

Identificazione di marcatori specifici di esposizione professionale a farmaci antitumorali usati in polichemioterapia: Progetto IMEPA

Biomonitoring of nurses occupationally exposed to antineoplastic drugs: the IMEPA Project

Claudia Bolognesi,¹ Maria Concetta Nucci,² Anna Maria Colacci,³ Sandro Grilli,⁴ Flora Ippoliti,⁵ Nicolina Mucci,⁶ Vincenzo Romano Spica,⁷ Anna Barbieri,² Nicoletta Canitano,⁵ Daniela Chiozzotto,³ Livia Di Renzo,⁵ Elena Giordano,¹ Wolfango Horn,³ Paola Roggeri,¹ Alessandro Risi,² Paola Silingardi,³ Monica Vaccari,³ Francesco Saverio Violante⁸

¹Struttura di cancerogenesi ambientale, Istituto nazionale per la ricerca sul cancro, Genova

²Servizio di sicurezza igiene e medicina del lavoro, Università di Bologna

³Eccellenza cancerogenesi ambientale, ARPA-ER, Bologna

⁴Dipartimento di patologia sperimentale, Sezione di cancerologia, Università degli studi di Bologna

⁵Dipartimento medicina sperimentale e patologia, Università La Sapienza, Roma

⁶Istituto superiore per la prevenzione e la sicurezza del lavoro (ISPESL), Roma

⁷Dipartimento di scienze del movimento umano e dello sport, Istituto universitario di scienze motorie (IUSM), Roma

⁸Università di Bologna, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Unità operativa medicina del lavoro, Bologna

Corrispondenza: Claudia Bolognesi, Struttura di cancerogenesi ambientale, Istituto nazionale per la ricerca sul cancro, Genova; e-mail: claudia.bolognesi@istge.it

Riassunto

Obiettivo: identificare biomarcatori che per sensibilità e specificità di effetto possano migliorare le strategie di intervento per la riduzione del rischio degli operatori sanitari addetti alla manipolazione di farmaci antitumorali.

Disegno: studio di epidemiologia molecolare.

Setting: Policlinico universitario S. Orsola-Malpighi di Bologna: personale infermieristico addetto alla preparazione e alla somministrazione dei farmaci antitumorali.

Partecipanti: 50 esposti ad antitumorali (8 maschi e 42 femmine), 50 controlli (8 maschi e 42 femmine) non esposti appaati per sesso, età e abitudine al fumo di sigaretta.

Outcome principali: marcatori urinari di esposizione, espressione di *heat shock proteins* (HSPs) 27, 70, 90 e 110; biomarcatori di stress immunitario: apoptosi, analisi del ciclo cellulare G1-S-G, tipizzazione delle cellule *natural killer* (NK) e dei

recettori per l'IL-2 (CD 25) in linfociti di sangue periferico; frequenza di micronuclei nei linfociti di sangue periferico e nelle cellule esfoliate di mucosa orale; attivazione di *bax*, *bcl2*, *b-actina*.

Risultati: su 50 campioni di urine di personale esposto sono risultati positivi 19 soggetti di cui 3 solo per MTX, 11 solo per CP e 5 positivi per entrambi. Nessun incremento statisticamente significativo è stato osservato per tutti gli altri biomarcatori studiati.

Conclusione: complessivamente lo studio non ha rilevato effetti precoci significativi legati all'esposizione ad antitumorali nella popolazione studiata.

(*Epidemiol Prev* 2005; 29(5-6) Suppl: 91-95)

Parole chiave: farmaci antitumorali, biomarcatori di esposizione, *heat shock proteins*, monitoraggio immunologico, frequenza di micronuclei

Abstract

Objective: to develop a multiple-endpoint monitoring system in order to assess and minimize long term risks in hospital nurses exposed to antitumor drugs.

Design: molecular epidemiology study.

Setting: S. Orsola-Malpighi Hospital in Bologna, Italy: nurses exposed to antitumor drugs.

