up” (in revision).

Mondelinge voordrachten:

D. *LISON*. Health risks associated with exposure to cobalt-containing dusts. First Uruguayan Congress of Clinical Toxicology Montevideo April 1st 2000.

D. *LISON*. Genotoxicity study in workers exposed to cobalt-containing particles. Tripartite meeting VUB-UCL-Université Maastricht – Woluwé 14 April 2000.

V. *HAUFROID AND D. LISON*. Individual variations in the expression of enzymes involved in the biotransformation of styrene and influence on the interpretation of biomarkers of exposure. 26th international congress on occupational health. Singapore 27 August-1 September 2000.

D. *LISON*. Intégration du génotype dans le monitoring biologique d'exposition au styrène. Journées nationales de médecine du travail. Bruxelles, le 5 octobre 2000.

V. *HAUFROID ET AL*. Real time RT-PCR quantification of CYP2E1 expression as a tool for biomonitoring. Fifth International Symposium on Biological Monitoring in Occupational and Environmental Health, 18-21 September, Banff, Alberta, Canada.

D. *LISON*. Determinants of the genotoxicity of metallic compounds. European Environmental Mutagenesis Society - Gent, 5 September 2001.

D. *LISON*. Metals and toxicology. British Association for Lung Research - Leuven, 8 September 2001.

V. *HAUFROID ET D. LISON*. Outils de biologie moléculaire et biomonitoring d'exposition Ulg « Les jeudis de Médecine du travail » 28 février 2002

D. *LISON*. Applications du génotypage pour une meilleure interprétation de l'exposition professionnelle. Journée d'étude SSTC- 30 octobre 2003.

Verslagen in het kader van het DWTC project:

Audit summary report: Scientific support programme on the health protection of workers (1998-2003). Genotypic and phenotypic variability, individual susceptibility factors and industrial genotoxicants/neurotoxicants in occupational medicine. M. *KIRSCH-VOLDERS*, L. *DE RIDDER*, C. *LAURENT*, D. *LISON*, H. *THIERENS*, H. *VEULEMANS*, P. *VIELLE*. 2003.

Bijlage II: Lijst van Publicaties

Van gezondheidsrisico's... naar gezondheidsbescherming van de werknemers: 10 jaar federaal onderzoek inzake gezondheid, werk en milieu. *KIRSCH-VOLDERS M., VANHAUWAERT A., LISON D.* 2002

Des risques pour la santé... à la protection des travailleurs en matière de santé: 10 ans de recherche fédérale en santé, travail et environnement. *KIRSCH-VOLDERS M., VANHAUWAERT A., LISON D.* 2002

UCL (promotor P. Vielle)

Publicaties:

- « La génétique comme outil de prévention de la santé au travail : perspectives et dangers », en préparation
- « Tests génétiques et risques professionnels : impact sur la prévention et l'indemnisation des maladies professionnelles », *Archives of Public Health* , à paraître, juin 2004
- « Les examens médicaux liés à la relation de travail : bref commentaire de la loi du 28 janvier 2003 », *T. Gez. / Rev. Dr. Santé*, à paraître
- « Les tests génétiques dans la relation de travail : nouvelle forme de contrôle ou amélioration de la santé au travail ? », *Recherches sociologiques, Du contrôle à la responsabilisation.* 2002, vol. XXXIII, n°1, pp. 49-66
- « Secret, génétique et emploi,... », *Ethica Clinica*, septembre 2001, n° 23, p. 19-21
- « Tests génétiques préalables à l'embauche et droit au respect de la vie privée », *Annales d'études européennes, Bruxelles, Bruylant*, 2000, pp. 275-318
- « L'application des techniques génétiques à la médecine contemporaine au regard de la Convention de biomédecine », *T. Gez. / Rev. Dr. Santé*, novembre-décembre 1999-2000

Voordrachten in het kader van colloquia, conferenties en seminars:

- « Tests génétiques et risque professionnel : impact sur la prévention et l'indemnisation des maladies professionnelles », présentation dans le cadre du colloque *Enjeux de la susceptibilité génétique en milieu professionnel*, SPF Politique scientifique, Bruxelles, le 30 octobre 2003
- Exposé relatif à la réglementation internationale et européenne concernant les examens génétiques prédictifs et tests VIH dans le cadre des relations de travail et le statut du consentement, Comité Consultatif de bioéthique, le 4 septembre 2001

Bijlage II: Lijst van Publicaties

- Séminaire pluridisciplinaire sur les modes de contrôle et éthique du compromis, Faculté des Sciences économiques, sociales et politiques, U.C.L. Présentation sur les tests génétiques en droit social, 14 février 2001
- Conférence sur « Les aspects juridiques des tests génétiques », 11^{ème} journée médicale, organisée par le CHR, Liège, le 2 décembre 2000
- Conférence sur les tests génétiques en médecine du travail, le 17 octobre 2000 dans le cadre du cycle de formation continue des médecins du travail organisé par l'UCL
- Participation à un groupe de travail dans le cadre de la recherche d'orientation sur la relation entre la recherche épidémiologique concernant la santé au travail et la législation récente en matière de protection de la vie privée, SSTC, Faculté de médecine de la KUL, octobre 2000- mars 2001

Organisatie van colloquia of seminars:

- Co-organisation et participation au colloque *Enjeux de la susceptibilité génétique en milieu professionnel*, SPF Politique scientifique, Bruxelles, le 30 octobre 2003
- Organisation d'un séminaire de présentation des résultats interdisciplinaire et interuniversitaire, le 6 novembre 2002, Louvain-la-Neuve

VUB

Ahsan H., Rundle A.G. (2003) Measures of genotype versus gene products: promise and pitfalls in cancer prevention. *Carcinogenesis* 24: 1429-1434.

Aka P., Mateuca R., Buchet J.-P., Thierens H., Kirsch-Volders M. hOGG1³²⁶ and XRCC1³⁹⁹ genotypes and the DNA strand break repair phenotype are predictive for genotoxic effects in workers exposed to low dose ionising radiation. *Radiation Research*, submitted.

Anard D., Kirsch-Volders M., Elhajouji A., Belpaeme K., Lison D. (1997) In vitro genotoxic effects of hard metal particles assessed by alkaline single cell gel and elution assays. *Carcinogenesis* 18(1):177-184.

De Boeck M. (2002) Genotoxic effects of hard metal dust: possible relevance for lung cancer. Proefschrift voorgelegd tot het behalen van de wettelijke graad van Doctor in de Wetenschappen.

De Boeck M., Lardau S., Buchet J.P., Kirsch-Volders M., Lison D. (2000a) sence of significant genotoxicity in lymphocytes and urine from workers exposed to moderate levels of cobalt-containing dust: a cross-sectional study. *Env. Mol. Mutagenesis* 36(2): 151-160.

De Boeck M., Touil N., De Visscher G., Vande P.A., Kirsch-Volders M. (2000b) Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mutat Res.* 469(2): 181-97.

Decordier I., Aka P., Lombaert N., Vanhauwaert A., Mateuca R., Kirsch-Volders M. Simplicity and complexity of genetic susceptibility in the occupational environment. *Archives of Public Health*, submitted.

Dypbukt J.M., Costa L.G., Manzo L., Orrenius S., Nicotera P. (1992) Cytotoxic and genotoxic effects of styrene-7,8-oxide in neuroadrenergic Pc 12 cells. *Carcinogenesis* 13:417-424.

Farah S.B. (1983) The *in vivo* effect of cobalt chloride on chromosomes. *Rev Brasil Genet VI* 3: 433-442.

Girre C., Lucas D., Hispard E., Menez C., Dally S., Menez J.F. (1994) Assessment of cytochrome P4502E1 induction in alcoholic patients by chlorzoxazone pharmacokinetics. *Biochem Pharmacol.* 47(9): 1503-8.

Godderis L., De Boeck M., Haufroid V., Emmery M., Mateuca R., Gardinal S., Kirsch-Volders M., Veulemans H., Lison D. Influence of genetic polymorphisms on biomarkers of exposure and genotoxic effects in styrene-exposed workers. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, submitted.

Goode E.L., Ulrich C.M., Potter J.D. (2002) Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:1513-1530.

Bijlage III: Bibliografische referenties

Halliwell B. and Gutteridge J.M. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, third edition.

Hartwig A. (2001) Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxidants and Redox Signaling* 3(4): 625-34.

Hartwig A., Snyder R.D., Schlepegrell R., Beyersmann D. (1991) Modulation by Co(II) of UV-induced DNA repair, mutagenesis and sister-chromatid exchanges in mammalian cells. *Mutation Research* 248(1): 177-85.

Hartwig A, Dally H, Schlepegrell R. (1996) Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicol Lett.* 88(1-3):85-90.

Haufroid V., Jakubowski M., Janasik B., Ligocka D., Buchet J.P., Bergamaschi E., Manini P., Mutti A., Ghittori S., Arand M., Hangen N., Oesch F., Hirvonen A., Lison D. (2002) Interest of genotyping and phenotyping of drug-metabolizing enzymes for the interpretation of biological monitoring of exposure to styrene. *Pharmacogenetics* 12: 691-702.

IARC (1991) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Cobalt and Cobalt Compounds, vol 52., IARC Scientific Publications, Lyon.

Kasten U., Mullenders L.H., Hartwig A. (1997) Cobalt(II) inhibits the incision and the polymerization step of nucleotide excision repair in human fibroblasts. *Mutation Research* 383(1): 81-8.

Kirsch-Volders M., Fenech M. (2001) Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis* 16:51-58.

Lison D. (1996) Human toxicity of cobalt-containing dust and experimental studies on the mechanism of interstitial lung disease (hard metal disease). *Critical Reviews in Toxicology* 26(6): 585-616.

Lison D, Lauwerys R. (1990) *In vitro* cytotoxic effects of cobalt-containing dusts on mouse peritoneal and rat alveolar macrophages. *Environmental Research* 52(2): 187-98.

Lison D., Lauwerys R. (1995) The interaction of cobalt metal with different carbides and other mineral particles on mouse peritoneal macrophages. *Toxicology in vitro* 9(3): 341-347.

Lison D., Carbonnelle P., Mollo L., Lauwerys R., Fubini B. (1995) Physicochemical mechanism of the interaction between cobalt metal and carbide particles to generate toxic activated oxygen species. *Chem Res Toxicol.* 8(4): 600-6.

Lu A.L., Li X., Gu Y., Wright P.M., Chang D.Y. (2001) Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. *Cell Biochem Biophys* 35:141-170.

Bijlage III: Bibliografische referenties

Lunn R.M., Langlois R.G., Hsieh L.L., Thompson C.L., Bell D.A. (1999) XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res.* 59(11): 2557-61.

Mateuca R., Aka P., De Boeck M., Kirsch-Volders M., Lison D. Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. In preparation.

Moulin J.J., Wild P., Romazini S., Lasfargues G., Peltier A., Bozec C., Deguerry P., Pellet F., Perdrix A. (1998) Lung cancer risk in hard-metal workers. *American Journal of Epidemiology* 148(3): 241-8.

Resende de Souza-Nazareth H. (1976) Efeito do cloreto de cobalto em nao-disjunção. *Ciencia e Cultura* 28(12): 1472-5.

Shen M.R., Jones I.M., Mohrenweiser H. (1998) Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.* 58(4): 604-8.

Shield A.J., Sanderson B.J. (2001) Role of glutathione S-transferase mu (GSTM1) in styrene-7,8-oxide toxicity and mutagenicity. *Environ Mol Mutagen* 37:285-289.

Touil N. (2001) Application of genotoxicity for chronic occupational exposure to ionising radiation. Proefschrift voorgelegd tot het behalen van de wettelijke graad van Doctor in de Wetenschappen.

Touil N., Vande Aka P., Buchet J.P., Thierens H., Kirsch-Volders M. (2002) Assessment of genotoxic effects related to chronic low level exposure to ionising radiation using biomarkers for DNA damage and repair. *Mutagenesis* 17(3):223-232.

Tuimala J., Szekely G., Gundy S., Hirvonen A., Norppa H. (2002) Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity. *Carcinogenesis* 23:1003-1008.

Van Goethem F., Lison D., Kirsch-Volders M. (1997) Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutation Research* 392(1-2): 31-43.

Wood R.D., Mitchell M., Sgouros J., Lindahl T. (2001) Human DNA repair genes. *Science* 291:1284-1289.

Wormhoudt L.W., Commandeur J.N., Vermeulen N.P. (1999) Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit Rev Toxicol.* 29(1): 59-124.

KUL

ACGIH. 2003. TLVs and BEIs; Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices. Cincinnati.

Arand M, Muhlbauer R, Hengstler J, Jager E, Fuchs J, Winkler L, Oesch F. 1996. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Anal Biochem* 236:184-186.

