

GENOMSKA NESTABILNOST I TEST OSJETLJIVOSTI NA BLEOMICIN

Mirta MILIĆ

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska

Primljeno u kolovozu 2009.

Prihvaćeno u ožujku 2010.

Procjena individualne osjetljivosti na mutagene često je dio istraživanja u epidemiološkim studijama koje prate pojavnost zloćudnih bolesti u populacijama. Posljedica djelovanja mutagena u genomu izloženih osoba jest nastanak određene, manje ili veće, količine oštećenja, uvjetovane individualnim razlikama u osjetljivosti. Viša razina takve genomske nestabilnosti znači opasnost (rizik) od razvoja zloćudnih bolesti. Interindividualne razlike u odgovoru na mutagene obično se povezuju i s promijenjenom (većinom smanjenom) sposobnosti (kapacitetom) za popravak DNA. Citogenetičke studije su pokazale da je genom tumorskih stanica nestabilniji od normalnih, a time i skloniji akumuliranju oštećenja, bilo da je nestabilnost uzrokovana nasljeđem, izloženošću ili kombinacijom tih dvaju učinaka. U oboljelih ispitanika utvrđena je povećana učestalost kromatidnih i kromosomskih aberacija naspram normalne populacije te sklonost razvoju određenih vrsta neoplazija. U praćenju povezanosti promijenjenog odgovora i pojavnosti tumora služe nam različiti biomarkeri. Kao indirektni pokazatelji uspješnosti popravka DNA često se rabe testovi osjetljivosti na mutagene u kulturama limfocita periferne krvi. Jedan od takvih testova je i bleomicinski test. Radiomimetik i citostatik, a po strukturi glikopeptid, bleomicin se u stanici prevodi u aktivni oblik sposoban cijepati molekulu DNA što uzrokuje brojne jednolančane i dvolančane lomove. Kao jednostavna i jeftina metoda, zasniva se na utvrđivanju ukupnog broja jednolančanih lomova u kromosomima limfocita uzgajanih u staničnoj kulturi koji su u uvjetima *in vitro* tijekom kasne G₂-faze staničnog ciklusa bili izloženi bleomicinu. Ovaj revijalni rad daje pregled utjecaja raznih faktora na rezultate samog testa i pokazuje njegovu široku primjenu u proučavanju genomske nestabilnosti koju najčešće uzrokuje kombinacija raznih faktora.

KLJUČNE RIJEČI: *DNA-popravak, jednolančani lomovi, kromatidni lomovi, polimorfizam, translokacije, tumorske stanice*

Bleomicin-test

Procjena individualne osjetljivosti na mutagene često je dio epidemioloških istraživanja koja prate pojavnost zloćudnih bolesti u populacijama. Naime, kao posljedica djelovanja mutagena u genomu izloženih osoba nastaje određena, manja ili veća, količina oštećenja, koja je uvjetovana individualnim razlikama u osjetljivosti. Viša razina takve genomske nestabilnosti znači opasnost (rizik) od razvoja zloćudnih bolesti. Interindividualne razlike u odgovoru na mutagene obično se povezuju i s promijenjenom

(većinom smanjenom) sposobnosti (kapacitetom) za popravak DNA. Citogenetičke studije su pokazale da je genom tumorskih stanica nestabilniji od normalnih (1-3), a time i skloniji akumuliranju oštećenja, bilo da je nestabilnost uzrokovana nasljeđem, izloženošću ili kombinacijom tih dvaju učinaka (4).

Nasljedna kromosomska nestabilnost opisana je u raznim sindromima povezanim s lomovima kromosoma, kao što su Bloomov sindrom, Fanconijeva anemija, Ataxia telangiectasia i Xeroderma pigmentosum (5,6). U oboljelih ispitanika utvrđena je povećana učestalost kromatidnih i kromosomskih

abercija naspram normalne populacije te sklonost razvoju određenih vrsta neoplazija. No, osim ovakvih ekstremnih primjera, različite varijacije u kromosomskoj nestabilnosti opisane su i u zdravih ljudi (7).

Kao jedan od čimbenika pretvorbe normalnih stanica u tumorske, genomska se nestabilnost očituje u promjeni mikrosatelitnih sljedova, dužini telomera te u indukciji kromosomskih aberacija (8). Zbog stabiliziranja stanja izazvanog prebrzim skraćivanjem telomera može doći do genomskih rearanžmana, gubitka heterozigotnosti i genske amplifikacije.

Za praćenje povezanosti takvog promijenjenog odgovora i pojavnosti tumora služe nam različiti biomarkeri. Kao indirektni pokazatelji uspješnosti popravka DNA često se rabe testovi osjetljivosti na mutagene u kulturama limfocita periferne krvi. Jedan od takvih testova predložili su Hsu i suradnici (9). U svojem su testu osjetljivosti na mutagene rabili bleomicin, citostatik koji uzrokuje stvaranje kromatidnih lomova. Po strukturi glikopeptid, bleomicin se u stanici prevodi u aktivni oblik sposoban cijepati molekulu DNA pri čemu nastaju brojni jednolančani i dvolančani lomovi. Kako izaziva oštećenja slična onima potaknutim ionizirajućim zračenjem, ubrajamo ga i u radiomimetike (10). Bleomicin-test je jednostavna i jeftina metoda koja se zasniva na utvrđivanju ukupnog broja jednolančanih lomova u kromosomima limfocita uzgajanih u staničnoj kulturi koji su u uvjetima *in vitro* tijekom kasne G₂-faze staničnog ciklusa bili izloženi bleomicinu. Danas se rabe i usporedbe osjetljivosti testa izlaganjem limfocita bleomicinu u G₀ i G₂-fazi (11).