Participants: 50 exposed subjects (8 males and 42 females) and 50 unexposed individuals (8 males and 42 females) matched for age and smoking habits.

Main outcome measures: urinary markers of exposure, *Heat Shock Proteins* (HSPs) 27, 70, 90, 110, immunologic biomarkers in peripheral blood lymphocytes: apoptosis, cell-cycle analysis G1-

S-G, typization of *Natural Killer* cells (NK) and receptors micronuclei; frequency in peripheral blood lymphocytes and in exfoliated buccal mucosa cells; activation of specific oncogenes (*bax*, *bcl2*).

Results: 19/50 subjects showed urinary antitumor drug levels (3 subjects MTX, 11 subjects CP, 5 subjects MTX and CP). No statistically significant differences were observed in all the considered biomarkers between the exposed and control groups.

Conclusion: this biomonitoring study doesn't evidence any early significant effect associated to the exposure to antitumor drugs.

(*Epidemiol Prev* 2005; 29(5-6) Suppl: 91-95)

Keywords: antitumor drugs, exposure biomarkers, *Heat Shock Proteins*, immunologic biomarkers, micronuclei frequency

Introduzione

I farmaci antiblastici costituiscono un gruppo eterogeneo di composti chimici in grado di inibire la crescita dei tumori mediante diversi meccanismi molecolari;¹ questi farmaci possono indurre differenti effetti acuti e cronici nei pazienti esposti a dosi terapeutiche. Inoltre studi clinici e sperimentali hanno dimostrato che un ampio numero di questi composti sono mutageni, cancerogeni o teratogeni.²

Il personale sanitario preposto alla preparazione dei farmaci, alla loro somministrazione ai pazienti, alle procedure di decontaminazione degli ambienti e di eliminazione dei rifiuti contaminati è soggetto al rischio di esposizione a questi composti. Le possibili vie di contaminazione sono: l'assorbimento attraverso la cute e le mucose, l'inalazione di aerosol ed eventualmente l'iniezione o l'ingestione accidentali.

Un ampio numero di studi di monitoraggio disponibile in letteratura dimostra l'esposizione del personale ospedaliero ad antiblastici attraverso l'individuazione di alcuni composti o loro metaboliti nelle urine³ o la valutazione di effetti biologici precoci, quali danno al DNA,⁴⁻⁶ danno cromosomico⁷⁻¹⁰ o scambi tra cromatidi fratelli¹¹⁻¹³ in «tessuti surrogato», cioè non target diretti dell'effetto tossico, quali i linfociti di sangue periferico o cellule esfoliate della mucosa orale. Altri studi hanno suggerito potenziali interazioni tra esposizione professionale ad antiblastici e alterazioni dell'equilibrio della risposta immunitaria.¹⁴⁻¹⁷

Il progetto IMEPA (Identificazione marcatori esposizione professionale antiblastici, progetto di ricerca del Ministero della salute), per la complessità delle indagini eseguite, ha coinvolto 7 istituti di ricerca con la partecipazione di 18 ricercatori. Scopo del progetto IMEPA era quello di identificare biomarcatori sensibili che potessero migliorare i criteri di valutazione dell'esposizione e contribuire alle strategie di intervento per la riduzione del rischio degli operatori sanitari addetti alla manipolazione dei farmaci antiblastici.

A tal fine è stata considerata una batteria di biomarcatori immunologici quali l'espressione di *heat shock proteins* (HSP), la tipizzazione di cellule citotossiche *natural killer* (NK), l'analisi del ciclo cellulare, dei linfo-monociti di sangue periferico e dei recettori per l'IL-2.

Inoltre è stato effettuato il monitoraggio biologico per la stima del danno genotossico mediante la determinazione della frequenza di micronuclei e l'attivazione di specifici oncogeni. Le variazioni osservate sono state correlate ai dati di esposizione individuale, valutati mediante monitoraggio ambientale e determinazione quantitativa di metotrexate e ciclofosfamide nelle urine.