Blasiak J, Kowalik J. 2000. A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutat Res* 469:135-145.

Brenneman MA, Weiss AE, Nickoloff JA, Chen DJ. 2000. XRCC3 is required for efficient repair of chromosome breaks by homologous recombination. *Mutat Res* 459:89-97.

Christakopoulos A, Bergmark E, Zorcec V, Norppa H, Maki-Paakkanen J, Osterman-Golkar S. 1993. Monitoring occupational exposure to styrene from hemoglobin adducts and metabolites in blood. *Scand J Work Environ Health* 19:255-263.

De Boeck M, Lardau S, Buchet JP, Kirsch-Volders M, Lison D. 2000a. Absence of significant genotoxicity in lymphocytes and urine from workers exposed to moderate levels of cobalt-containing dust: a cross-sectional study. *Environ Mol Mutagen* 36:151-160.

De Boeck M, Lison D, Kirsch-Volders M. 1998. Evaluation of the in vitro direct and indirect genotoxic effects of cobalt compounds using the alkaline comet assay. Influence of interdonor and interexperimental variability. *Carcinogenesis* 19:2021-2029.

De Boeck M, Touil N, De Visscher G, Vande PA, Kirsch-Volders M. 2000b. Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mutat Res* 469:181-197.

Farmer PB. 1995. Monitoring of human exposure to carcinogens through DNA and protein adduct determination. *Toxicol Lett* 82-83:757-762.

Fustinoni S, Colosio C, Colombi A, Lastrucci L, Yeowell-O'Connell K, Rappaport SM. 1998. Albumin and hemoglobin adducts as biomarkers of exposure to styrene in fiberglass-reinforced-plastics workers. *Int Arch Occup Environ Health* 71:35-41.

Gambelunghe A, Piccinini R, Ambrogi M, Villarini M, Moretti M, Marchetti C, Abbritti G, Muzi G. 2003. Primary DNA damage in chrome-plating workers. *Toxicology* 188:187-195.

Goromaru T, Matsuura H, Yoshimura N. 1984. Identification and quantitative determination of fentanyl metabolites in patients by gas chromatography-mass spectrometry. *Anesthesiology*. 61: 73 - 77.

Bijlage III: Bibliografische referenties

Haufroid V, Clippe A, Knoop B, Bernard A, Lison D. 1998. Genotyping in urine: an interesting tool for epidemiological studies. *Clin Chem* 44:2210-2211.

Hu JJ, Mohrenweiser HW, Bell DA, Leadon SA, Miller MS. 2002. Symposium overview: genetic polymorphisms in DNA repair and cancer risk. *Toxicol Appl Pharmacol* 185:64-73.

Ikeda M, Koizumi A, Miyasaka M, Watanabe T. 1982. Styrene exposure and biologic monitoring in FRP boat production plants. *Int Arch Occup Environ Health* 49:325-339.

Kharasch ED, Russell M, Mautz D, Thummel KE, Kunze KL, Bowdle TA, Cox K. 1997. The role of cytochrome P450 3A4 in alfentanil clearance: Implications for interindividual variability in disposition and perioperative drug interactions. *Anesthesiology*. 87 (1): 36 - 50.

Kogevinas M, Ferro G, Andersen A, Bellander T, Biocca M, Coggon D, Gennaro V, Hutchings S, Kolstad H, Lundberg I, . 1994. Cancer mortality in a historical cohort study of workers exposed to styrene. *Scand J Work Environ Health* 20:251-261.

Kolstad HA, Lynge E, Olsen J, Breum N. 1994. Incidence of lymphohematopoietic malignancies among styrene-exposed workers of the reinforced plastics industry. *Scand J Work Environ Health* 20:272-278.

Labroo RB, Paine MF, Thummel KE, Kharasch ED, Evan D. 1997. Fentanyl metabolism by human hepatic and intestinal cytochrome P450 3A4: implications for interindividual variability in disposition, efficacy, and drug interactions. *Drug Metabolism and Disposition*. 25 (9): 1072 - 1080.

Lauwerys RR, Hoet P. 2001. *Industrial Chemical Exposure; Guidelines for Biological Monitoring*. Florida: CRC Press.

Luceri F, Fattori S, Luceri C, Zorn M, Mannaioni P, Messeri G. 2001. Gas chromatography-Mass Spectrometry of 6- β -OH-Cortisol/Cortisol ratio in human urine: a specific marker of enzymatic induction. *Clin Chem Lab Med* 39: 1234-1239.

Maki-Paakkanen J, Walles S, Osterman-Golkar S, Norppa H. 1991. Single-strand breaks, chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges, and micronuclei in blood lymphocytes of workers exposed to styrene during the production of reinforced plastics. *Environ Mol Mutagen* 17:27-31.

Marczynski B, Peel M, Baur X. 2000. New aspects in genotoxic risk assessment of styrene exposure--a working hypothesis. *Med Hypotheses* 54:619-623.

Meuldermans W, Van Peer A, Hendrickx J, Woestenborghs R, Lauwers W, Heykants J, Vanden Bussche G, Van Craeyvelt H, Van der Aa P. 1988. Alfentanil pharmacokinetics and metabolism in humans. *Anesthesiology*. 69(4): 527-534.

Mohrenweiser HW, Wilson DM, III, Jones IM. 2003. Challenges and complexities in estimating both the functional impact and the disease risk associated with the extensive genetic variation in human DNA repair genes. *Mutat Res* 526:93-125.

Mutti A. 1999. Biological monitoring in occupational and environmental toxicology. *Toxicol Lett* 108:77-89.

Bijlage III: Bibliografische referenties

Severi M, Pauwels W, Van Hummelen P, Roosels D, Kirsch-Volders M, Veulemans H. 1994. Urinary mandelic acid and hemoglobin adducts in fiberglass-reinforced plastics workers exposed to styrene. *Scand J Work Environ Health* 20:451-458.

Stanley T,H, Hague B, Mock DL. 1989. Oral transmucosal fentanyl citrate (lollipop) premedication in human volunteers. *Anesth. Analg.* 69: 21-27.

Sumner SJ, Fennell TR. 1994. Review of the metabolic fate of styrene. *Crit Rev Toxicol* 24 Suppl:S11-S33.

Tuimala J, Szekely G, Gundy S, Hirvonen A, Norppa H. 2002. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity. *Carcinogenesis* 23:1003-1008.

Valaer AK, Huber T, Andurkar SV, Clark CR, DeRuiter J. 1997. Development of a gas chromatographic-mass spectrometric drug screening method for the N-dealkylated metabolites of fentanyl, sufentanil and alfentanil. *J Chromatogr Sci* 35: 461-466.

Vodicka P, Bastlova T, Vodickova L, Peterkova K, Lambert B, Hemminki K. 1995. Biomarkers of styrene exposure in lamination workers: levels of O6-guanine DNA adducts, DNA strand breaks and mutant frequencies in the hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene in T-lymphocytes. *Carcinogenesis* 16:1473-1481.

Vodicka P, Soucek P, Tates AD, Dusinska M, Sarmanova J, Zamecnikova M, Vodickova L, Koskinen M, de Zwart FA, Natarajan AT, Hemminki K. 2001. Association between genetic polymorphisms and biomarkers in styrene-exposed workers. *Mutat Res* 482:89-103.

Vodicka P, Stetina R, Koskinen M, Soucek P, Vodickova L, Hlavac P, Kuricova M, Necasova R, Hemminki K. 2002. New aspects in the biomonitoring of occupational exposure to styrene. *Int Arch Occup Environ Health* 75 Suppl:S75-S85.

Vodicka P, Tvrdek T, Osterman-Golkar S, Vodickova L, Peterkova K, Soucek P, Sarmanova J, Farmer PB, Granath F, Lambert B, Hemminki K. 1999. An evaluation of styrene genotoxicity using several biomarkers in a 3-year follow-up study of hand-lamination workers. *Mutat Res* 445:205-224.

Willens JS, Myslinski NR. 1993. Pharmacodynamics, pharmacokinetics and clinical uses of fentanyl, sufentanil and alfentanil. *Heart & Lung*. 22(3): 239-251.

RUG (promotor L. de Ridder)

Baria K., Warren C., Roberts S.A., West C.M. & Scott D. (2001) Chromosomal radiosensitivity as a marker of predisposition to common cancers? *Br J Cancer* 84: 892-896.

Bryant P.E. (1998) The signal model: a possible explanation for the conversion of DNA double-strand breaks into chromatid breaks. *Int J Radiat Biol* 73: 243-251.

Burrill W., Barber J.B.P., Roberts S.A., Bulman B. & Scott D. (2000) Heritability of chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a pilot study with the lymphocyte micronucleus assay. *Int J Radiat Biol* 76: 1617-1619

Fenech M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 285: 35-44.

Papworth R., Slevin N., Roberts S.A. & Scott D. (2001) Sensitivity to radiation-induced chromosome damage may be a marker of genetic predisposition in young head and neck cancer patients. *Br J Cancer* 84 (6): 776-782.

Riches A.C., Bryant P.E., Steel C.M., Gleig A., Robertson A.J., Preece P.E. & Thompson A.M. (2001) Chromosomal radiosensitivity in G2-phase lymphocytes identifies breast cancer patients with distinctive tumour characteristics. *Br J Cancer* 85: 1157-1161.

Roberts S.A., Spreadborough A. R., Bulman B., Barber J.B.P., Evans D.G.R. and Scott D. (1999) Heritability of cellular radiosensitivity: a marker of low-penetrance predisposition genes in breast cancer? *Am J Hum Genet* 65: 784-794.

Scott D., Barber J.B.P., Levine E.L., Burrill W. and Roberts S.A. (1998) Radiation induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? *Brit J Cancer* 77: 614-620.

Scott D., Barber J.B.P., Spreadborough A.R., Burrill W. and Roberts S.A. (1999) Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *Int J Radiat Biol* 75: 1-10.

Terzoudi G.I., Jung T., Hain J., Vrouvas J., Margaritis K., Donta-Bakoyianni C., Makropoulos V., Angelakis P.H. and Pantelias G.E. (2000) Increased G2 chromosomal radiosensitivity in cancer patients: the role of cdk1/cyclin-B activity level in the mechanisms involved. *Int J Radiat Biol* 76: 607-615.

Vral A., Verhaegen F., Thierens H. and De Ridder L. (1994) The *in vitro* cytokinesis-block micronucleus assay: a detailed description of an improved slide preparation technique for the automated detection of micronuclei in human lymphocytes. *Mutagenesis* 9: 439-443.

Vral A., Louagie H., Thierens H., Philippe J., Cornelissen M., De Ridder L. (1998) Micronucleus frequencies in cytokinesis-blocked human B lymphocytes after low dose gamma-irradiation. *Int J Radiat Biol* 73(5): 549-555.

UCL (promotor D. Lison)

Godderis L., De Boeck M., Haufroid V., Emmery M., Mateuca R., Gardinal S., Kirsch-Volders M., Veulemans H., Lison D. (2004) Influence of genetic

Bijlage III: Bibliografische referenties

polymorphisms on biomarkers of exposure and genotoxic effects in styrene-exposed workers. (submitted)

Haufroid V., Toubreau F., Clippe A., Buyschaert M., Gala JL., Lison D. (2001) Real-time quantification of cytochrome P4502E1 (CYP2E1) mRNA in human peripheral blood lymphocytes by RT-PCR : Method and practical application. *Clin Chem* 47:1126-1129

Haufroid V., Buchet J.-P., Gardinal S. and Lison D. (2002a) Cytochrome P4502E1 phenotyping by the measurement of the chlorzoxazone metabolic ratio: evaluation of its usefulness in workers exposed to styrene. *Int Arch Occup Environ Health* 75:453-458

Haufroid V., Jakubowski M., Janasik B., Ligocka D., Buchet JP, Bergamaschi E, ManiniP, Mutti A, Ghittori S, Arand M, Hangen N, Oesch F, Hirvonen A, Lison D (2002b) Interest of genotyping and phenotyping of drug-metabolizing enzymes for the interpretation of biological monitoring of exposure to styrene. *Pharmacogenetics* 12:691-702.

Haufroid V., Ligocka D., Buyschaert M., Horsmans Y., Lison D. (2003) Cytochrome P4502E1 (CYP2E1) expression in peripheral blood lymphocytes : Evaluation in hepatitis C and diabetes. *Eur J Clin Pharmacol* 59: 29-33

Ligocka D., Lison D, Haufroid V. (2003) Contribution of CYP2E1 to N-Methyl-2-Pyrrolidone metabolism. *Arch Toxicol* 77: 261-266

Nomiyama T, Haufroid V., Buchet J-P, Miyauchi H, Tanaka S, Yamauchi T, Imamiya S, Seki Y, Omae K, Lison D (2001) Insertion polymorphism of CYP2E1 and urinary N-methylformamide after N,N-dimethylformamide exposure in Japanese workers. *Int Arch Occup Environ Health* 74(3):224-228 .