Metoda je u osnovi vrlo jednostavna. Uzorak heparinizirane krvi dodaje se u hranjivi medij za rast stanica (obično RPMI 1640 obogaćen 20 %-tnim telećim fetalnim serumom i antibioticima). Dodatkom mitogena fitohemaglutinina potiče se rast T-limfocita. Kultura se inkubira 72 sata, u termostatu na 37 °C, u atmosferi s 5 % CO₂. Na početku zadnjih 5 sati kultiviranja limfociti se izlažu bleomicinu u koncentraciji 30 µg mL⁻¹. Početkom 72. sata u stanične kulture dodaje se otopina kolhicina u koncentraciji od 0.25 µg mL⁻¹. Nakon završetka kultiviranja stanica pristupa se izradi preparata prema standardnom citogenetičkom protokolu (12). Mikroskopski preparati oboje se Giemsinom bojom te analiziraju s pomoću svjetlosnog mikroskopa. Hsu i sur. (9) preporučuju brojenje ukupnog broja kromatidnih lomova u 100 dobro raspršenih metafaza po osobi. Broj kromatidnih lomova po stanici (tzv. b/c, od

engl. *breaks/cell*) uzima se kao pokazatelj (indikator) osjetljivosti na mutagene. Ako je dobivena vrijednost jednaka ili veća od 0,8 lomova po stanici, govorimo o kromosomskoj nestabilnosti i osjetljivosti, dok su vrijednosti veće od jedan pokazatelj preosjetljivosti.

U kulturama stanica koje su bile izložene bleomicinu uočene su i metafaze s multiplim oštećenjima kromosoma. One se obično pojavljuju s vrlo niskom učestalosti (manje od 1 %), a njihov se nastanak povezuje sa somatskim mutacijama zbog kojih su mehanizmi popravka potpuno ili gotovo potpuno inhibirani ili reducirani (13).

Definicija fenotipa osjetljivog na mutagene prilično je teška, a literatura o tome uglavnom je nekonzistentna. U istraživanjima se često kao granična vrijednost osjetljivosti za dihotomizaciju rezultata rabi medijan te vrijednosti 25. (14), 50. (15) ili 75. percentile, a i vrijednosti b/c dobivene u istraživanjima često se razlikuju.

Cloos i sur. (16) nisu našli značajne razlike u podacima dobivenim brojenjem u različitim laboratorijima, dok su Erdei i sur. (17) utvrdili dobre korelacije pri uspoređivanju međulaboratorijskih podataka, kao i podataka dobivenih između i unutar različitih opažatelja.

Epidemiološke studije

Dosadašnja istraživanja upućuju na povezanost između rezultata bleomicin-testa i pojavnosti premalignih lezija (18-20, 9). Do danas je proveden velik broj istraživanja sa svrhom procjene osjetljivosti na bleomicin i procjene rizika od razvoja zloćudnih (malignih) bolesti. Najveći postotak osjetljivosti pronađen je u tkivima i/ili organima bolesnika koji su bili direktno izloženi nepovoljnim uvjetima okoliša (više od 70 %), dok je tek 10 % do 20 % zdravih pojedinaca pokazalo preosjetljivost na izloženost istom mutagenu (9, 16). Hsu i suradnici (9) utvrdili su da 70 % od 313 bolesnika s potvrđenim dijagnozama karcinoma kolona, pluća ili glave/vrata imaju učestalost lomova po stanici veću od 0,80, dok je ona u 335 zdravih pojedinaca bila tek 22 %.

U oboljelih od kolorektalnog karcinoma pronađene su povišene vrijednosti kromatidnih lomova naspram odgovarajućih kontrola (21, 22). Proučavajući pacijentice oboljele od karcinoma jajnika, maternice i grla maternice, Waxsmanski i suradnici ustanovili su značajno veću osjetljivost na bleomicin naspram kontrolne skupine, zaključujući da bi metoda mogla biti korisna u otkrivanju subpopulacija s višom kromosomskom nestabilnosti i sklonosti razvoju

zloćudnih bolesti (23). Oboljeli od skvamoznog tipa tumora glave i vrata također su pokazali veću osjetljivost na bleomicin (24, 25, 26), a Szekely i suradnici (26) čak su utvrdili da se ovaj test može iskoristiti kao biomarker za otkrivanje predispozicije za razvoj zloćudnih bolesti u osoba preosjetljivih na bleomicin u kojih je učestalost stanica s aberacijama veća od 2 %.

Polimorfizmi i ekspresija gena

Polimorfizam obično uključuje promjenu samo jednog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*), gubitak (deleciju) manjeg ili većeg dijela slijeda u molekuli DNA, umetanje određenog broja nukleotida ili pak ponavljanja di-, tri- ili oligonukleotida različit broj puta, a koji varira među pojedincima. SNP je polimorfizam jednog nukleotida u kojem je jedan od četiri nukleotida (A, T, C ili G) zamijenjen drugim. SNP-ovi uzrokuju promjenu slijeda u DNA. U ljudskom genomu ima oko 15 milijuna SNP-a, od kojih 50.000 do 100.000 može promijeniti funkciju ili izražaj gena. Kako je učestalost 70 % SNP-a u populaciji manja od 5 %, nazivamo ih rijetkim SNP-ovima (27).

Najčešća vrsta varijacije u slijedu DNA nekog gena je SNP. Povezanost takve promjene u samo jednom nukleotidu (koja se u prosjeku događa na svakih 1000 nukleotida u ljudskom genomu) sa složenom etiologijom zloćudnih bolesti do danas je slabo istražena (28). Danas postoje mnoga istraživanja koja polimorfizme određenih gena uključenih u razne mehanizme popravka ili metaboliziranja tvari dovode u vezu s nastankom, razvojem i povećanom sklonosti prema nastanku neke bolesti (29). Sami polimorfizmi mogu dovesti do promijenjene (smanjene ili povišene) ekspresije određenog ili određenih gena, utječući tom promjenom na mehanizme popravka u samoj stanici (30-34).

Tuimala (35) pokazao je da polimorfizam gena XRCC1 (od engl. *X-ray repair cross-complementing 1*) utječe na osjetljivost stanica na bleomicin (36). U istraživanjima na 80 zdravih bijelaca isti je autor dokazao da nosioci polimorfizma na položaju -280 u genu XRCC1 imaju veću osjetljivost na bleomicin. XRCC1 je gen koji sudjeluje u popravku izrezivanjem krivo sparenih baza ili BER (od engl. *base excision repair*). Naspram toga, pušači koji su bili nositelji polimorfizma na položaju -1450 u genu BLHX pokazivali su smanjenu osjetljivost. BLHX je gen za bleomicin hidrolazu, enzim odgovoran za

metaboliziranje bleomicina u organizmu. Istraživanja drugih gena koji sudjeluju u metabolizmu, primjerice NAT2 (N-acetiltransferaza) i XRCC3 te GSTM1 i GSTT1 (glutation-S-transferaze) koje je ispitivao i Wakmanski (31), nisu pokazala nikakvu vezu s ne/osjetljivošću na bleomicin.