Soggetti

È stato selezionato un gruppo di infermieri addetti alla preparazione e alla somministrazione di combinazioni di antiblastici e un adeguato numero di controlli sani appaiati agli esposti per sesso, età e abitudine al fumo; questi ultimi soggetti sono

stati scelti tra gli operatori del Policlinico universitario S. Orsola-Malpighi di Bologna non esposti professionalmente. I soggetti considerati operavano in condizioni adeguate e disponevano dei dispositivi di protezione individuale previsti.

Sono stati raccolti mediante un questionario i dati anagrafici e personali, relativi ad affezioni e allergie, abitudine al fumo, dieta, trattamenti terapeutici e diagnostici che potessero costituire fattori confondenti per i biomarcatori considerati.

Nella tabella 1 sono riportate le caratteristiche della popolazione studiata. La maggior parte dei soggetti erano femmine (84%); l'anzianità lavorativa era bassa considerato il *turnover* di questi operatori all'interno delle strutture ospedaliere. Il 54% dei soggetti erano fumatori e altrettanti dichiaravano di essere esposti a fumo passivo.

Materiali e metodi

Determinazione dell'esposizione: marcatori urinari

La determinazione quantitativa di metotrexate (MTX) e ciclofosfamide (CPA) è stata effettuata nelle urine del personale esposto raccolte a fine turno. I campioni di urina sono stati purificati prima dell'analisi. Le due frazioni sono state analizzate separatamente in cromatografia liquida accoppiata a *detector* di massa (LC/ESI-MS/MS).

Limite di quantificazione del metodo: 0,2 µg/l per MTX, 0,06 µg/l per ciclofosfamide.

Espressione di *heat shock proteins*

Per la determinazione dell'espressione di HSPs 27, 70, 90 e 110, dopo aver isolato dal sangue periferico l'anello linfomonocitario, utilizzato come target per l'analisi dell'espressione di HSPs, lo si è sottoposto a lisi proteica; successivamente gli antigeni proteici in esame sono stati separati mediante corsa elettroforetica e rilevati impiegando anticorpi monoclonali e rivelazione del segnale in chemiluminescenza. Le autoradiografie sono state sottoposte ad analisi densitometrica, avvalendosi del programma Image J dell'NIH, e i singoli segnali sono stati espressi in unità arbitrarie dopo normalizzazione per differenze di caricamento (actina) e variabilità *inter-blot* (controllo positivo standard).

Biomarcatori immunologici

Sono state valutate l'apoptosi e l'analisi del ciclo cellulare G1-S-G dei linfo-monociti di sangue periferico. La tipizzazione delle cellule citotossiche *natural killer* (NK) e dei recettori per l'IL-2 (CD 25) è stata eseguita mediante l'uso del citofluorimetro e degli anticorpi monoclonali diretti contro gli antigeni di superficie specifici. Dopo aver isolato su gradiente di *lymphoprep* l'anello linfomonocitario, le cellule sono state marcate con i vari anticorpi monoclonali (10 µl di mAb su 200.000 cellule); si è effettuata la lettura al citofluorimetro dopo 1 ora di incubazione a +4 °C per CD16/56 e CD25 e dopo 24 ore di incubazione a +4 °C per HSP 25, 70 e 90 KDa.

Per l'analisi del ciclo cellulare e la valutazione dell'apoptosi le cellule separate come detto in precedenza sono state coltivate per 24 ore in terreno RPMI1640 a 37 °C in 5% CO₂ quin-

di incubate per 60 minuti con ioduro di propidio (50 mg/ml) alla presenza di RNase (10 mg/ml); questo metodo ha consentito di misurare la quantità di DNA in ogni cellula.

La distribuzione degli eventi cellulari nelle varie fasi del ciclo è stata determinata usando un citofluorimetro Coulter, EPICS XL (Hialeah, FL, USA), equipaggiato con un laser ad argon a 488 nm e con il programma Multicycle for DNA content and cell cycle analysis. La IL-6 è stata determinata su siero con test immunoenzimatico (Quantikine, R&D System, Milano).