UCL (promotor P. Vielle)

Bassett-Stanford M. « Genetic Testing in Employment : Employee Protection or Threat ? », *Suffolk University Law Review*, 1981, vol. XV, p. 1194

Convention de sauvegarde des droits de l'homme et des libertés fondamentales, Rome, le 4 novembre 1950, *M.B.*, 19 août 1955

Coutrot T. *Critique de l'organisation du travail*, Paris, la découverte, 1999, p. 76

Demet F., Manette R., Delooz P., Kreit D. *Les maladies professionnelles*, Bruxelles, De Boeck, 1996, p. 25 et 54

Draper E. « Risk by choice? Knowledge and power in the Hazardous Workplace », *Contemporary Sociology*, 1984a, vol. 213, November, p. 689

Bijlage III: Bibliografische referenties

Draper E. « High-Risk Workers or High-Risk Work? Genetic Susceptibility Policies in the Hazardous Workplace », *International Journal of Sociology and social Policy*, 1986

Duraffourg J. « La relation santé-travail : une question complexe », in B. CASSOU (sous la direction de), *Les risques du travail. Pour ne pas perdre sa vie à la gagner*, Paris, la Découverte, 1985, p. 22

Epstein R.A. « The Legal Regulation of Genetic Discrimination: Old Responses to New Technology », *Boston University Law Review*, 1994, 74(1) : 1-23

Ewald F. « Génétique médicale, confidentialité et assurance », in *Ethique et génétique humaine*, 2^{ème} symposium du Conseil de l'Europe sur la bioéthique, Strasbourg, 30 novembre – 2 décembre 1993, p. 159

Gostin L. O., Hodge J.G. « Genetic Privacy And The Law : An End to Genetics Exceptionalism », *Jurimetrics*, 40 (1999), p. 23

Groupe européen d'éthique, Avis du groupe européen d'éthique des sciences et des nouvelles technologies auprès de la Commission européenne, *Aspect éthiques des tests génétiques dans le cadre du travail*, 28 juillet 2003

Lazzarini L. « What Lessons Can We Learn from the Exceptionalism debate (Finally)? », *The journal of Law, Medicine and Ethics*, vol. 29 :2, 2001, p.150

Lebeer G., Moulin M., Schmitz P., Vermiglio M. « Contribution à l'analyse des positions syndicales et patronales à l'égard des tests génétiques à l'embauche », *Médecine du travail et ergonomie*, vol. XXXIV, N°1-1997, p. 25

Lemmens T. « What About Your Genes ? Ethical, legal, and Policy Dimensions of Genetics in the Workplace », *Politics and the Life Sciences*, March 1997, p. 65.

Lemmens T., Austin L. « Les défis posés par la réglementation de l'utilisation de l'information génétique », *ISUMA*, vol. 2, n°3, Automne 2001, p. 5 (http://isuma.net/v02n03/lemmens/lemmens_f.shtml)

Lois coordonnées du 3 juin 1970 relatives à la réparation des dommages résultant des maladies professionnelles, *M. B.*, 27 août 1970

Murray T.H. « Warning: Screening Workers for Genetic Risk », *The Hastings Center Report*, February 1983, p. 6

Murray T. « Genetic secrets And future Diaries : is Genetic Information Different from Other Medical Information ? », dans M. A. Rothstein, ed. , *Genetic secrets : protecting Privacy and Confidentiality in the genetic Era*, New Haven : Yale University Press, 1997, p.71

Nelkin D., Brown M.S. *Workers at Risk : Voices from the Workplace*, Chicago, Chicago University Press , 1984

Bijlage III: Bibliografische referenties

Nelkin D. « The Social Power of genetic Information », in D. J. Kevles and L. Hood, *The Code of codes. Scientific and Social Issues in the Human Genome Project*, Cambridge, Harvard University Press, 1992, p. 189

Posner N.A. « The Ethical Significance of Free Choice: A Reply to Professor West », *Harvard Law Review* 99: 1431-1448

Rawls, J. *Théorie de la justice*, Paris, Seuil, 1997, p. 168 et sv.

Ross L.F. « Genetic Exceptionalism vs. Paradigm Shift : lessons from HIV », *The Journal of Law, Medicine & Ethics*, vol 29 :2, summer 2001, pp. 141- 148

UNESCO, Projet de déclaration internationale sur les données génétiques humaines, Conférence générale, 32^{ème} session, Paris, 2003

Viscusi W.K. *Risk by Choice : Regulating Health and Safety in th Workplace*, Cambridge, MA, Harvard University Press, 1983

Vogel L. *L'organisation de la prévention sur les lieux de travail, Un premier bilan de la mise en œuvre de la directive cadre communautaire de 1989*, Bruxelles, Bureau technique syndical européen pour la Santé et la Sécurité, 1994, p. 29

West R. « Authority, Autonomy and Choice : The Role of Consent in the Moral and politic vision of Franz Kafka and Richard Posner », *Harvard law Review*, 1985, 99 :384-428

Législation

1. DROIT INTERNATIONAL :

1.A. O.I.T. :

Convention N° 111 du 25 juin 1958 concernant la discrimination (loi 16/02/1977)

Convention N°139 du 24 juin 1974 sur le cancer professionnel – ratifiée par la Belgique (11/10/96)

Recommandation R147 du 24 juin 1974 sur le cancer professionnel

Convention C155 du 22 juin 1981 sur la sécurité et la santé des travailleurs (non ratifiée par la Belgique)

Recommandation N° 164 du 22 juin 1981 sur la sécurité et la santé des travailleurs

Convention N° 159 du 20 juin 1983 sur la réadaptation professionnelle et l'emploi des personnes handicapées

Convention C161 du 25 juin 1985 sur les services de santé au travail (non ratifiée par la Belgique).

Recommandation N° 112 du 24 juin 1959 sur les services de médecine du travail

Recommandation N° 171 du 26 juin 1985 sur les services de santé au travail

Recueil de directives pratiques sur la protection des données personnelles des travailleurs, adopté par l'OIT lors de la 267^e session en novembre 1996

1.B. UNESCO

- Déclaration universelle sur le génome humain et les droits de l'homme, adoptée lors de la Conférence générale de l'UNESCO, 29^{ème} session, 11 novembre 1997

- Projet de déclaration internationale sur les données génétiques humaines, Conférence générale, 32^{ème} session, Paris, 2003

Bijlage III: Bibliografische referenties

1.C. OMS

- Proposed interational guidelines of ethical issues in medical genetics and genetic services
- Déclaration commune adoptée par l'OMS et le BIT à l'issue de la consultation sur le sida et le lieu de travail

1.D Commission internationale de la médecine du travail

- Code international d'éthique à l'usage des professionnels de la santé du travail

2. DROIT EUROPEEN

2.A. Conseil de l'Europe

- Recommandation R 89 (2) sur la protection des données à caractère personnel utilisées à des fins d'emploi
- Recommandation 89 (14) sur les incidences éthiques de l'infection VIH dans le cadre sanitaire et social
- Recommandation 92 (3) sur le test et le dépistage génétiques à des fins médicales
- Recommandation R94 (11) sur le dépistage comme instrument de médecine préventive
- Recommandation R (97) 5 relative à la protection des données médicales
- Proposition de lignes directrices européennes – Comité d'experts sur l'utilisation des examens médicaux, Conseil de l'Europe
- Conclusions du Conseil et des ministres de la santé des Etats membres, réunis au sein du conseil le 15 décembre 1988 concernant le sida et le lieu de travail
- Convention de sauvegarde des droits de l'homme et des libertés fondamentales, adoptée le 4 novembre 1950
- Charte sociale européenne, adoptée le 18 octobre 1961
- Convention du Conseil de l'Europe pour la protection des droits de l'homme et de la dignité de l'être humain à l'égard des applications de la biologie et de la médecine ou Convention sur les droits de l'homme et la biomédecine, adoptée le 19 novembre 1996 (+ rapport explicatif) - non ratifiée par la Belgique

2.B Union européenne

- Directive 89/391/CEE du Conseil du 12 juin 1989 concernant la mise en œuvre de mesures visant à promouvoir l'amélioration de la sécurité et de la santé des travailleurs au travail, *J.O.C.E.*, n°L138 du 29 juin 1989, pp. 1-8
- Directive 90/394/CEE du Conseil du 28 juin 1990 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents cancérigènes au travail, *J.O.C.E.*, N°L196 du 26 juillet 1990, p. 1-7 modifiée par la directive 1999/38/CEE du Conseil du 29 avril 1999 modifiant pour la deuxième fois la directive 90/394/CEE concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents cancérigènes au travail, et l'étendant aux agents mutagènes, *J.O.C.E.*, n°L138 du 1 juin 1999, pp. 66-69.
- Directive 98/24/CEE du Conseil du 7 avril 1998 concernant la protection de la santé et de la sécurité des travailleurs contre les risques liés à des agents chimiques sur le lieu de travail, *J.O.C.E.*, n°L131 du 5 mai 1998, pp. 11-23.
- Directive 2000/78/CE du 27 novembre 2000 portant création d'un cadre général en faveur de l'égalité de traitement en matière d'emploi et de travail.
- Avis du groupe européen d'éthique des sciences et des nouvelles technologies auprès de la Commission européenne, *Aspect éthiques des tests génétiques dans le cadre du travail*, 28 juillet 2003

3. DROIT BELGE

1. A.R. 28 mai 2003 relatif à la surveillance de la santé des travailleurs, *M. B.*, 16 juin 2003
2. Loi du 25 février 2003 anti discrimination
3. Loi du 28 janvier 2003 relative aux examens médicaux dans le cadre des relations de travail, *M. B.*, 9 avril 2003
4. Loi du 4 août 1996 relative au bien-être des travailleurs lors de l'exécution de leur travail, *M. B.*,
5. Code sur le bien-être au travail
6. Loi du 8 décembre 1992 modifiée par la loi du 11 décembre 1998
7. AR du 3 février 2001 portant exécution de la loi du 8 décembre 1992

Bijlage III: Bibliografische referenties

8. Règlement général pour la protection du travail, approuvé par les arrêtés du régent des 11 février 1946 et 27 septembre 1947 (RGPT)
9. Conventions collectives N°38, 38 bis, 38 ter et 38 quater concernant le recrutement et la sélection de travailleurs
10. Convention collective N°9 du 9 mars 1972 coordonnant les accords nationaux et les conventions collectives de travail relatifs au Conseil d'entreprise conclu au sein du CNT
11. Convention collective de travail N° 39 du 13 décembre 1983 concernant l'information et la concertation sur les conséquences sociales de l'introduction de nouvelles technologies
12. Proposition de loi relative aux examens médicaux dans le cadre des relations de travail, *Doc. parl.*, Sén., sess. ord 1995-1996, n° 1-127/1
13. Proposition de loi relative aux examens médicaux dans le cadre des embauchages, *Doc. parl.*, Sén., sess. ord. 1998-1999, n° 1-1411/1
14. Proposition de loi relative aux examens médicaux dans le cadre des relations de travail, *Doc. parl.*, Sén., sess. extraord. 1999, n° 2-20/1

Avis et recommandation du CNT

15. Recommandation n°10 du 25 juillet 1995 dans le cadre de l'égalité de traitement des travailleurs séropositifs.
16. - Avis n°1.160 du 23 juillet 1996 concernant le recueil de directives pratiques de l'OIT sur la protection des données personnelles.