Nakon izlaganja bleomicinu, Cloos (37) primijetio je promjenu u ekspresiji gena uključenih u stanični rast i proliferaciju, regulaciju staničnog ciklusa i popravka DNA. Usporedbom skupine osjetljive na mutagene s neosjetljivom uočena je promijenjena ekspresija gena uključenih u prijenos signala, stanični rast i održavanje (npr. BUB1 i DUSP4). Uključenost više raznih skupina gena pokazuje da je ne/osjetljivost na bleomicin određena njihovom uzajamnom aktivnošću; promjenom u ekspresiji, koja utječe na metaboliziranje bleomicina, a samim time i osjetljivosti, tj. odgovoru na mutagen. Svi ti podaci upućuju na potrebu daljnjih ispitivanja gena odgovornih za nastanak sporadičnih tumora.

Wu (38) proučavao je utjecaj osjetljivosti na mutagene i povezanosti s razvojem raka pluća u ispitanika dviju rasa, Amerikanaca meksičkog i afričkog podrijetla. Istraživši polimorfizam PADPRP (poli-ADP riboza-polimeraza) gena na kromosomu 13, koji se povezuje s nastankom te bolesti, pokazao je da između rasa postoji različita raspodjela pojedinih polimorfizama te da je genotipska populacija sa polimorfizmom alela B (delecija 193pb-segmenta u tom lokusu), neovisno o rasnoj pripadnosti povezana s povećanim rizikom od razvoja te zloćudne bolesti. Rajae-Behbahani (39) pokazao je primjenom bleomicin-testa da se PARP, enzim koji se aktivira u prisutnosti lomova u DNA i sudjeluje u njihovu popravku, stvara u značajno manjim količinama u pacijenata oboljelih od karcinoma ždrijela.

Mišljenja o tome je li osjetljivost na mutagene samo genski uvjetovana, a neovisna o čimbenicima okoliša, podijeljena su (16, 14, 40).

U istraživanjima blizanaca (41-43) Cloos i Tedeschi pokazali su visoku uvjetovanost nasljeđem u jednojajčanih blizanaca za razliku od dvojajčanih (75 % i 58 % u odnosu prema 40,7 %). U obiteljskim studijama primijećeno je da je rodbina u prvom koljenu također osjetljivija na izloženost mutagenima, slično kao i osjetljivi pojedinci te da je osjetljivost na mutagene u svih srodnika mnogo viša od vrijednosti za kontrolu (44-46).

Translokacije

Postoje i dokazi da bleomicin uzrokuje oštećenja na određenim područjima kromosoma, kao što su regije poveznica (linker), mjesta između nukleosoma te regije s velikom heterozigotnošću. Bleomicin se često povezuje s tzv. nestabilnosti mikrosatelitnih regija u kromosomima. Međutim, Sasiadek i sur. (47) nisu pronašli takvu povezanost u oboljelih od karcinoma glave i vrata histološkog tipa skvamoznih stanica.

Brunelli i sur. (48), proučavajući gubitak slijeda DNA na p-kraku kromosoma 9, pokazali su da taj događaj spada među najranije korake u neoplastičnoj progresiji raka ždrijela. Upotrebom fluorescentnih sonda, tehnikom FISH (od engl. *fluorescence in situ hybridisation*), dokazali su i gubitak heterozigotnosti u obliku delecija i nerekipročne translokacije dijelova kromosoma broj 9 na druge kromosome, primjerice broj 2. U nekim vrstama leukemija i melanoma također je dokazan isti gubitak. Brunelli je dokazao i defekte u strukturi kromosoma 1, 3, 4, 5, 9, 10, 13, 14, 16, 18 i Y-kromosoma. Proučavajući populaciju sa sporadičnim kolorektalnim karcinomom, Richard (49) pokazao je da mlada muška populacija genski predisponirana za razvoj kolorektalnog karcinoma ima veću osjetljivost na tretman bleomicinom, a u tih bolesnika zabilježena je povećana pojavnost aneuploidije spolnih kromosoma, za razliku od autosoma. Isti je autor dokazao postojanje kromosomskih rearanžmana koji uključuju i druge kromosome, osim kromosoma 7 i 14 te njihovo pojavljivanje povezao sa starenjem.

Schantz (24) pokazao je veću osjetljivost na mutagene u mlađoj populaciji (ispod 30 godina) oboljelih od karcinoma glave i vrata te najveću osjetljivost u skvamoznom tipu tumora. Proučavajući pacijentice oboljele od endometrioze, Lin (50) našao je da su lomovi nakon izloženosti bleomicinu bili najčešći na kromosomima 4 i 5, iako je veća učestalost zabilježena i na kromosomima 1, 2, 6, 16 i 17.

Uporabom specifičnih sonda u tehnici FISH utvrđena je veća učestalost translokacija kromosoma 4 i 5 u oboljelih od skvamoznog tipa karcinoma glave i vrata, pokazujući kako FISH može biti tehnika korisna u detekciji skrivenih kromosomskih nestabilnosti (25).

Ionizirajuće zračenje

Wu (43) pokazao je da je osjetljivost na ionizirajuće zračenje izrazito uvjetovana nasljedem

(62,5 %). Slično bismo očekivali i za bleomicin, kao radiomimetik, no iako oboje uzrokuju lomove u DNA, zbog strukturne složenosti (kompleksnosti) nastalih oštećenja postoje mišljenja da se popravak DNA oštećene pod utjecajem tih dvaju mutagena odvija putem različitih mehanizama, pogotovo pri izloženosti niskim dozama obaju agensa (51, 52). Valja naglasiti da toksičnost bleomicina između ostaloga ovisi o prisutnosti iona željeza koje u reduciranom obliku bleomicin treba za svoje aktiviranje (53). Iako izloženost X-zračenju pri snimanju pluća tri mjeseca prije izloženosti bleomicinu ne mijenja osjetljivost na bleomicin (54), izloženost ionizirajućem zračenju u radnim uvjetima tu osjetljivost ipak smanjuje, što upućuje na postojanje adaptivnog odgovora na djelovanje bleomicina (55-58).