Danno citogenetico: il test del micronucleo

Test del micronucleo nelle cellule della mucosa orale. Le cellule di mucosa orale raccolte e conservate in ghiaccio sono pervenute al laboratorio entro 24 ore dal prelievo. Dopo centrifugazione e lavaggio con soluzione salina le cellule sono state gocciate su vetrini, fissate in metanolo e colorate con arancio di acridina. La frequenza dei micronuclei è stata determinata mediante l'osservazione con microscopio a fluorescenza di 4.000-5.000 cellule/soggetto.

Test del micronucleo nei linfociti di sangue periferico. I campioni di sangue sono stati raccolti in quantità di 2-3 ml, in provette eparinate. Per ciascun soggetto sono state allestite 2 coltu-

re in parallelo. A 44 ore di coltura veniva aggiunta la citocalasina B. Dopo 72 ore di incubazione a 37 °C il sangue della coltura è stato centrifugato, trattato con soluzione ipotonica (KCL 0,075M). Le cellule sono state fissate quindi gocciate su vetrini e poi colorate con Giemsa. La frequenza di micronuclei è stata valutata su un numero totale di 2.000 linfociti con citoplasma integro per ciascun soggetto.

Attivazione di oncogeni

Per lo studio degli mRNA di bax, bcl2 β -actina, il cDNA a singolo filamento è stato preparato aggiungendo 1 μ g di RNA alla seguente miscela: 50 mM Tris-Cl (pH 8,3), 75 mM MgCl₂, 20 μ M dNTP, 20 pmol random hexamers, 20U Rnase inhibitor, 5 mM DTT and 200U MMLV trascrittasi inversa. Due microlitri di cDNA sono stati amplificati con 1U Taq DNA Polymerase con 15 pmol di primers 5' e 3', 10 mM Tris-Cl, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 300 μ M dNTP in un volume finale di 30 μ l. La sequenza nucleotidica dei primers utilizzati è: bax 5'-gacgaactggacagtaaacatg-3'(sense), 5'-aggaagtccaatgtccagcc-3' (antisense), bcl2 5'-tcactgtgtg-gagagcgtcaa-3'(sense), 5'-ctactgcttagtgaaaccttttc-3' (antisense), B-actina 5'-ttcaaggtagtttcgtggat-3' (sense), 5'-gaaaatctggcaccacacctt-3' (antisense) (NicAmhloibh R et al,

1999). L'amplificazione è stata eseguita per 25 cicli secondo il seguente programma: denaturazione a 94° per 1 minuto, appaiamento a 60° per 45 secondi, estensione a 72° per 2 minuti. Per consentire l'analisi semiquantitativa l'actina è stata amplificata come standard interno. Dodici microlitri sono stati sottoposti a elettroforesi su gel di agarosio al 2%, colorato con etidio bromuro e visualizzato su transilluminatore UV. Le immagini sono state fotografate, acquisite con uno scanner, e confrontate utilizzando un software per la quantificazione (Quantity One, Biorad).

		non esposti	esposti	totale
sesso	M	8	8	16
	F	42	42	84
età media		35,18	35,02	35,1
Bmi		23,37	23,08	23,22
anzianità lavorativa		9,57	10,15	9,87
anni di lavoro a rischio		0	8,25	4,12
fumatori	n.	27	27	54
	n. sigarette	9,96	10,65	10,30
	n. anni fumo	10,33	12,00	11,15
ex fumatori	n.	8	3	11
	n. sigarette	12,12	9,67	11,45
	n. anni di fumo	7,52	8,67	7,84
	n. anni senza fumo	7,37	6,33	7,09
fumo passivo	no	30	16	46
	sì	20	34	54
alcool	mai	25	20	45
	2-4 bicchieri/settimana	6	10	16
	2-4 bicchieri/die	19	20	39
consumo frutta (porzioni)	mai	2	2	4
	<1 volta/die	12	10	22
	1 volta/die	17	23	40
	>1 volta die	19	15	34
consumo verdura (porzioni)	mai	2	2	4
	<1 volta/die	12	14	26
	1 volta/die	16	19	35
	>1 volta die	20	15	35
consumo carne/pesce alla brace	mai	11	13	24
	<1 volta/die	14	12	26
	1 volta/die	12	8	20
	>1 volta die	13	17	30

Tabella 1. Caratteristiche del campione analizzato.