Doctrine

PARTIE I : Compréhension scientifique et sociale du rôle de la génétique dans le processus pathologique

Ouvrages

- AMSELEK P., *Science, déterminisme, éthique et liberté*, Paris, Puf, 1988 (à lire)
- ANDORNO R., *La bioéthique et la dignité de la personne*, Paris, PUF, Médecine et société, 1997, 127 p.
- ATLAN H., *La fin du « tout génétique » ? Vers de nouveaux paradigmes en biologie*, Paris, INRA, 1998, 91 p.
- ATLAN H., *Les étincelles de hasard*, Paris, seuil, 1999, 393p. (à lire)
- BUCHANAN A., BROCK D.W., DANIELS N., WILKER D., *From Chance to Choice. Genetics and Justice*, Cambridge, Cambridge University Press, 2000, 398p. (à lire)
- CAYLA O., THOMAS Y., *Du droit de ne pas naître, A propos de l'affaire Perruche*, Paris, Gallimard, 2002, pp. 170.
- CHARLESWORTH M., *Bioethics in a Liberal Society*, Cambridge, 1993 (à lire)
- DOUAY S., *Travail et génétique. De la sélection préventive à la prévention sélective ?*, Paris L'Harmattan 2003, 738
- DRAPER E., *Risky business – Genetic testing and Exclusionary practices in the Hazardous Workplace*, Cambridge, Cambridge University Press, 1991 (à lire)
- ELGER B., *Médecine prédictive et décisions procréatives et prénatales*, Chêne-Bourg (Suisse), éd. Médecine et hygiène, 1998, 112 p.
- FOX KELLER E., *Le siècle du gène*, Paris, Gallimard, 2003, 169 p.
- FRYDMAN R., *Dieu, la médecine et l'embryon*, Paris, O. Jacob, 1999, 358p.
- HENNAU-HUBLET C. et KNOPPERS B.-M. (dir.), *L'analyse génétique à des fins de preuve et les droits de l'homme, Aspects médico-scientifique, éthique et juridique*, Bruxelles, Bruylant, 1997, 509 p.
- HERMITTE M., *Travail, assurance : l'analyse du génome humain : liberté et responsabilités*, Paris, Association Descartes, 1992 (à lire)
- HOTTOIS G. et MISSA J.-N., *Nouvelle encyclopédie de bioéthique*, Bruxelles, De Boeck, 2001, pp.922
- HUBBARD R., WALD E., *Exploding the Gene Myth : how genetic information is Produced and Manipulated by Scientists, physicians, employers, insurance Companies, Educators and Law Enforcers*, Boston : Beacon Press, 1999, 225p.
- KAHN A. et ROUSSET D., *La médecine du XXI^e siècle. Des gènes et des hommes*, Paris, France Loisirs, 181 p.
- KAHN A., *Et l'Homme dans tout ça ? Plaidoyer pour un humanisme moderne*, Paris, Nil, 2000, 376 p.

Bijlage III: Bibliografische referenties

- KEMP P., RENDTORFF J., MATTSSON JOHNSEN N., *Bioethics and Biolaw. Judgement of life*, vol. 1 & Four ethical principles, vol. II, Copenhagen, 2000, 313 p., 177 p. (à lire)
- KEVLES D.J., *Au nom de l'eugénisme. Génétique et politique dans le monde anglo-saxon*, Paris, PUF, 1995 (à lire)
- KEVLES D.J., HOOD L., *The Code of Codes, Scientific and Social issues in The Human Genome Project*, Cambridge, Harvard University Press, 1992, 397 p.
- KNOPPERS B.-M., *Le génome humain : patrimoine commun de l'humanité ?*, Québec, Fides, 1999, 41 p.
- KNOPPERS B.-M., CADIET L., LABERGE C.-M., *La génétique humaine : de l'information à l'informatisation*, Litec, 1992,
- MALAUZAT M.-I., *Le droit face aux pouvoirs des données génétiques*, Presses universitaires d'Aix-Marseille, 2000, 497 p.
- MILLIEZ J., *L'euthanasie du fœtus Médecine ou eugénisme ?*, Paris, O. Jacob, 1999, p.218
- Mc GLEENAN T., WIESING U. and EWALD F., *Genetics and insurance*, Bios, 1999, 125 p.
- RUFFIÉ J., *Naissance de la médecine prédictive*, Paris, O. Jacob, 1993, 477 p.
- SOUMASTRE S. (dir.), *Droit et génie génétique. Premier bilan international et européen des réglementations et des nouvelles politiques*, Paris, Elsevier, 1994, 162 p.
- TESTART J., *Des hommes probables. De la procréation aléatoire à la reproduction normative*, Paris, Seuil, 1999, 280 p.
- TILMANS-CABIAUX C. et DUCHENE J., *Les tests génétiques aujourd'hui. Destin ou liberté ?*, Namur, presses universitaires de Namur, 2002, 220 p.
- TILMANS-CABIAUX C. et DUCHENE J., *Risquer de naître. Médecine prénatale et tests génétiques*, Namur, presses universitaires de Namur, 2002, 214 p.
- VANDELAC L., *Recoder le monde et s'échapper de l'humanité... ou démocratiser le génie génétique*, Paris, Futuribles, 2001
- *La nouvelle génétique médicale*, Bruxelles, éd. De l'Université de Bruxelles, Science, santé et société, 1998, 142 p.
- Comité Consultatif de Bioéthique, CASSIERS L., VERMEERSCH E. (éd), *Hérédité tests génétiques et Société*, Bruxelles, De Boeck & Larcier, 2001, 139 p.
- *Conférence internationale du Conseil de l'Europe sur les questions bioéthiques soulevées par l'application de la biotechnologie*, Actes, Oviedo, 16-19 mai 1999, 368 p.
- *Ethique et génétique humaine*, acte du 2^e symposium du conseil de l'Europe sur la bioéthique, Strasbourg, 30 novembre – 2 décembre 1993, 332 p.
- *Basic ethical principles in european bioethics and biolaw, Autonomy, dignity, integrity and vulnerability*, vol. 1, Partner's research, vol. II, Report to the european Commission of the BIOMED-II Project, Copenhagen, Barcelona, 2000, 426 p.372 p.
- *The troubled Helix : Social and Psychological Implication of The New Human Genetics*, Cambridge University press, 1996 (à lire)

Thèses

- ABBAS K., *La génétique humaine au miroir du droit*, lilles 2 (2001 ?).
- BABIN M., *Étude critique du risque professionnel*, Nantes, décembre 2003

Articles

Génétique et emploi

- BASSETT-STANFORD M., « Genetic testing in Employment : Employee Protection or Threat ? », *Suffolk university Law Review*, 1981, vol. 15, pp. 1187-1217 (à lire)
- BICH M.-F., « Information génétique et emploi- droit science et conscience », in *Droit de la personne « Les bio-droits »*, Actes des journées d'études strasbourgeoises de l'I.C.E.J.Sup., sous la dir. De J.-L ; BAUDOIN et S. LEBRIS, éd. Y. Blais, 1997, pp. 231-308
- DARBY A., « The individual, health hazardous Lifestyles, Diseases and Liability », *DePaul journal of Health Care Law*, (1999) 4, 787 ? ? (à lire)
- DIBIE D., « Discriminations biologiques et droit des contrats », in C. LABRUSSE-RIOU, *Le droit saisi par la biologie*, Paris, L.G.D.J., 1996, pp. 147-178.
- DRAPER E., « High-Risk Workers or High-Risk Work ? Genetic Susceptibility Policies in the Hazardous Workplace », *International Journal of Sociology and social Policy*, 1986, pp. 12-28

Bijlage III: Bibliografische referenties

- DRAPER E., « Genetic Secrets : Social Issues of Medical Screening in a Genetic Age », Hasting Center report, 1991, 22(4) : S15-18
- EPSTEIN R.A., « The legal regulation of Genetic Discrimination : Old Responses to New technology », *Boston University law review*, jan. 1994, 74(1) :1-23
- GEVERS S., « Use of Genetic data : Employment and Insurance : An International Perspective », *Bioethics*, 7(1993) : 126-134
- GOSTIN L., « Genetic discrimination : The Use of Genetically Based and Pronostic tests by Employers and Insurers », *American Journal of law and medicine*, 1991, 17, 109
- GOSTIN L.O. & HODGE J.G., « Genetic Privacy and The Law : An End to Genetics Exceptionalism », *Jurimetrics*, 1999, 40, 21-31.
- GUAY H., KNOPPERS B.-M. et PANISSET I., « La génétique dans les domaines de l'assurance et de l'emploi », *Revue du barreau*, 1992, 183, pp. 335-
- HENDRIKS A., « Genetics, Human Rights and Employment. American and European perspectives », *MedLaw* (1997) 16 :557-565
- LAPPE M., « Ethical Issues in Testing for Differential Sensitivity to Occupational Medicine », *Journal of Occupational Medicine*, November 1983, 25(11) : 797-808
- LEBEER G., MOULIN M., SCHMITZ P., VERMIGLIO M., « Contribution à l'analyse des positions syndicales et patronales à l'égard des tests génétiques à l'embauche », *Médecine du travail et ergonomie*, vol. XXXIV, N°1-1997, pp. 21-27
- LE BRIS S., « Donnes-moi ton ADN, je te dirai qui tu es...ou seras- Questionnements autour de l'utilisation de l'information génétique en Europe », *Isuma*, vol.2, n°3, automne 2001, 19 p.
- LEMMENS T., « What About Your Genes ? Ethical, Legal and Policy Dimensions of genetics in the Workplace », *Politics and Life Sciences*, 1997 16(1) : 57-75
- LEMMENS T. et AUSTIN L., « Les défis posés par la réglementation de l'utilisation de l'information génétique », *Isuma*, vol.2, n°3, automne 2001, 20 p.
- LYON-CAEN G., « Génétique et droit du travail », *R.I.D.E.*, 1993, pp. 61-74
- MILLER P.S., « Genetic Discrimination in the Workplace, Genetic Alliance », <http://www.geneticalliance.org/geneticissues/eeoc.html>
- MURRAY T.H., « Warning : Screening Workers for Genetic Risk », *The Hastings Center Report*, February 1983, pp.5-8.
- MURRAY T.H., « The Social Context of Workplace Screening », *The Hastings Center report*, October 1984, pp. 21-23.
- NATOWICZ, MARVIN R., ALPER J.S., JANE K., « Genetic Discrimination and The law », *American journal of Human Genetics*, 50(3) : 465-475, march 1992 (à lire)
- ROTHSEIN M.A., « Protecting Genetic Privacy : Why It is So Hard To Do », *Human genome News*, <http://www.ornl.gov/hgmis/publicat/hgn/v10n1/14roth.html>
- ROTHSEIN M.A., « Employee Selection Based on Susceptibility to Occupational Illness », *Michigan Law Review* 81 :1379-1496
- SCHULTE P.A., LOMAX G.P., WARD E.M., COLLIGAN M.J., « Ethical Issues in the Use of Genetic Markers in Occupational Epidemiologic research », *JOEM*, vol. 41, 8, August 1999, p. 639-646.
- STULIC M., « Genetic non discrimination, Privacy and Property Rights, *E Law – Murdoch university Electronic journal of law*, vol. 7, N°2, June 2000, 19 p.
- SWELTZ E.L., « Genetic Testing in the Workplace : An Analysis of the Legal Implications », *Forum*, 19 :23-32, 1984.
- THÉBAUD-MONY A., « Vers la sélection génétique des travailleurs ? », *Le Monde Diplomatique*, avril 1999.
- VAN DAMME K., CASTELEYN L., CHELLINI E., « General considerations : Accuracy, relevance, « Need/Necessity », and Consequences of testing Practices in Occupational Medicine », *Int. J. Occup. Environ. Health*, vol.2, N°3, jul.-sept 1996, supplement S57-S61.
- VAN DAMME K., CASTELEYN L., Pertinence et aspects socio-éthique des tests génétiques en médecine du travail
- VAN DAMME K., CASTELEYN L., COLLARD A. et VAN DEN BERGHE H., « Tests génétiques sur le lieu de travail », *Travail et Bien-être*, mars 2002, pp. 25-28.
- VOGEL L., « Le point de vue de la Confédération Européenne des Syndicats sur l'utilisation de tests génétiques dans le cadre des rapports de travail » <http://www.etuc.org/tutb>
- WERTZ D.C., « Professional Perspectives : A survey of Canadian Providers », *Health Law Journal*, 3 :59-130 (à lire)
- ZEITZ K., « Employer Genetic testing : A legitimate Screening Device or Another Method of discrimination ? », *Labor Law journal*, 1991, 230

Bijlage III: Bibliografische referenties

- « problématique éthique posée par les tests génétiques dans un contexte professionnel touchant à l'emploi », Comité d'éthique de la Fédération des maisons médicales et collectifs de santé francophones, ss la présidence de P. de LOCHT, *Santé conjugulée*, janvier 1998, n° 3, pp. 18-25
- Council on Ethical and Judicial Affairs, American Medical Association, « Use of Genetic testing by Employers », *JAMA*, October 2, 1991 – vol. 266, n°13, pp. 1827-1830