Vitamini i prehrana

Način života, primjerice unos vitamina i prehrana također mogu utjecati na rezultate testa osjetljivosti na mutagene. Dok neka istraživanja pokazuju da dnevni unos vitamina C i E smanjuje količinu oštećenja kromosoma (55), čak ovisno o dozi (60, 61), druga ne upućuju na bilo kakve promjene u odgovoru na "poticaj" bleomicinom (58). U ljudi oboljelih od raka vrata i glave koji još nisu primili terapiju, uočena je ovisnost između niskog unosa vitamina C i E i odgovora u testu osjetljivosti na mutagene te njihovu ulogu u procjeni rizika od oboljenja (63, 64). Dvosatna predinkubacija različitim koncentracijama vitamina A, C i E (kakve se mogu postići i u organizmu) u kulturi ljudskih limfocita pokazala je njihov zaštitni utjecaj koji je bio ovisan o dozi (63-67, 59).

Koncentracije alfa-karotena, beta-karotena i ukupna količina karotenoida, izmjerene u serumu zdravih ljudi, također su pokazale negativnu, ali značajnu korelaciju s učestalosti lomova izazvanih bleomicinom. Primijećeno je da su i kriptoksantin i likopen također povezani sa smanjenjem rizika (61). Nadalje, i koncentracija triglicerida u serumu pozitivno je korelirala s osjetljivošću na bleomicin (60). Drugi istraživači nisu našli povezanost između količina beta-karotena, alfa-tokoferola (68) niti N-acetilcisteina uzimanog kao nadomjestak (69).

Kao jedno od mogućih objašnjenja spominje se dugo vrijeme rasta stanica u kulturi (72 sata) koje smanjuje mogućnost procjene zaštitnog djelovanja antioksidansa.

Dodatna analiza prehrambenih navika pokazala je statistički značajan rizik od oboljenja od karcinoma

glave i vrata u ispitanika čija prehrana obiluje jajima, sladoledom, govedinom, jetrom, svinjetinom, pečenom piletinom te kobasicama od svinjske jetre. Smanjenje rizika uočeno je pri visokom unosu voća i povrća, kao što su jabuke, rajčice i zelena salata (61).

Metabolizam DNA ovisi i o različitim prehranbenim čimbenicima koji sudjeluju kao kofaktori ili supstrati u metaboličkim reakcijama i putovima popravka DNA (70, 71, 72). Mnoga oštećenja genoma nastaju spontano, za životnog vijeka same stanice ili su naslijeđena od prethodne generacije. Točkaste mutacije, modifikacije baza nastale pod utjecajem reaktivnih molekula kao što su hidroksilni radikal, kromosomski lomovi, rearanžmani, gubitak ili udvostručenje kromosoma, gensko utišavanje zbog neodgovarajuće metilacije CpG promotorskog slijeda sekvence, aktivacija "parazitske" DNA zbog reducirane metilacije CpG-regija, kao i ubrzano skraćivanje telomernih sljedova (71), tek su neke od klasičnih mutacija.

U prevenciji oksidacije DNA služe različiti antioksidansi. Primjerice, enzim superoksid dismutaza (73), glutation (74) i dimetilurea (75) mogu inhibirati oštećenja nastala izloženošću bleomicinu u uvjetima *in vitro*. Dovoljna količina folata sprečava ugradnju uracila u DNA, a metionin, folati i vitamin B12 pomažu u održavanju metilacije CpG. Ioni Zn i Mg također su važni kofaktori ili komponente enzima koji sudjeluju u popravku DNA, a niacin i folati važni su i u održavanju dužina telomera. Postoji čak 8 ljudskih glikozilaza koje uklanjaju oštećenja DNA nastala zbog nedostatka mikronutrijenata kao što su Zn, vitamin C i E, ili folati, metionin ili vitamin B12.

Stvaranje lomova u molekuli DNA pod utjecajem bleomicina smanjuje se u blizini 5-metilцитидина, a taj se utjecaj može primijetiti čak i 14 parova baza dalje od takvog mjesta (76, 77).

Na vezanje bleomicina i cijepanje DNA utječe prisutnost željezovog iona te željezovih polifenolnih kelata (produkata biotransformacije benzena) (78). Za citotoksičnost bleomicinu su potrebni metalni ion i kisik. Nakon vezanja za željezov ion, kompleks veže molekulu kisika i tek tada se veže na DNA. Procijenjeno je da jedna molekula bleomicina može uzrokovati 8-10 lomova u DNA. Zbog nemogućnosti slobodnog difundiranja iz stanice bleomicin je jako toksičan u samim stanicama. Neovisnost o P-glikoproteinskoj pumpi (po čemu se razlikuje od drugih antineoplastičnih lijekova), odnosno proteinu koji se povećano eksprimira (79) u rezistentnim stanicama te izlučuje lijek izvan stanice omogućuje veliku djelotvornost samog bleomicina.

Alkohol

Prisutnost etanola u kulturama ljudskih limfocita u uvjetima *in vitro* povećava njihovu osjetljivost na bleomicin, a taj je učinak ovisan o dozi (80, 81).

U pokusima na kulturama ljudskih limfocita primijećeno je da afidokolin, koji inhibira popravak DNA, zajedno s etanolom, potiče nastanak oštećenja u tzv. osjetljivim regijama (82, 83). Vjerojatni je razlog inaktiviranje enzima koji sudjeluju u popravku DNA. U pokusima na staničnoj kulturi jajnika kineskog hrčka (CHO) utvrđena je veća količina kromosomskih oštećenja pri istodobnom izlaganju bleomicinu i alkoholu nego samo u obradi bleomicinom. Prijašnja izloženost alkoholu ne utječe na razinu kromosomskih oštećenja, pokazujući tako da alkohol nema direktni klastogeni učinak. Sinergistički učinak alkohola i bleomicina može biti posljedica više različitih mehanizama kao što su veća propusnost stanične membrane zbog utjecaja alkohola te lakši ulazak same tvari u stanicu; ubrzavanje staničnog ciklusa do mitoze, tako da se stanica ne zaustavi u fazi G₂ i ne uspije popraviti oštećenja prije diobe (83); promjene u metaboliziranju bleomicina te utjecaji na inhibiciju popravka DNA (84). Hsu i Furlong (83) pokazali su da se oštećenja nastala nakon obrade bleomicinom brzo popravljaju, pa se 5 sati nakon tretmana mogu utvrditi vrijednosti slične spontanom aberacijama. Kada su, nakon obrade bleomicinom, stanice isprane i prenesene u novi medij s različitim koncentracijama etanola, inhibicija popravka zapažena je u 2 %-tnoj otopini. Međutim, nakon ponovne inkubacije bez etanola nije primijećena daljnja inhibicija popravka.