Table 1. General characteristics of the studied groups.

Risultati

Nella tabella 2 sono riportati i risultati ottenuti con i diversi biomarcatori nella popolazione considerata. Su 50 campioni di urine di personale esposto sono risultati positivi 19 soggetti di cui 3 solo per MTX, 11 solo per CP e 5 positivi per entrambi.

Il fatto che non siano state osservate differenze statisticamente significative nell'espressione di HSP 27, 70, 90, 110 tra i due gruppi a confronto, suggerisce l'assenza di una correlazione tra esposizione professionale ad anti-blastici e modulazione di marcatori *heat shock*.

I parametri immunologici rivelano valori non dissimili nei due gruppi di soggetti, sebbene un incremento di IL-6 nel siero sia stato osservato negli esposti e si riveli significativo nel gruppo di soggetti con monitoraggio biologico positivo, nei quali si osserva anche un aumento dell'attivazione linfo-

citaria, espressa dalle cellule positive per CD25. Non si è riscontrata una differenza statisticamente significativa tra i gruppi esposti/controlli per le cellule NK deputate alla citotossicità aspecifica soprattutto nei confronti di cellule trasformate (neoplastiche o in apoptosi).

Tabella 2. Analisi di marcatori di esposizione a farmaci antineoplastici.

CP= ciclofosfamide; HSP= heat shock protein; MN= micronucleo; MTX= metotrexate; ^a= significatività statistica al test di Mann-Whitney per il confronto fra due popolazioni; ^b= analisi effettuata tramite Western Blotting. I valori sono riportati in unità di misura arbitrarie ricavate dall'analisi densitometrica del segnale di HSP normalizzato rispetto al controllo (vedi «Materiali e metodi»); ^c= analisi effettuata tramite citofluorimetria. I valori sono riportati in numero di cellule positive all'analisi citofluorimetria.

Table 2. Biomonitoring of nurses occupationally exposed to antineoplastic drugs: summary of the results.

CP= cyclophosphamide; HSP= heat shock protein; MN= micronuclei; MTX= metotrexate; ^a= statistical significance by Mann-Whitney test; ^b= analysis carried out by Western Blotting. The results are reported as arbitrary units obtained by a densitometric detection of the HSP signal; ^c= analysis carried out flowcytometry. The results are expressed as number of positive cells.