Génétique

- J.S. ALPER and J. BECKWITH, « Distinguishing Genetic From Non Genetic Medical Tests : Some Implications for Antidiscrimination Legislation », *Sci. Eng. Ethics*, 4 : 141-150
- R. BAYER, « Public Health Policy and the Aids Epidemic. N End to HIV Exceptionalism ? », *N. Engl. J. Med.*, 324 (1991) : 1500-04
- M.-H. BOULANGER et J. DHONT, « Protection de la vie privée et données génétiques : quelques considérations », *Cahiers du CRID*, N°16, pp. 163-185
- F. BOURGUIGNON et J. M. DUBY, « Médecine prédictive : nouvelles inégalités, nouvelles solidarités », *Risques*, n° 21, 1995, pp.
- C. BYK, « La déclaration universelle sur le génome humain et les droits de l'homme », *J.D.I.* 3, 1998, pp. 675-695
- J. DAVEY, « Future Imperfect : human Géenetics and Insurance », *Journal of Business Law*, 2000, pp. 587-617
- C. de SOLA, « Privacy and Genetic data. Cases of Conflict », *Law & Hum Gen rev*, 1/1994 : 173-184
- K. DIERICKS, « The belgian perspective on genetic screening », in R. CHADWICK et al., *The Ethics of genetic Screening*, Netherlands, Kluwer, 1999, pp. 43-53
- X. DIJON, « Le normal et l'absolu en génétique humaine », ..., pp. 138-144
- H. DOUCET, « Le développement de la génétique – Quelles tâches pour l'éthique ?, *Isuma*, vol.2, n°3, automne 2001, 12 p.
- B. EDELMAN, « Génétique et liberté », *Droits*-13, 1991, pp. 31-42
- R. A. EPSTEIN, « The Legal regulation of Genetic discrimination Old resonses to new technology », *Boston University Law Review*, 1994, 74(1) : 1-23 (à lire)
- H. GUAY et B.-M. KNOPPERS, « Information génétique : qualification et communication en droit québécois, *R.G.D.*, 1990, 21, 545-606
- R. GOLD, « Hope, fear, and genetics, judicial responses to biotechnology », *Judicature genes and justice. The Growing Impact of the new Genetics on the Courts*, *AJS*, november-december 1999, vol. 83(3), 10 p.
- L. O. GOSTIN, J.G. HODGE, « Genetic Privacy And The Law : An End to Genetics Exceptionalism », *Jurimetrics*, 40 (1999), p. 21-58.
- GRAEME T. L., « The most personal information of all : an appraisal of genetic privacy in the shadow of the human genome project », *International Journal of Law, Policy and the Family*, 10 (1996), 74-101
- C. LABERGE, « L'information génétique : Aspects scientifiques et médicaux », in B.-M. - KNOPPERS, L. CADDIET, C.-M. LABERGE, *La génétique humaine : de l'information à l'informatisation*, Litec, 1992, pp. 9-22
- C. LABRUSSE-RIOU, « Les implications juridiques de la génétique », *Rev. dr. publ.*, 1990, n°5, 1367-1384
- M. A. LAPPÉ, « Justice and the Limitations of Genetic Knowledge », dans T.F. MURPHY et M.A. LAPPÉ (dir.) *Justice and the Human Genome Project*, Berkeley, University of california Press, 1994, p. 156 (à lire)
- V. LAUNIS, « Genetic Discrimination », in *Genetic and Insurance*, ed. T. Mc. GLEENAN, U. WIESING & F. EWALD, Oxford, BIOS Scientific Publishers Ltd, 1999, pp. 35-47
- G. T. LAURIE, « The Most Personal infrmation of All : an Appraisal of genetic Privacy in the Shadow of The Human genome project », *International journal of Law, Policy and the Family* 10, (1996), 74-101
- Z. LAZZARINI, « What Lessons Can We learn from The Exceptionalism Debate (finally) ?, *The Journal of Law, Medicine & Ethics*, vol. 29 :2, sumer 2001, pp. 149-151
- T. LEMMENS, « Selective Justice, genetic Discrimination and Insurance : Should We Single Out Genes in Our Laws ? », *Revue de droit de Mc Gill*, vol. 45, 2000, p. 375
- T. LEMMENS, L. AUSTIN, « Les défis posés par la réglementation de l'utilisation de l'information génétique », *ISUMA*, vol. 2 N°3, 2001, 20 p.
- T. LEMMENS, L. AUSTIN, « Of Volume, depth and Speed : The challenges of Genetic Information », february 2001, 38 p.
- D. LOCHAK, « Diagnostic prénatal : le difficile passage de l'éthique au droit », in , pp.451-478

Bijlage III: Bibliografische referenties

- T. MURRAY, « Genetic secrets And future Diaries : is Genetic Information Different from Other Medical Information ? », dans M. A. ROTHSEIN, ed. , *Genetic secrets : protecting Privacy and Confidentiality in the genetic Era*, New Haven : Yale University Press, 1997, pp.60-73
- D. NELKIN, « The Social Power of genetic Information », in D. J. KEVLES and L. HOOD, *The Code of codes. Scientific and Social Issues in the Human Genome Project*, Cambridge, Harvard University Press, 1992, pp.177-190.
- B. RENAUD, « le diagnostic postnatal de prédiction », in... ..
- L.F. ROSS, « Genetic Exceptionalism vs. Paradigm Shift : lesssons from HIV », *The Journal of Law, Medicine & Ethics*, vol 29 :2, summer 2001, pp. 141- 148.
- M. A. ROTHSEIN, « Genetic Insurance and the Ethics of Genetic Counseling », *Molecular Genetic Medicine*, vol. 3, 1993, p. 169
- A. SOMMERVILLE V. ENGLISH, « Genetic Privacy : Orthodoxy or Oxymoron ? », *Journal of Medical Ethics*, 1999, 25 :144-150
- K. TAYLOR et R. MYKITIUK, « La génétique, la normalité et l'incapacité », *Isuma*, vol.2, n°3, automne 2001, 12 p.
- F. TERRÉ, « Génétique et sujet de droit »,
- M. TIBON-CORNILLOT, « Crise de la biologie, crise du droit : du code génétique à la biologisation des normes », *Droits* –18, 1993, pp. 119-134
- I. VACARIE, « Examens génétiques et médecine prédictive », *Rev. dr. sanit. soc.*, 1993, n°3, pp. 429-
- E. WAGNER, « Genotechnologie, identité personnelle et intégrité physiue., La biogénétique et les droits de l'Homme, Institut Grand-Ducal, section des sciences Morales et Politiques, 1997, pp. 1-20
- R.L.ZIMMERN, « Genetic testing : a Conceptual Exploration », *Journal of Medical Ethics* 1999, 25 : 151-156

Jurisprudence

- Norman Bloodsaw v. Lawrence, U.S. 9th Circuit Court of Appeals,

Génétique et droit au respect de la vie privée

- BLONDIAU P., « Protection de la personne et vie privée du travailleur au moment de la rupture du contrat », *Orientations*, juin/juillet 1992, p. 165-180
- BOSSU B., « Droits de l'homme et pouvoirs du chef d'entreprise : vers un nouvel équilibre », *Droit social*, 1994, p. 747.
- CLAUWAERTS H., « Le respect de la vie privée lors de la recherche d'un emploi et la sélection du personnel », *Rev. trav.*, avril-mai-juin 1997, p.13-19
- DE SCHUTTER O., « La vie privée entre droit de la personnalité et liberté », *Rev. trim. dr. h.*, 1999,
- DE SCHUTTER O., « La vidéosurveillance et le droit au respect de la vie privée », *Journal des procès*, N° 296, janvier 1996
- de TISSOT O., « La vie privée du salarié », *Droit social*, 1995, p. 224.
- DIERICKX K, *Genetische screening, gezondheid en ethiek. Een historisch, filosofisch en moraaltheologisch onderzoek naar de vooronderstellingen en mogelijkheidsvoorwaarden van een genetische screening* , Leuven, K.U.L., 1998, p. 291 et suiv.
- DRZEMCZEWSKI A., « La Convention européenne des droits de l'homme et les rapports entre particuliers », *Cah. dr. eur.*, 1980, p. 3-24
- JACQUES P., « Rol van de arbeidsgeneesheer », in B. OVERSTEYN, *Gezondheid en onderneming. Aids, alcohol, drugs en roken*, Brugge, Die Keure, 1989, p. 59
- JAMOULLE M., « La vie privée et le droit du travail », *Ann. Dr. Louv.*, 1984, p. 51
- JUVIGNY P., « La protection des travailleurs face aux nouvelles techniques d'enregistrement et d'informatique », *Rev. Int. Trav.*, vol. 114, n°3, nov.- déc. 1976, p. 275-290
- LABBE C., *Sida et assurances. Aspects médicaux, assurances de personnes, responsabilités et assurances de responsabilités*, Les dossiers du J.T., Bruxelles, Larcier, 1994, p.
- LAGASSE F., « La vie privée et le droit du travail », *Chr. D.S.*, 1997, p. 417-435.
- LAMBERT P., « La Convention européenne des droits de l'homme et la protection de la vie privée », *Privacy*, Séminaire des 26 et 27 novembre 1998- Palais d'Egmont
- GANSHOF VAN DER MEERSCH W.J., « L'ordre public et les droits de l'homme », *J.T.*, 1968, p. 658-663.
- HENDRICKX F., *Privacy en arbeidsrecht*, Brugge, Die Keure, 1999, p

Bijlage III: Bibliografische referenties

- MAINGAIN B., « Vie privée, vie familiale, vie professionnelle. Chronique d'une privatisation annoncée », in *Droit comparé des personnes et de la famille, Liber Amicorum M.-T. MEULDERS-KLEIN*, Bruxelles, Bruylant, 1998, p. 429 et suiv
- NYS H., « Recht en AIDS », *Panopticon*, 1988, p. 19
- OVERSTEIN B., « Het recht op eerbiediging van het privé-leven », *R. W.*, 1988-1989, (p. 490)
- PELES S., « L'informatique et la protection de la vie privée des travailleurs : approche juridique », *Chron. D. S.*, 1990, p.
- PIRENNE P., « Respect de la vie privée et travail sous surveillance », *Rev. trav.*, avril-mai-juin 1997, p. 3-8
- RAUWS W., *Civielrechtelijke beëindigingswijzen van de arbeidsovereenkomst : nietigheid, ontbinding en overmacht*, Kluwer, 1987, 162
- RIGAUX F., *La protection de la vie privée et des autres biens de la personnalité*, Bruxelles, Bruylant, 1990,
- RIGAUX F., *La vie privée. Une liberté parmi les autres ?*, Bruxelles, Larcier, 1992, p.
- RIVERO J., « Les libertés publiques dans l'entreprise », *Droit Social*, 1982, p
- RUSSO C., « Article 8§1 », in *La convention européenne des droits de l'homme. Commentaire article par article*, sous la direction de L.-E. PETTITI E. DECAUX et P.-H. IMBERT, Paris, Economica, 1995, p.
- SCHYVENS H., « C.A.O. Nr 38 betreffende de werving en de selectie van werknemers : een stap in de richting van een volwaardig aanwervingsrecht ? », *Chron. D. S.*, 1984, 61-81
- SUDRE F., « Les obligations positives dans la jurisprudence européenne des droits de l'homme », *Rev. trim. D. H.*, 1995, (p. 363)
- TREBILCOCK A.-M., « Le sida et le lieu de travail. Les orientations que suggèrent les normes de l'OIT », *Rev. int. trav.*, 1989, n°1, p.37
- .VANACHTER O., « Une convention collective de travail concernant le recrutement et la sélection de travailleurs », *Orientations*, janvier 1984, p. 18-19
- VAN EECKHOUTTE W., « Juridische aspecten bij aanwerving », Actes de la journée d'études « Privacy en anderen grondrechten in de onderneming. Naar een verantwoord ondernemingsbeleid », B.V.V.A. & ASSOCIARE, R.U. Gand, 26 novembre 1993, p. 25
- VANSWEEVELT T., *Le sida et le droit*, Bruxelles, 1990, n°34
- VAN VAERENBERG R., « Recrutement et sélection des travailleurs », *Orientations*, mars 1990, p. 65-70
- VELU J. et ERGEC R., *La convention européenne des droits de l'homme*, Bruxelles, Bruylant, 1990,
- VELU J., *Notes de droit public*, T.II, Presses Universitaires de Bruxelles, 1979-1980, p.863
- VELU J., *Le droit au respect de la vie privée*, Namur, Presses universitaires de Namur, 1974,p.
- VINCINEAU M., « Assurance et vie privée. Du vide légal à l'illicite », *R.B.D.I.*, 1994/2, p. 486
- VOGEL-POLSKI E., « Droit du travail comparé et sida », in *Le sida, un défi aux droits ?*, réf..., p. 708 et 709
- WARREN S. et BRANDEIS L., « The right to privacy », *4 Harvard Law Review*, (1890), 193-220

PARTIE II : La notion de risque professionnel à l'épreuve de la génétique

1- Cadre théorique

Lecture de base :

- EWALD F., *L'Etat Providence*, Paris, Grasset, 1986, 608 p.