Proučavajući populaciju od 156 pacijenata s karcinomom glave i vrata i kontrolnih ispitanika, Szekely (85) pronašao je veću osjetljivost u bolesnika te alkoholičara iz kontrole u odnosu na pušače i nepušače iz kontrole. Najveću osjetljivost genoma imali su bolesni pušači s teškim alkoholizmom te bolestima jetre. Učestalost osjetljivosti na mutagene u kontrolnoj skupini iz Mađarske bila je 42 % do 49 %, što je dvostruko veća vrijednost od onih opaženih u mjerenjima u Sjedinjenim Američkim Državama ili zemljama zapadne Europe, upućujući tako na utjecaj okolišne izloženosti cijelog područja na genomsku nestabilnost ljudi. U bolesnika je također zamijećen tri puta veći postotak aberantnih stanica od uobičajenoga koji je iznosio 3,34 % (86). Schantz (61) također je utvrdio da teški alkoholičari koji konzumiraju više od 100 pića na mjesec imaju povećani rizik od oboljenja od te vrste karcinoma.

Pušenje

Rezultati istraživanja o utjecaju pušenja na razinu učestalosti kromatidnih lomova (b/c) nekonzistentni su. Dok neki dokazuju da pušenje nema nikakvog utjecaja (54, 16, 92), drugi ipak pokazuju vezu učestalosti kromatidnih lomova, pušenja i sklonosti razvoju zloćudnih bolesti, primjerice raka pluća (87, 88). No tumačenje takvih rezultata vrlo je složeno. Dok su Strom i Spitz (87) dokazali da su bivši pušači i aktivni pušači osjetljiviji na bleomicin, veću predispoziciju za razvoj raka imali su ispitanici mlađi od 55 godina te oni koji su manje pušili. Gallo (89) pokazao je da je osjetljivost na mutagene najveća u pušača u kojih je potvrđena zloćudna preobrazba. Zbog mogućih međusobnih djelovanja, pri tumačenju rezultata trebalo bi istražiti korelacije između pušenja, dobi i ostalih čimbenika vezanih uz način života, jer oni mogu pokazati i zajednički učinak (14, 69, 90, 91).

Starenje

Učestalost kromatidnih lomova u zdravih ljudi, slično kao i navika pušenja, ne ovisi o dobi ispitanika (54, 16, 14). No, čini se da su iznimka populacije starije od 70 godina (85, 86). Razlozi tomu su složeni i uključuju molekularne promjene povezane sa starošću, kao što je slabljenje imunskih funkcija te umanjena sposobnost i sporiji popravak DNA, a time i veća osjetljivost pri izloženosti karcinogenima iz okoliša (15).

U ispitanica oboljelih od endometrioze Lin (50) nije našao nikakvu korelaciju starenja i učestalosti kromatidnih lomova uzrokovanih bleomicinom.

Schantz (24) pokazao je da je osjetljivost na bleomicin viša u ispitanika mlađih od 30 godina oboljelih od karcinoma glave i vrata skvamoznog tipa. Istraživanja pokazuju da se ovi čimbenici ne smiju tumačiti odvojeno, već se trebaju pratiti njihovi uzajamni učinci, koji mogu upućivati na zanimljive korelacije, koje se ne bi primijetile ako bi se svaki utjecaj promatrao izolirano (94, 19, 9, 14, 95, 96).

ZAKLJUČAK

Iako bleomicin test nije potpuno neovisan o egzogenim i endogenim čimbenicima (vitamini, hipometilacija ili hipermetilacija, prisutnost željeza i kisika) te sam test ne može otkriti pojedince koji će oboljeti od tumorskih bolesti, otkrivanje subpopulacija

koje pokazuju genomsku nestabilnost, a time i veću osjetljivost u razvoju mogućih tumorskih bolesti više je nego dovoljan razlog da ovakva metoda bude primijenjena u prevenciji razvoja zloćudnih bolesti i praćenju populacija s takvim povećanim rizikom.

LITERATURA

1. Nowell PC. Diagnostic and prognostic value of chromosome studies in cancer. *Ann Clin Lab Sci* 1974;4:234-40.
2. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell population. *Science* 1976;194:23-8.
3. Nowell PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 1986;46:2203-7.
4. Pathak S. Cytogenetic abnormalities in cancer: with special emphasis on tumor heterogeneity. *Cancer Metastasis Rev* 1990;8:299-318.
5. Setlow RB. Repair deficient human disorders and cancer. *Nature* 1978;271:713-7.
6. German J. Chromosome-breakage syndromes: different genes, different treatments, different cancers. U: Generoso WM, Shelby MD, Serress FJ, urednici. DNA repair and mutagenesis in eukaryotes. New York (NY): Plenum Press; 1980. str. 429-39.
7. Hsu TC. Genetic instability in the human population: a working hypothesis. *Hereditas* 1983;98:1-9.
8. Romney CA, Paulauskis JD, Nagasawa H, Little JB. Multiple manifestations of X-ray-induced genomic instability in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mol Carcinog* 2001;32:118-27.
9. Hsu TC, Johnston DA, Cherry LM, Ramkissoon D, Schantz SP, Jessup JM, Winn RJ, Shirley L, Furlong C. Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. *Int J Cancer* 1989;43:403-9.
10. Chen J, Stubbe J. Bleomycin: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2005;5:102-12.
11. Bolzán AD, Bianchi MS, Giménez EM, Flaqué MC, Ciancio VR. Analysis of spontaneous and bleomycin-induced chromosome damage in peripheral lymphocytes of long-haul aircrew members from Argentina. *Mutat Res* 2008;639:64-79.
12. Nemeth MA, Hsu TC, Pathak S. Chromosome instability in the murine melanoma cell line K-1735 is due to drug-specific mechanisms. *Genet Mol Biol* 2000;23:763-9.
13. Spitz MR, Fueger JJ, Beddingfield NA, Annegers JF, Hsu TC, Newell GR, Schantz SP. Chromosome sensitivity to bleomycin-induced mutagenesis, an independent risk factor for upper aerodigestive tract cancers. *Cancer Res* 1989;49:4626-8.
14. Zheng YL, Loffredo CA, Yu Z, Jones RT, Krasna MJ, Alberg AJ, Yung R, Perlmutter D, Enewold L, Harris C, Shields PG. Bleomycin-induced chromosome breaks as a risk marker for lung cancer: a case-control study with population and hospital controls. *Carcinogenesis* 2003;24:269-74.
15. Cloos J, Spitz MR, Schantz SP, Hsu TC, Zhang ZF, Tobi H, Braakhuis BJ, Snow GB. Genetic susceptibility to head and neck carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:530-5.

16. Erdei E, Lee SJ, Wei Q, Wang LE, Song YS, Bovbjerg D, Berwick M. Reliability of mutagen sensitivity assay: an inter-laboratory comparison *Mutagenesis* 2006;21:261-4.
17. Wu X, Lippman SM, Lee JJ, Zhu Y, Wei QV, Thomas M, Hong WK, Spitz MR. Chromosome instability in lymphocytes: a potential indicator of predisposition to oral premalignant lesions. *Cancer Res* 2002;62:2813-8.
18. Hsu TC, Cherry LM, Samaan NA. Differential mutagen susceptibility in cultured lymphocytes of normal individuals and cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1985;17:307-13.
19. Cloos J, Reid CB, Snow GB, Braakhuis BJ. Mutagen sensitivity: enhanced risk assessment of squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;32B:367-72.
20. Jyothish B, Ankathil R, Chandini R, Vinodkumar B. The cytogenetic identification of high risk members in colorectal cancer families. *Neoplasma* 1997;44:258-62.
21. Ankathil R, Jyothish B, Madhavan J, Nair MK. Deficient DNA repair capacity: a predisposing factor and high risk predictive marker in familial colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 1999;18:33-7.
22. Fireman Z, Shabtai F, Lurie B. Chromosome sensitivity to bleomycin-induced mutagenesis in lymphocytes from colorectal cancer patients under 40 years of age. *Dis Colon Rectum* 1994;37:1317-20.
23. Waksmański B, Dudkiewicz J, Srebrniak M. Niestabilność chromosomowa kobiet z choroba nowotworowa narządu rodnoego [Chromosome instability in women with genital organs carcinoma, na poljskom]. *Ginekol Pol* 2001;72(12A):1411-7.
24. Schantz SP, Hsu TC. Mutagen-induced chromosome fragility within peripheral blood lymphocytes of head and neck cancer patients. *Head Neck* 1989;11:337-42.
25. Zych M, Schlade-Bartusiak K, Chorostkowska A, Stembalska A, Kręcicki T, Sasiadek M. Bleomycin-induced chromosome aberrations in head and neck cancer patients analyzed by classical cytogenetics and FISH. *Cancer Lett* 2000;152:123-7.
26. Székely G, Remenár E, Kásler M, Gundy S. Does the bleomycin sensitivity assay express cancer phenotype? *Mutagenesis* 2003;18:59-63.
27. Shastry BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol* 2009;578:3-22.
28. Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M, Stromberg U, Vermeulen R, Tucker JD. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environ Mol Mutagen* 2005;45:258-70.
29. Norppa H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett* 2004;149:309-34.
30. Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005;162:925-42.
31. Weiss JM, Goode EL, Ladiges WC, Ulrich CM. Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. *Mol Carcinog* 2005;42:127-41.
32. Hu Z, Ma H, Chen F, Wei Q, Shen H. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1810-8.
33. Kotsopoulos J, Chen Z, Vallis KA, Poll A, Ainsworth P, Narod SA. DNA repair capacity as a possible biomarker of breast cancer risk in female BRCA1 mutation carriers. *Br J Cancer* 2007;96:118-25.
34. Parl FF. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett* 2005;221:123-9.
35. Tuimala J, Szekely G, Gundy S, Hirvonen A, Norppa H. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity. *Carcinogenesis* 2002;23:1003-8.
36. Waksmański B, Kamiński K. Ekspresja transferazy S-glutatonu GSTM1 i GSTT1 u pacjentek z niestabilnością chromosomową potwierdzoną testem bleomycynowym [Manifestation of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 in female patients with bleomycin-positive chromosome instability, na poljskom]. *Ginekol Pol* 2003;74:1415-20.
37. Cloos J, de Boer WP, Snel MH, van den Ijssel P, Ylstra B, Leemans CR, Brakenhoff RH, Braakhuis BJ. Microarray analysis of bleomycin-exposed lymphoblastoid cells for identifying cancer susceptibility genes. *Mol Cancer Res* 2006;4:71-7.
38. Wu X, Hsu TC, Cao S, Lee JJ, Amos CI, Spitz MR. Deletion in poly(ADP-ribose)polymerase pseudogene and lung cancer risk. *Carcinogenesis* 1998;19:93-8.
39. Rajaei-Behbahani N, Schmezer P, Ramroth H, Bürkle A, Bartsch JH, Dietz A, Becher H. Reduced poly(ADP-ribosyl)ation in lymphocytes of laryngeal cancer patients: results of a case-control study. *Int J Cancer* 2002;98:780-4.
40. Székely G, Remenár E, Kásler M, Gundy S. Does the bleomycin sensitivity assay express cancer phenotype? *Mutagenesis* 2003;18:59-63.
41. Cloos J, Nieuwenhuis EJ, Boomsma DI, Kuik DJ, van der Sterre ML, Arwert F, Snow GB, Braakhuis BJ. Inherited susceptibility to bleomycin-induced chromatid breaks in cultured peripheral blood lymphocytes. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1125-30.
42. Tedeschi B, Cicchetti R, Argentin G, Caporossi D, Pittaluga M, Parisi P, Vernole P. Aphidicolin and bleomycin induced chromosome damage as biomarker of mutagen sensitivity: a twin study. *Mutat Res* 2004;546:55-64.
43. Wu X, Spitz MR, Amos CI, Lin J, Shao L, Gu J, de Andrade M, Benowitz NL, Shields PG, Swan GE. Mutagen sensitivity has high heritability: evidence from a twin study. *Cancer Res* 2006;66:5993-6.
44. Roberts SA, Spreadborough AR, Bulman B, Barber JB, Evans DG, Scott D. Heritability of cellular radiosensitivity: a marker of low-penetrance predisposition genes in breast cancer? *Am J Hum Genet* 1999;65:784-94.
45. Li A, Yang R, Wang M. [Evidence for a major role of genetic factors in the etiology of laryngeal and hypopharyngeal carcinomas, na kineskom]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 1997;32:145-7.
46. Yu GP, Zhang ZF, Hsu TC, Spitz MR, Schantz SP. Family history of cancer, mutagen sensitivity, and increased risk of head and neck cancer. *Cancer Lett* 1999;146:93-101.
47. Sasiadek M, Stembalska-Kozłowska A, Smigiel R, Kręcicki T, Blin N, Mirghomizadeh F. Microsatellite and chromosome instability in squamous cell laryngeal carcinoma. *Int J Oncol* 2001;19:401-5.
48. Brunelli M, Baroli P, Bianchi B. [Genetics of laryngeal cancer: an experimental study, na talijanskom]. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 1997;5:339-46.