Du même auteur :

- EWALD F., *L'accident nous attend au coin de la rue, Les accidents de la circulation, Histoire d'un problème*, Paris, la documentation française, 1982.
- EWALD F., « Responsabilité-solidarité-sécurité, La crise de la responsabilité en France à la fin du XXème siècle », *Risques* n°10, avr.-juin 1992, pp. 9-24
- EWALD F., « Génétique médicale, confidentialité et assurance », *Risques* n° 18, avr.-juin 1994, pp. 111-120

Bijlage III: Bibliografische referenties

- EWALD F., « Génétique médicale, confidentialité et assurance », *Ethique et génétique médicale, Actes du 2^{ème} symposium du Conseil de l'Europe sur la bioéthique, Strasbourg, 30 novembre – 2 décembre 1993*, Strasbourg, Les éditions du Conseil de l'Europe, 1994, pp. 155-172
- EWALD F., « L'expérience de la responsabilité », in *Qu'est-ce qu'être responsable ?*, Ouvr. Coll., Auxerre, Science humaine, Paris, mécénat seita, 1997, pp. 55-81
- EWALD F., « Génétique et assurance », *R.G.D.A.*, 1999, p. 539-555

Lectures complémentaires :

Ouvrages

- BEAUCHAMP A., *Gérer le risque, vaincre la peur*, Montréal, Bellarmin, 1996
- BERNSTEIN P.L., *Against the gods : The remarkable story of Risk*, New York, Wiley, 1998, p.
- BUCHANAN A., BROCK D.W. et al., *From Chance to Choice, Genetic and Justice*, Cambridge University Press, 2000
- CASSOU B. (sous la direction de), *Les risques du travail. Pour ne pas perdre sa vie à la gagner*, Paris, la Découverte, 1985, 640 p.
- CHIAPPORI P.-A., *Risque et assurance*, Paris, Flammarion, 1997, 122 p.
- DELMAS-MARTY M., *Pour un droit commun*, Paris, seuil, 1994, 306 p.
- DOUGLAS M. et WILDANSKY A., *Risk and Culture, an essay on the selection of technical and environmental dangers*, University of California Press, 1982.
- DAHL RENDTORFF J. and KEMP P., *Basic Ethical Principles in European Bioethics and Biolaw, vol. I, Autonomy, Dignity, Intergity and vulnerability*, Report of the European Commission of the BIOMED-II Project, 1995-1998, Center for Ethics and Law, Copenhagen, Denmark and institut Borja de Bioetica, Barcelona, Spain, 2000, 428 p.
- DUCLOS D., *La santé et le travail*, Paris, la découverte, 1984, 123p.
- DUCLOS D., *La peur et le savoir, La société face à la science, la technique et leurs dangers*, Paris, la découverte, 1989, 307p.
- DUPEYROUX J.-J., *Droit de la sécurité sociale*, Paris, Dalloz, 13^e éd., 1999, 1228 p.
- FISCHOFF B. et al., *Acceptable Risk*, Cambridge University Press, 1981
- GODARD O., Principe de précaution et responsabilité, une révision des relations entre science, décision et société, in *Qu'est-ce qu'être responsable ?*, Ouvr. Coll., Auxerre, Science humaine, Paris, mécénat seita, 1997, pp. 95-127.
- KEFER F., *Le droit pénal du travail*, Bruges, la Charte, 1997, pp.552
- LEBRETON D., *La sociologie du risque*, Paris, PUF, 1995.
- LEBRETON D., *Passions du risque*, Paris, Métailié, 1996.
- MEYER F. (Dir.), *L'évaluation des risques professionnels*, Strasbourg, Presses Universitaires de Strasbourg, 1995, 226 p.
- ROSANVALLON P., *La crise de l'Etat-providence*, Paris, seuil, 1992, 184 p.
- SUPIOT A., *Critique de droit du travail*, Paris, PUF, 1994,
- THÉBAUD-MONY A., *La reconnaissance des maladies professionnelles*, Paris, la documentation française, 1991, 284.
- VAN LANGENDONCK J., *The new Social Risks*, London, The Hague, Boston, Kluwer Law International, EISS Yearbook, 1996, 261 p.
- *Quand le travail nuit à la santé, 50 ans de sécurité sociale... Et après ?*, Vol. 5, Bruxelles, Bruylant, 1995, 155 p.

Articles

- CADET B., « L'évaluation du risque : une construction subjective ? », *Risques*, n° 39, sept. 1999, pp. 72-78
- DE GERLACHE J., « Maîtriser dangers et risque : entre proportion et précaution », communication lors de la réunion SSTC le.....
- DE KEYSER V., « Le risque acceptable », *Revue de médecine du travail*, tome XX, n°5, 1993, pp. 237-245
- DUMOULIN A., « le support économique de l'assurance ou premiers pas vers une «Economie de la sécurité » », *Bull. Ass.*, 1969, pp. 337-358
- MATTEI B., « La normalisation des accidents du travail : l'invention du risque professionnel », *Les temps modernes*, N° 354, janvier 1976, pp.

Bijlage III: Bibliografische referenties

- MURRAY T.H., « Warning : Screening Workers for Genetic Risk », *Hastings Center Report*, 1983, 13(1) : 5-8
- TUNC A., « Risques et sécurité », *J.T.*, 1972, pp. 457-461
- VAN DAMME K. et CASTELEYN L., « Ethical, Social and Scientific Problems Related to the Application of Genetic Screening and Genetic Monitoring for Workers in the Context of a European Approach to Health and Safety at Work », *La medicina del lavoro*, 1998, 89, supplément 12
- VAN DER VORST P., « Esquisse d'une théorie générale du « Risque professionnel » et du « Risque juridique » », *J.T.*, 1975, pp. 373-394

Presse :

- CASTEL R., « « Risquophiles », « risquophobes » : l'individu selon le Medef, *Le monde*, 7 juin 2001

Lectures de base en droit social

- ARNSPERGER C. et VAN PARIJS P., *Ethique économique et sociale*, Paris, la découverte et Syros, 2000, 123 p.
- BOLTANSKI L. et CHIAPELLO E., *Le nouvel esprit du capitalisme*, Paris, Gallimard, 1999, p. 843
- BOURDIEU P., *Les structures sociales de l'économie*, Paris, Seuil, 2000, p. 289
- CHLEPNER B.S., *Cent ans d'histoire sociale en Belgique*, Bruxelles, Éd. Université Libre de Bruxelles, 1972,
- CORNIL, M., *La sécurité sociale ou l'anti-responsabilité*, *JT*, 1964, pp. 181-182
- DE COSTER M., PICHAULT F., *Traité de sociologie du travail*, Bruxelles, De Boeck, 1994, 551 p.
- DENIS P., *Droit de la sécurité sociale*, Bruxelles, Larcier, 1993, 350 p.
- DUPEYROUX J.-J., *Droit de la sécurité sociale*, Paris, Dalloz, 1998 (13^{ème} édition), p. 1228
- EYMARD-DUVERNAY F., MARCHAL E., *Façons de recruter. Le jugement des compétences sur le marché du travail*, Paris, Métailié, 1997
- ESPING-ANDERSEN G., *Les trois mondes de l'Etat-Providence, Essai sur le capitalisme moderne*, Paris, PUF, 1999, p. 310
- FITOUSSI J.P., ROSANVALLON P., *Le nouvel âge des inégalités*, Paris, Seuil, 1996
- GANGUILHEM G., *Le normal et le pathologique*, Paris, 1966,
- GORZ A., *Misères du présent richesses du possible*, Paris, Galilée, 1997
- JAMOULLE M., *Le contrat de travail*, Tome I et II, Faculté de Droit et d'Economie et des Sciences sociales de Liège, 1982
- NEUVILLE J., *La condition ouvrière au XIX^{ème} siècle, Histoire du mouvement ouvrier en Belgique*, Bruxelles, Editions vie ouvrière, 1976, T. 1 (L'ouvrier objet, p. 240) et T. 2 (L'ouvrier suspect, p. 271)
- POLANYI K., *La grande transformation, Aux origines politiques et économiques de notre temps*, Paris, Gallimard, 1983, p. 419
- SAINT-JOURS M., *La faute dans le droit général de la sécurité sociale, thèse et la réparation des risques professionnels*
- ROSANVALLON P., *La crise de l'Etat-providence*, Paris, seuil, 1992, p.184
- ROSANVALLON P., *Le capitalisme utopique : histoire de l'idée de marché*, Paris, Seuil, 1999
- ROSANVALLON P., *La nouvelle question sociale : repenser l'État Providence*, Paris Seuil, 1995
- SOURNIA J. C. ? *Ces malades qu'on fabrique, la médecine gaspillée*, Paris, Seuil, 1977 (le citoyen protégé devient-il irresponsable ?)
- SUPIOT A., *Critique de droit du travail*, Paris, PUF, 1994,
- SUPIOT A., *Le travail en perspective*, Paris, Librairie générale de droit et de jurisprudence, 1998, 640 p.
- SUPIOT A., *Au-delà de l'emploi,, transformations du travail et devenir du droit du travail en Europe, Rapport pour la Commission des Communautés européennes avec la collaboration de l'Université Carlos III de Madrid*, Paris, Flammarion, 1999, 321 p.
- P. VANDERVORST (dir.), *cent ans de droit social belge*, Mélanges offerts à Louis Duchatelet, Bruxelles, Bruylant, 1988, 923 p.
- J. VAN LANGENDONCK, *The new social risks*, EISS, kluwer int., série N°1, 1997
- *Le bel avenir du contrat de travail. Appel des économistes pour sortir de la pensée unique* (ouvrage collectif), Paris, Syros, 2000, 226 p.
- « A l'enseigne du droit social belge », *Revue de l'Université de Bruxelles*, sous la direction de P. Van Der Vorst, Edition de l'Université de Bruxelles, 1978/1-3

Bijlage III: Bibliografische referenties

Lectures complémentaires droit social

- LUSSATO A., *Les tests de recrutement*, Que sais-je ?, PUF, 1998, p.

1. Le risque professionnel dans le secteur des maladies professionnelles

- CAVIGNEAUX A., AUTISSIER R., PORCHER B., *La réparation des accidents et des maladies professionnelles*, Paris, Masson, 1982
- CHARLES P., *Les particularités du régime de réparation des maladies professionnelles*, LLN ? UCL, 1974
- DE BROUWER C., *La médecine dans l'entreprise*, Bruxelles, de Boeck, 1997, 332 p.
- DELOZ P. et MANETTE P., *Les maladies professionnelles du secteur privé*, Chroniques de droit à l'usage du Palais, tome IV, Risque professionnel-Droit social et fiscal, 1989, Bruxelles, Story-Scientia, pp 1-117
- DEMET F., MANETTE R., DELOOZ P. et KREIT D., *Les maladies professionnelles*, Bruxelles, De Boeck et Larcier, 1996, 324 p.
- DESOILLE H., *Médecine du travail et maladies professionnelles*, Paris, Flammarion, 1957
- HAGUENOER J.-M., FRIMAT P., BONNETERRE J., VENNIN P., *Les cancers professionnels*, Paris, Lavoisier, 1982
- SOCHJER-ROUSSELLE M., *Droit de la sécurité et de la santé de l'homme au travail*, Bruxelles, Bruylant, collection droit social, 1979, 439 p.
- THÉBAUD-MONY A., *La reconnaissance des maladies professionnelles*, Paris, la documentation française, 1991, 284
- *Quand le travail nuit à la santé, 50 ans de sécurité sociale... Et après ?*, Vol. 5, Bruxelles, Bruylant, 1995, 155 p.