49. Richard F, Muleris M, Dutrillaux B. Chromosome instability in lymphocytes from patients affected by or genetically predisposed to colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1994;73:23-32.
50. Lin J, Zhang X, Chen Y. Mutagen sensitivity as a susceptibility marker for endometriosis. *Hum Reprod* 2003;18:2052-7.
51. Pastwa E, Neumann RD, Mezhevaya K, Winters TA. Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks is dependent upon radiation quality and the structural complexity of double-strand breaks. *Radiat Res* 2003;159:251-61.
52. Affentranger MI, Burkart W. Resolution of DNA damage at the single-cell level shows largely different actions of X-rays and bleomycin. *J Histochem Cytochem* 1995;43:229-35.
53. Kruszewski M, Zaim J, Gródzka I, Szumiel I. Comparison of the effects of bleomycin and ionizing radiation in two sublines of murine lymphoma L5178Y. *Nukleonika* 2001;46:81-6.
54. Michalska J, Motykiewicz G, Kalinowska E, Chorazy M. Bleomycin sensitivity test in the exposed and reference human populations. *Mutat Res* 1998;418:43-8.
55. Barquinero JF, Barrios L, Caballín MR, Miró R, Ribas M, Subias A, Egozcue J. Decreased sensitivity to the cytogenetic effects of bleomycin in individuals occupationally exposed to ionizing radiation. *Mutat Res* 1996;354:81-6.
56. Kalina I, Brezani P, Habalova V, Kohut A, Biroš E, Nemethova G, Šalagovič J. Reciprocal adaptive response of human peripheral lymphocytes induced by bleomycin or gamma rays. *Physiol Res* 1999;48:171-4.
57. Milić M, Rozgaj, R, Kašuba V. Influence of smoking, folic acid and vitamin B12 concentration on DNA stability in lymphocytes from workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. U: Tsatsakis AM, Liesivuori J, urednici. Abstracts of the 45th Congress of the European Societies of Toxicology; 5.-8. listopada 2008. Rhodes, Grčka. *Toxicol Lett* 2008;180(Suppl 1):S32.
58. Dias FL, Antunes LMG, Rezende PA, Carvalho FES, Silva CMD, Matheus JM, Oliveira JV, Lopes GP, Pereira GA and Balarin MAS. Cytogenetic analysis in lymphocytes from workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007;23:228-33.
59. Pohl H, Reidy JA. Vitamin C intake influences the bleomycin-induced chromosome damage assay: implications for detection of cancer susceptibility and chromosome breakage syndromes. *Mutat Res* 1989;224:247-52.
60. Kucuk O, Pung A, Franke AA, Custer LI, Wilkens LR, Marchand LL, Higuchi CM, Cooney RV, Hsu TC. Correlations between mutagen sensitivity and plasma nutrient levels of healthy individuals. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:217-21.
61. Schantz SP, Zhang ZF, Spitz MS, Sun M, Hsu TC. Genetic susceptibility to head and neck cancer: interaction between nutrition and mutagen sensitivity. *Laryngoscope* 1997;107:765-81.
62. King TM, Trizna Z, Wu X, Amos CI, Fueger RH, Fueger JJ, Fritsche HA, Hsu TC, Winn R, Spitz MR. A clinical trial to evaluate the effect of vitamin C supplementation on in vitro mutagen sensitivity. The University of Texas M. D. Anderson Clinical Community Oncology Program Network. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:537-42.
63. Trizna Z, Schantz SP, Hsu TC. Effects of N-acetyl-L-cysteine and ascorbic acid on mutagen-induced chromosomal sensitivity in head and cancer patients. *Am J Surg* 1991;162:294-8.
64. Trizna Z, Schantz SP, Lee JJ, Spitz MR, Goepfert H, Hsu TC, Hong WK. In vitro protective effects of chemopreventive agents against bleomycin-induced genotoxicity in lymphoblastoid cell lines and peripheral blood lymphocytes of head and neck cancer patients. *Cancer Detect Prev* 1993;17:575-83.
65. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119:598-620.
66. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 1994;97(3A):5S-13S.
67. Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200:248-54.
68. Goodman MT, Hernandez B, Wilkens LR, Lee J, Le Marchand L, Liu LQ, Franke AA, Kucuk O, Hsu TC. Effects of beta-carotene and alpha-tocopherol on bleomycin-induced chromosomal damage. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:113-7.
69. Cloos J, Bongers V, Lubsen H, Tobi H, Braakhuis BJ, Snow GB. Lack of effect of daily N-acetylcysteine supplementation on mutagen sensitivity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5:941-4.
70. Ames BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res* 2001;475:7-20.
71. Fenech M, Ferguson LR. Micronutrients and genomic stability. *Mutat Res* 2001;475:1-6.
72. Ames BN, Wakimoto P. Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk? *Nature Rev Cancer* 2002;2:694-704.
73. Galvan L, Huang CH, Prestayko AW, Stout JT, Evans JE, Crooke ST. Inhibition of bleomycin-induced DNA breakage by superoxide dismutase. *Cancer Res* 1981;41:5103-6.
74. Poli P, Buschini A, Candi A, Rossi C. Bleomycin genotoxicity alteration by glutathione and cytochrome P-450 cellular content in respiratory proficient and deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutagenesis* 1999;14:233-8.
75. Trush MA, Mimnaugh EG, Ginsburg E, Gram TE. Studies on the interaction of bleomycin A2 with rat lung microsomes: II. Involvement of adventitious iron and reactive oxygen in bleomycin-mediated DNA chain breakage. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;221:159-65.
76. Hertzberg RP, Caranfa MJ, Hecht SM. Degradation of structurally modified DNAs by bleomycin group antibiotics. *Biochemistry* 1988;27:3164-74.
77. Hertzberg RP, Caranfa MJ, Hecht SM. DNA methylation diminishes bleomycin-mediated strand scission. *Biochemistry* 1985;24:5286-9.
78. Singh V, Ahmad S, Rao GS. Prooxidant and antioxidant properties of iron-hydroquinone and iron-1,2,4-benzenetriol complex. Implications for benzene toxicity. *Toxicology* 1994;89:25-33.
79. Gothelf A, Mir LM, Gehl J. Electrochemotherapy: Results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treat Rev* 2003;29:371-87.
80. Hsu TC, Furlong C, Spitz MR. Ethyl alcohol as a carcinogen with special reference to the aerodigestive tract: a cytogenetic study. *Anticancer Res* 1991;11:1097-102.
81. Hsu TC, Furlong C. The role of ethanol in oncogenesis of the upper aerodigestive tract; inhibition of DNA repair. *Anticancer Res* 1991;11:1995-8.