Encyclopédies

- *Encyclopédie médico-chirurgicale*, 2 tomes, Intoxications, Paris, Ed. Techniques
- *Encyclopédie de médecine, d'hygiène et de sécurité du travail*, 2 tomes, Genève, Bureau international du travail, 1974

Articles

- BETEMP J.-M., « L'amélioration de la réparation des accidents du travail et des maladies professionnelles », *Droit soc.*, 1993, pp. 129-133
- BOLLAND M., « Lésions corporelles, accidents de travail et ordre public », *R.G.A.R.*, 1994, 12311, 1-3
- BOLLAND M., « Etat antérieur et accidents du travail », *R.G.A.R.*, 1993, 12113 -
- COLIN D. et DELFOSSE V., « Le champs d'application rationae materiae de la loi du 10 avril 1971 », *Chronique de droit à l'usage du palais*, t. VI, Risque professionnel – Droit social et fiscal, C.U.P., Story-Scientia, 1989, p. 1-25
- DAL A., « Les maladies professionnelles dans le secteur public », *R.G.A.R.*, 1994, p. 12326, 1-14
- DE BRUCQ D., « maladie professionnelle hors liste, condition de causalité, arrêt de la Cour de cassation, 2 février 1998, FMP c/ V », *R.B.S.S.*, 1999, p. 573-588
- DE BRUCQ D., « Une vaste enquête : Les maladies professionnelles en Europe, Déclaration, reconnaissance et indemnisation », *R.B.S.S.*,
- DELVAUX P.-H., Les immunités civiles créées par la loi sur les accidents du travail en liaison avec l'article 18 de la loi du 3 juillet 1978 et les principes régissant le cumul des responsabilités », *R.G.A.R.*, 1984, n° 10812, 1-9
- ELST R., « Beschouwingen bij de nieuwe ziekenfondswet », *R.D.S.*, 1990, p. 321-330
- F.M.P., « Le système ouvert », *R.B.S.S.*, p. 435-440
- HIRSCH J.L., « Récentes modifications législatives en matière d'accidents du travail et de maladies professionnelles », *R.G.A.R.*, 1997, p. 12708, 1-2
- JANVIER R., « Aspects juridiques de 'causalité' et d'imputabilité' dans le cadre de l'expertise médico-légale », *R.B.S.S.*, 1990, p. 3-37
- LAHAYE D., « Strategie van de beroepziekteverzekering in belgie ten opzichte van de uitbreiding van het beroepziektebegrip », *Tijdschrift voor verzekeringskenneskunde*, 1992 (30), 7-9(à lire)

Bijlage III: Bibliografische referenties

- LIETAERT B. « Is de immuniteit van de arbeidsongevallenwet en de beroepsziektenwet aan eenieder tegenwerpelijk », *Rev. dr. soc.*, 1996, 2, pp. 143-185
- MATHIEU R., « Le cumul des indemnités accidents du travail avec d'autres prestations sociales ou une réparation de droit commun », *R.B.S.S.*, 1982, p. 163-199
- MORGENTHAL L., « Quelques aspects de l'influence de la crise sur le droit du travail et sur la déregularisation de la sécurité sociale sensu lato », *J.T.T.*, 1985, p. 141-148
- PAROTTE D., « La définition du préjudice réparé et le jeu de la responsabilité civile dans la loi sur les accidents du travail », *Chr. D. S.*, 1983, p. 477-490
- SAINT-JOURS Y., Les cancers professionnels : identification, réparation, prévention, *Dr. Soc.*, mai 1995, n°5, p. 520
- SAKABE H., « Quelques réflexions sur les limites d'exposition à des substances dangereuses en suspension dans l'air », *Rev. Int. Trav.*, vol. 117, n°5, sept-oct. 1978, p. 601-613
- SEILLAN H., « Réflexions sur la signification et la portée juridique des valeurs limites en matière de santé dans le travail », *Dalloz Sirey*, 1990, p. 38-42
- SIMOENS D., « Herscholing na ziekte of ongeval », *J.T.T.*, 1983, p. 17-22
- SOCHJER-ROUSSELLE M., « La responsabilité civile limitée en matière de maladies professionnelles », in *Accidents du travail et maladies professionnelles*, Bruxelles, Larcier, coll. Les Nouvelles, t. IV, 1975, pp. 736-755
- VANDEWEERT M., « Le 'système ouvert' dans l'assurance contre les maladies professionnelles », *R.B.S.S.*, 1994, p. 1015-1030
- VANDEWEERT M., « Nécessité de fixer des critères d'exposition pour l'application de la loi sur les maladies professionnelles », *R.B.S.S.*, 1989, p. 271-282
- VANDEWEERT M., « Medische en juridische causaliteit » in D. LAHAYE, *Sociale zekerheid in beweging*, Liber Amicorum J. VIAENE en R. VANDEN DRIESSCHE, Antwerpen, Maklu, 1993, pp. 307-329
- VANDEWEERT M., « Beroepziekten : begripsvorming en rechtspraak », *Rev. dr. soc.*, 1996, N° spécial, pp. 575-622
- VANDEWEERT M., « La causalité dans l'assurance contre les maladies professionnelles », *Rev. dr. soc.*, 1995, n°4, pp ; 419-448
- VAN REGENMORTEL A., « Actuele knelpunten bij de uitoefening van de arbeidsgeneeskunde », in M. Rigaux, *Actuele problemen van het arbeidsrecht*, Antwerpen, Maklu, 1993, pp. 183-
- VIAENE J. et D. LAHAYE, « medische en juridische causaliteit. De betekenis van de door de wetgever 'erkende' beroepziekte », *R.W.*, 1975, p. 479-488
- VIAENE J., « Le problème de l'octroi des soins de santé pour des raisons préventives en matière d'assurance maladies professionnelles », , p. 215-216
- VIAENE J., « L'assurance contre les maladies professionnelles en mutation », *R.B.S.S.*, 1994, p. 223-246
- WESTRADE M., « Inédits de droit de la sécurité sociale, II, Maladies professionnelles », *J.L.M.B.*, 1987, p. 595-605, 941-944, 1321- 1329

Le risque professionnel dans le secteur de la prévention
--

Ouvrages

- ABECASSIS P., ALBOUY J., BROM M., CREN S., EHSTER J. M., SANDRET N., TRAVERSE G., « *L'aptitude médicale* » en question. *Réflexion d'un groupe de travail de l'Inspection médicale du travail et de la Main-d'œuvre*. Direction régionale du travail, de l'emploi et de la formation professionnelle d'Île-de-France , 2002
- ABEL G. et LAGASSE P., *Code industriel belge*, Bruxelles, Bruylant, 1926 ? ? ?, 2 tomes, 636 p. et 654 p.
- ANTONA - J.-P. et BRUNOIS R., *Hygiène et sécurité dans l'entreprise, préventions et sanctions*, Paris, Dalloz, 1991, 355 p.
- CASSOU B. (sous la direction de), *Les risques du travail. Pour ne pas perdre sa vie à la gagner*, Paris, la Découverte, 1985, 640 p.
- DUCLOS D., *La santé et le travail*, Paris, la découverte, 1984, 123p.
- HAIDANT P., *Précis de législation industrielle et sociale*, 2^{ème} édition, Bruxelles, 1939, 347 p.
- JUFFÉ M., *A corps perdu. L'accident du travail existe-t-il ?*, Paris, 1980
- KÉRAVEL P., BEAUMONT F., *Les droits des travailleurs à la santé*, Éd. Ourières, 2 vol., 1980

Bijlage III: Bibliografische referenties

- LAZAR P., *Pathologies industrielles : approche épidémiologique*, Paris, Flammarion Médecine, 1979.
- LE RICOUSSE G., *L'établissement des valeurs limites d'exposition aux substances toxiques dans les atmosphères de travail : un tournant dans la prévention des maladies professionnelles*, Paris, INRS, 1985, 50 p.
- LEVENSTEIN C., WOODING J., *Work, Health and Environment. Old Problems, New Solutions*, New York : The Guilford Press, 1997
- NELKIN D. & BROWN M. S., *Workers at Risk. Voices From the Workplace*, Chicago, The University of Chicago Press, 1984, 220 p.
- OUDIZ A., LE GALÈS C., *Prévention des cancers professionnels*, Paris, Inserm, 1989, 295 p.
- OVERSTEYNS B., *Gezondheid en onderneming*, Brugge, Die Keure, 1989,
- SCHERRER J., *Précis de physiologie du travail*, Paris, Masson, 1981.
- SOCHJER-ROUSSELLE M., *Droit de la sécurité et de la santé de l'homme au travail*, Bruxelles, Bruylant, Collection droit social, 1979, 439 p.
- SUPIOT A., *Critique du droit du travail*, Paris, PUF, Les voies du droit, 1994, 280 p.
- THÉBAUD-MONY A., *L'industrie nucléaire. Sous-traitance et servitude*, Paris, Inserm, 2000 272p.
- VELGE H., *Éléments de droit industriel belge*, Bruxelles, librairie A. Dewit, 1927, 2 tomes, 368 p. et 431 p.
- VERKINDT P. Y., FRIMAT P., ELOY E. et CUVELIER R., *Aptitude physique et contrat de travail*, Paris, Liaisons, 1990, 219p.
- VILLAGGI J.-P., *La protection des travailleurs, L'obligation générale de l'employeur*, Cowansville, Les éditions Y. Blais, 1996, 475 p.
- VISCUSI, W.K., *Risk by choice : regulating Health and Safety in the Workplace*, Cambridge, MA : Harvard University Press, 1983
- VOGEL L., *L'organisation de la prévention sur les lieux de travail, Un premier bilan de la mise en œuvre de la directive cadre communautaire de 1989*, Bruxelles, Bureau technique syndical européen pour la Santé et la Sécurité, 1994, 425p.

Articles :

- BAYER R., « Women, Work and Reproductive Hazards », *Hastings Center Report*, 1982, vol. 12, N°5, October, pp. 14-19
- BERLINGUER G., FALZI G., « Ethical Problems in the Relationship between Health and Work », *Int. J. Health Services*, 1996, 26 :147-171
- BERRA D., « L'incapacité médicale du salarié et le contrat de travail », *Sem. Soc. Lamy*, 1985, n° 274, D3
- BLEUS P., « La loi du 4 août 1996 : réforme du droit de la sécurité au travail », *Orientations*, janvier 1997, pp. 1-12
- BLEUS P., « Les entreprises et la sécurité des intérimaires », *Orientations*, février 1998, pp. 36-48
- CHAUMETTE P., « Le médecin du travail, l'employeur et l'inspecteur du travail », *D. Soc.*, 1983, pp.
- CHU P., « Les conceptions modernes du bien-être dans la vie professionnelle », *Rev. Int. Trav.*, vol. 135 (1996), n°3-4, pp. 407-418
- COMBETTE J.-M., « L'état des lieux : le domaine de l'hygiène et de la sécurité du travail », *Rev. sc. crim.*, 1992, pp. 503-504
- DASSA S., « Travail salarié et santé des travailleurs », *Sociologie du travail*, N° spécial sur le corps du pauvre, 1976, n° 4, pp. 394-410
- DE BERNIS G., « Prévenir : du jugement sur l'organisation sociale à l'alternative politique », in *Prévenir*, 1981, n° 3
- DE COCK E., LAMOTTE J.-M., PONNET G., VAN DE LAER M., VAN HAMME L., « Dispositions spécifiques relatives à des circonstances particulières », *Rev. Trav.*, juil.-août-sept. 1997, pp. 24-26
- DE COCK E., PONNET G., « L'analyse des risques et la réglementation », *Rev. Trav.*, juil.-août-sept., 1995, n°19, pp. 34-40
- DEGRE S., « Physiologie du travail d'hier et d'aujourd'hui », in *Cent ans de droit social belge*, Bruxelles, Bruylant, Droit social, 1988, pp. 657-662
- DELAMOTTE Y., « Les pouvoirs publics et la qualité de vie de travail, Quelques voies suivies en Europe occidentale », *Rev. Int. Trav.*, vol. 114, n° 2, sept.-oct. 1976, pp. 153-170
- DESSORS D., SCHRAM J., VOLKOFFS S., « Du « handicap de situation » à la sélection exclusion. Une étude des conditions de travail antérieures aux licenciements économiques », *Travail et emploi*, n° 48, 1991, pp.
- DRAPER E., « Risk by Choice ? Knowledge Power in The Hazardous Workplace », *Contemporary Sociology*, 1984a, vol. 213, November