82. Kumano A, Kajii T. Synergistic effect of aphidicolin and ethanol on the induction of common fragile sites. *Hum Genet* 1987;75:75-8.
83. Hsu TC, Ramkissoon D, Furlong C. Differential susceptibility to a mutagen among human individuals: synergistic effect on chromosome damage between bleomycin and aphidicolin. *Anticancer Res* 1986;6:1171-6.
84. Lin YC, Ho IC, Lee TC. Ethanol and acetaldehyde potentiate the clastogenicity of ultraviolet light, methyl methanesulfonate, mitomycin C, and bleomycin in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 1989;216:93-9.
85. Székely G, Remenár E, Kásler M, Gundy S. Does the bleomycin sensitivity assay express cancer phenotype? *Mutagenesis* 2003;18:59-63.
86. Székely G, Remenár E, Kásler M, Gundy S. Expozíció vagy rákhajlam? Fej-nyaki laphámrákos betegek citogenetikai szűrése [Exposure or cancer predisposition? Cytogenetic examination of head and neck squamous cancer patients, na maďarskom]. *Magy Onkol* 2001;45:152-7.
87. Spitz MR, Hsu TC, Wu X, Fueger JJ, Amos CI, Roth JA. Mutagen sensitivity as a biological marker of lung cancer risk in African Americans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:99-103.
88. Strom SS, Wu S, Sigurdson AJ, Hsu TC, Fueger JJ, Lopez J, Tee PG, Spitz MR. Lung cancer, smoking patterns, and mutagen sensitivity in Mexican-Americans. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1995;18:29-33.
89. Gallo O, Santoro R, Lenzi S, Boddi V, Giovannucci-Uzielli ML. Increased mutagen-induced chromosome damage in patients with transformed laryngeal pre-cancerosis. *Int J Cancer* 1996;68:700-3.
90. Cloos J, Braakhuis BJ, Steen I, Copper MP, de Vries N, Nauta JJ, Snow GB. Increased mutagen sensitivity in head-and-neck squamous-cell carcinoma patients, particularly those with multiple primary tumors. *Int J Cancer* 1994;56:816-9.
91. Wu X, Delclos GL, Annegers JF, Bondy ML, Honn SE, Henry B, Hsu TC, Spitz MR. A case-control study of wood dust exposure, mutagen sensitivity, and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:583-8.
92. Musilová J, Michalová K, Folberová L, Pacovský V. Bleomycin-induced chromosome aberrations in the lymphocytes of young and elderly patients. *Czech Med* 1990;13:107-13.
93. Franceschi C, Monti D, Scarfi MR, Zeni O, Temperani P, Emilia G, Sansoni P, Lioi MB, Troiano L, Agnesini C, Salvioli S, Cossariza A. Genomic instability and aging. Studies in centenarians (successful aging) and in patients with Down's syndrome (accelerated aging). *Ann NY Acad Sci* 1992;663:4-16.
94. Cherry LM, Hsu TC. Bleomycin-induced chromosome damage in lymphocytes of medullary thyroid carcinoma patients and their family members. *Anticancer Res* 1983;3:367-72.
95. Schantz SP, Spitz MR, Hsu TC. Mutagen sensitivity in patients with head and neck cancers: a biologic marker for risk of multiple primary malignancies. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1773-5.
96. Berwick M, Vineis P. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:874-97.

Summary

GENOME INSTABILITY AND BLEOMYCIN SENSITIVITY TEST

Estimation of individual susceptibility to mutagens is often a part of epidemiological studies monitoring the appearance of malignant disease in different populations. Genome exposure to mutagens can lead to DNA damage. The rate of damage depends on individual differences in response, which are usually associated with differences in DNA repair capacity. Cytogenetic studies have shown that the genome of tumour cells is less stable than normal cells and therefore accumulates more damage. Tumour patients show a higher frequency of chromatid and chromosomal aberrations and a predisposition to certain types of tumours. One of the common biomarkers used in monitoring tumour appearance and changed response to DNA damage is the bleomycin test. In its active form, bleomycin (glycopeptid) is a radiomimetic cytostatic that can damage the DNA molecule and cause multiple single and double strands. The bleomycin test is simple and inexpensive, and is based on scoring chromatid breaks in lymphocytes *in vitro* exposed to bleomycin during the late G₂ phase of the cell cycle. This review looks into different factors that may affect test results and discusses its wide implementation in studies of genome instability usually caused by a combination of factors.

KEY WORDS: *chromatid breaks, DNA damage repair, polymorphism, single strand breaks, translocations, tumour cells*

CORRESPONDING AUTHOR:

Mirta Milić
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Ksaverska cesta 2, 10000 Zagreb
E-mail: mmilic@imi.hr