Bijlage III: Bibliografische referenties

- DURAND C. , « La carence fautive de l'État en matière de la protection de la santé au travail. De l'enrichissement mutuel du droit du travail et des principes de prévention et de précaution », *RD sanit. soc.* 38 (1), janv.-mars 2002, pp. 1-19
- HESELMANS M., « Les nouvelles orientations et les alternatives en matière de services de prévention, » *Rev. Trav.*, juil.-août-sept., 1994, n°15, pp. 45-47
- HESELMANS M., « La politique de prévention dans une perspective européenne, » *Rev. Trav.*, juil.-août-sept., 1995, n°19, pp. 27-33
- JAVILLIER J.-C., « Le statut des médecins du travail », *Dr. soc.*, 1980, S40
- LAMOTTE J.-M., « La santé des travailleurs : une dimension sociale européenne », *Rev. Trav.*, juil.-août-sept., 1991, n°3, pp. 30-34
- LAMOTTE J.-M. et VAN EMELLEN J., « La prévention, essence de la médecine du travail », *Rev. Trav.*, juil.-août-sept., 1994, n°15, pp. 33-44
- LENAERTS H.-F., « La loi du 4 août 1996 : le comité pour la prévention et la protection au travail », *Orientations*, 1997, pp. 13-17
- LYON-CAEN A., « Les répercussions des orientations des médecins du travail », *Dr. Soc.*, 1980, N° spéc., la médecine du travail, pp.
- OLIVIER Y., « Les directives européennes et la médecine du travail, *Rev. Trav.*, juil.-août-sept., 1991, n°3, pp. 35-39
- PONNET L., « La portée de la loi sur le bien-être », *Rev. Trav.*, juil.-août-sept. 1997, pp. 8-14
- KRYNEN B., « Le droit des conditions de travail. Droit des travailleurs à la santé et à la sécurité », *D. Soc.*, 1980, p. 523
- PONNET L., VAN DE LAER M., VAN HAMME L., « Les organes de prévention et de protection », *Rev. Trav.*, juil.-août-sept. 1997, pp. 15-23
- PONNET L., « Travaux avec des tiers », *Rev. Trav.*, juil.-août-sept. 1997, pp.27-32
- SAKABE H., « Quelques réflexions sur les limites d'exposition à des substances dangereuses en suspension dans l'air », *Rev. Int. Trav.*, vol. 117, n° 5, sept. – oct. 1978, pp. 601-613
- SAVATIER J., « le médecin du travail et le sort du salarié », *Dr. Soc.*, 1987, pp. 604-612
- SCHEPERS J., « Welzijnrecht : een nieuwe tak van het sociaalrecht », *Rev. dr. soc.*, 1994, n°3, pp. 253-291
- SEILLAN H., « Réflexions sur la signification et la portée juridique des valeurs limites en matière de santé dans le travail », *D.*, 1990, chron., VIII, pp. 38-42
- SHORT J. F. Jr, « The Social Fabric at Risk : Toward the Social Transformation of Risk Analysis », *American Sociological Review*, 1984, vol. 49, december, pp. 711-725
- SOCHJER-ROUSSELLE M., « Prévention et réadaptation », in *Accidents du travail et maladies professionnelles*, Bruxelles, Larcier, coll. Les Nouvelles, t. IV, 1975, pp. 771-800
- SOCHJER-ROUSSELLE M., « La médecine du travail après dix années d'institutionnalisation », *J.T.T.*, 1978, pp. 97-100 et 117-125
- VANDELAC L., BARALDI R., BACON M.-H., « Quand l'État confie la protection de la santé aux entreprises », *Éthique publique – Revue internationale d'éthique sociétale et gouvernementale*, La vérité en politique, L'avenir des services publics, vol. 1, N°1, Montréal, Editions Liber, INRS, 1999, pp ; 102-115
- VAN EMELLEN J., LAMOTTE J.-M., « L'analyse des risques, nouveau pilier de la politique de prévention », *Rev. Trav.*, juil.-août-sept., 1995, n°19, pp. 8-21
- VAN VAERENBERG R., « Recrutement et sélection des travailleurs », *Orientations*, 1990, pp. 65-70
- WERNEKE D., BROADFIELD R., « Une politique de la main-d'œuvre orientée vers la satisfaction des besoins dans les pays avancés à économie de marché », *Rev. Int. Trav.*, vol. 116, n° 2, sept.-oct. 1977, pp. 189-201

Bibliographie électronique :

- Une introduction au risque cancérogène en milieu professionnel, <http://www.inrs.fr :dossiers/riscanmut.htm>

Revues, brochures :

- Commissariat général à la promotion du travail, Administration de l'hygiène et de la médecine du travail, *Valeurs limites d'exposition*, Ministère de l'emploi et du travail, 52 p.
- Ministère de l'emploi et du travail, Commentaire de la loi du 4 août 1996 sur le bien-être au travail

Chapitre III Liens entre les régimes de prévention et de réparation

- CHAUMETTE P. « L'activation du lien réparation-prévention », *D. Soc.*, N°9/10, 1990, pp. 727-728

Divers

- CASSOU B. et SCHIFF M., *Qui décide de notre santé ? le citoyen face aux experts*, Paris, Syos, 1998, 266 p.
- CRESPIAN R. et LASCOUMES P., « Régulation de la carrière d'un instrument de santé. Le parcours de l'usage du test VIH dans l'emploi en France et aux Etats-Unis », *Sociologie du travail*, 2000, 42, pp. 133-157
- FAIGMAN'S D.L., *Insecurity With Science. Legal Alchemy : The Use and The Misuse of Science in the Law*, W.H. Freeman and Cy Publisherss, 1999, 256 p.
- MEULDERS-KLEIN M.-T. et MAINGAIN B., « Le droit de disposer de soi-même » in *Licéité en droit positif et références légales aux valeurs*, Dixième journées juridiques Jean Dabin organisée par l'Unité de Droit pénal, Bruylant, Bruxelles, 1982, pp.14 et s.
- PETRELLA R., *Le bien commun : éloge de la solidarité*, Bruxelles, Labor, 1996
- THUILLIER P., *Les passions du savoir : essai sur les dimensions culturelles de la science*, Paris, fayard, 1988
- VACQUIN M., *Main basse sur les vivants*, paris, Fayard, 1999, 276 p.
- VANNES V., « La relation de travail et le sida », in *Le sida, un défi aux droits*, Bruxelles, Bruylant, 1991, pp. 331-
- WILKIE A. D., « Mutuality and Solidarity : Assessing Risks and Sharing Losses », *Br. Actuarial J.*, 1997, 3 : 986

Rapports, avis,...

17. The Nuffield Trust Genetics Scenario Project, genetics and health, <http://www.official-documents.co.uk/document/nuffield/policyf/gen-ak.htm#gen0>
18. *Symposium Les cancers d'origine professionnelle*, Fédération Belge contre le Cancer, Bruxelles, le 12 juin 2002
19. *Journée d'études Enjeux de la susceptibilité génétique en milieu professionnel*, SPF Politique scientifique, Bruxelles, le 30 octobre 2003
20. Le bien-être des travailleurs lors de l'exécution de leur travail. Commentaire juridique de la loi du 4 août 1996, Ministère de l'emploi et du travail

Presse

Le Soir, 3 février 2003, A. KAHN, « Le clonage thérapeutique est illusoire ».

JURISPRUDENCE

VIE PRIVÉE

- Cour eur. D. H., arrêt *Sunday Times* du 26 avril 1979, Série A, n°30,
- Cour eur. D.H., arrêt *Airey* du 9 octobre 1979, Série A, n° 32, p. 17
- Cour eur. D. H., arrêt *Dudgeon c. Royaume-Uni* du 22 octobre 1981, Série A, n° 45
- Cour eur. D.H., arrêt *X. et Y. c. Pays-Bas* du 26 mars 1985, Série A, n° 91, p. 11
- Cour eur. D.H., arrêt *Olsson c. Suède* du 24 mars 1988, Série A, n° 130, p. 31-32
- Cour eur. D. H., arrêt *Niemitz c. Allemagne* du 16 décembre 1992, *Rev. trim. D. H.*, 1993, p. 468
- Cour eur. D. H., arrêt *C. c. Belgique* du 7 août 1996
- Cour eur. D.H., arrêt *Laskey, Jaggard et Brown c. Royaume-Uni* du 19 février 1997, *Rev. trim. D. H.*, 1997, p. 733-745, note M. LEVINET
- Cour eur. D.H., arrêt *Guerra et autres c. Italie* du 19 février 1998, *Rev. trim D. H.*, 1998, p. 808-833, note P. FRUMER.

Bijlage III: Bibliografische referenties

- Cass., 26 septembre 1978, *Arr. Cass.*, 1978-1979, 116, *Pas.*, 1979, I, 126
Cass., 23 juin 1980, *Pas.*, 1980, I, 1303
Cass. 10 mai 1985, *Arr. Cass.*, 1984-1985, 1230 Concl. Av. Gén. TILLEKAERTS, *J.T.*, 1986, p. 75
Cour eur. D. H., arrêt *Niemitz c. Allemagne* du 16 décembre 1992, Série A, n° 251-B, par. 29
Cour Eur. D. H., affaire *Peters c. Pays-Bas* du 6 avril 1994, Req. N°21132/93, *D.R.*, vol. 77-A, p. 75 ;
Cour Eur. D. H., affaire *A.B. c. Suisse* du 22 février 1995, Req. N° 20872/92, *D.R.*, vol. 80-A, p. 66 ;
Cour Eur. D. H., affaire *J.R., G.R. et Y.R. c. Suisse* du 5 avril 1995, Req. N° 22398/93, *D.R.*, vol. 81-A, p. 61 ;
Cour Eur. D. H., affaire *G. Jehl-Doberer c. Suisse* du 1^{er} septembre 1993, Req. N° 17667/91.
Comm. D. H., 10 avril 1961, Req. N° 911/60, *Ann. Conv.*, IV, p. 199 ;
Comm. Eur. D. H., 16 janvier 1963, Req. N° 1449/62, *Ann. Conv.* VI, p. 263 ;
Comm. Eur. D. H., 23 mai 1966, Req. N° 2916/65, *Ann. Conv.* IX, p. 437 ;
Comm. Eur. D. H., 6 février 1968, Req. N° 2822/66, *Rec.* N° 26, p. 42.
C. J. C. E., 5 octobre 1994, *X. c. Commission*, C-404-92-P, note O. DE SCHUTTER, « Les examens médicaux à l'embauche de la Commission européenne », *Rev. trim. D. H.*, 1995, p. 101-122 ; également sur le droit de ne pas savoir ;.
Cass. 21 décembre 1962, *Pas.*, 1962, I, 499
Cass. 27 mai 1971, *Pas.*, 1971, I, p. 886
Cass. 4 avril 1977, *J.T.*, 1977, p. 554, *Pas.*, 1977, I, p. 831
Cass., 26 septembre 1978, *Pas.*, 1979, I, p. 126.
Cass., 28 février 1979, *Pas.*, 1979, I, 774
Cass., 9 mars 1987, *J.T.T.*, 1987, p. 128 ; *Chron. Dr. Soc.*, 1987, 210.
Cass. 23 janvier 1991, *Pas.*, 1991, I, 491
Cass., 1^{er} octobre 1997, *J.L.M.B.*, 1998, p. 796, note C. MEUNIER.
C. trav. Anvers, 14 janvier 1981, *J.T.T.*, 229 a jugé que le fait de taire ses études universitaires et quelques employeurs précédents était constitutif de motif grave, *contra* :
Trib. Trav. Gand, 18 mai 1981, *R.W.*, 1981-1982, 1426, *J.T.T.*, 1981, 300 a jugé que le fait de taire son état de grossesse bien que fautif n'est pas constitutif de motif grave ; sur l'état de santé
C. trav. Anvers, 4 juin 1981, *J.T.T.*, 1981, 297, *R.W.*, 1981-1982, 1414, *Jura Falconis*, 1981-1982, 283.
Cass., 8 septembre 1982, *Pas.*, 1983, I, p. 43
C. trav. Liège, 17 mai 1985, *J.T.T.*, 1985, p. 472
Liège, 22 septembre 1988, *Pas.*, 1989, II, 47
C. trav. Bruxelles, 26 mars 1990, *Chron. D. S.*, 1992, 154
Trib. Trav. Bruxelles, 24 juin 1991, *Chron. D.S.*, 1995, 225
Trib. Trav. Bruxelles, 23 mars 1992, *R.W.*, 1992-1993, 652 qui reconnaît un droit au mensonge au candidat pour des questions non pertinentes lors de la procédure de recrutement.
Trib. Trav. Charleroi, 19 avril 1993, *Chron. D.S.*, 1994, 372
Trib. Trav. Gand, 21 avril 1993, *R.W.*, 1993-1994, 92.
C. trav. Mons, 16 mars 1995, *J.T.T.*, 1996, 147
Trib. Trav. Bruges, 14 mars 1996, *Chron. D.S.*, 1997, 26, note P. HUMBLET ;
Gand, 20 mars 1996, *R.W.*, 1996-1997, p. 1257, note P. LEMMENS, *T. Gez. / Rev. dr. santé.*, 1996-1997, p. 35
C. trav. Bruxelles, (4^{ème} ch.), 5 novembre 1997, *J.T.T.*, 1998, 18.
Cass., 6 mars 1986, *Arr. Cass.*, 1985-1986, 937



D/2004/1191/13

Publié par la Politique scientifique fédérale
Uitgegeven door het Federaal Wetenschapsbeleid

Pour de plus amples informations:
Voor meer informatie:

Madame E. Bourgeois
Politique Scientifique Fédérale – Federaal Wetenschapsbeleid
rue de la science 8 Wetenschapstraat
Bruxelles 1000 Brussel
Tel.: + 32-2-238.34.94
Fax.: + 32-2-230.59.12
E-mail: boug@belspo.be
Internet: <http://www.belspo.be>

LEGAL NOTICE

La Politique Scientifique fédérale ainsi que toute personne agissant en son nom ne peuvent être tenues pour responsables de l'éventuelle utilisation qui serait faite des informations qui suivent.

Cette publication ne peut ni être reproduite, même partiellement, ni stockée dans un système de récupération ni transmise sous aucune forme ou par aucun moyens électronique, mécanique, photocopies, enregistrements ou autres sans y avoir indiqué la référence.

Noch het Federaal Wetenschapsbeleid, noch eenieder die handelt in de naam van het Federaal Wetenschapsbeleid is verantwoordelijk voor het gebruik dat van de volgende informatie zou worden gemaakt.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een gegevensbestand of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën of enige andere manier zonder de aanduiding van de referentie.