Endpoint		non esposti (n. osservaz.)	esposti (n. osservaz.)	totale	P ^a	
marcatori urinari (monitoraggio biologico)	CP (ppb)	-	0,06-10 (11)	-	-	
	MTX (ppb)	-	0,3-2 (3)	-	-	
	CP (ppb)	-	0,06-2,0	-	-	
	MTX (ppb)	-	0,3-2,0 (5)	-	-	
marcatori precoci di stress	HSP 90	0,13 ^b (1)	1 ^b (1)	0,56 ^b (2)	0,317	
		11,95 ^c (48)	12,93 ^c (50)	12,45 ^c (98)	0,493	
	HSP 70	0,33 ^b (9)	0,30 ^b (4)	0,32 ^b (13)	0,758	
		12,48 ^c (48)	13,79 ^c (50)	13,15 ^c (98)	0,160	
	HSP 27	4,04 ^b (47)	4,43 ^b (49)	4,24 ^b (96)	0,203	
	HSP 25	9,51 ^c (48)	10,52 ^c (50)	10,02 ^c (98)	0,531	
marcatori di stress immunitario	CD 25	14,60 (48)	14,22 (50)	14,41 (98)	0,878	
	CD 16	12,56 (48)	11,68 (50)	12,11 (98)	0,527	
	prolattina (µUI/ml)	378,17 (48)	298,18 (50)	337,36 (98)	0,887	
	cortisolo (ng/ml)	138,08 (48)	149,16 (50)	143,73 (98)	0,641	
	TNFα (pg/ml)	4,93 (48)	5,50 (50)	5,22 (98)	0,708	
	IL-6 (pg/ml)	8,01 (48)	15,48 (50)	11,82 (98)	0,138	
ciclo cellulare e apoptosi	apoptosi	4,72 ^c (39)	4,51 ^c (39)	4,61 ^c (78)	0,397	
	G1	86,85 ^c (39)	87,13 ^c (39)	86,99 ^c (78)	0,968	
	S	0,90 ^c (39)	0,79 ^c (39)	0,85 ^c (78)	0,870	
	G2	2,59 ^c (39)	2,90 ^c (39)	2,74 ^c (78)	0,766	
danno citogenetico	linfociti periferici	MN totali	22,19 (43)	23,33 (42)	22,75 (85)	0,398
		MN/1.000	12,10 (43)	12,63 (42)	12,36 (85)	0,607
	mucosa buccale	MN totali	3,56 (48)	3,16 (50)	3,36 (98)	0,994
		MN/1.000	0,89 (48)	0,79 (50)	0,84 (98)	0,968
oncogeni	bax/actina	5,54 (39)	4,65 (39)	5,09 (78)	0,708	
	bcl2/actina	2,20 (36)	49,33 (37)	26,09 (73)	0,175	
	bcl2/bax	1,06 (38)	0,96 (38)	1,01 (76)	0,240	

I livelli di esposizione dei soggetti, anche con monitoraggio positivo, non sono sufficienti a indurre un incremento nella frequenza di micronuclei (MN) sia nei linfociti binucleati di sangue periferico sia nelle cellule esfoliate di mucosa orale. L'analisi della frequenza di MN nei linfociti di sangue periferico rivela, tuttavia, un trend di incremento negli esposti rispetto ai controlli.

Infine non si è riscontrata una differenza statisticamente significativa nei valori di espressione dei geni bcl2 e bax, sia per quanto riguarda l'espressione dei singoli geni sia per l'eventuale rapporto tra di essi, tra soggetti con monitoraggio biologico positivo, soggetti con monitoraggio biologico negativo e soggetti non esposti.

Conclusioni

Un'analisi complessiva dei risultati ottenuti con la batteria di biomarcatori considerata non evidenzia alcun effetto significativo nel gruppo di soggetti potenzialmente esposti rispetto ai controlli. Anche se occorre sottolineare che le dimensioni limitate delle popolazioni studiate limita la potenza statistica dello studio e non consente di rilevare piccole differenze tra i gruppi, è comunque evidente che, qualora vengano messe in atto tutte le procedure tecniche, organizzative e comportamentali tali da operare in condizioni di sicurezza, non è rilevabile alcuna indicazione significativa di effetti precoci per la popolazione studiata.

Si conferma inoltre l'importanza del monitoraggio biologico, cioè il dosaggio dei farmaci nei liquidi biologici del lavoratore, che permette di stimare l'entità dell'assorbimento dei farmaci manipolati attraverso le diverse vie di esposizione. I risultati hanno dimostrato la presenza di farmaci antiblastici nelle urine dei lavoratori esposti soltanto nelle situazioni in cui non venivano seguite procedure di lavoro corrette (uso di dispositivi di protezione individuale eccetera). Alcuni dati significativi riferiti ai biomarcatori immunologici sono emersi, infatti, non tanto confrontando il gruppo degli esposti con quello dei controlli, quanto scomponendo il campione in soggetti con monitoraggio biologico positivo, soggetti con monitoraggio biologico negativo e soggetti non esposti.

Bibliografia

1. McDiamid MA, Gurley HT, Arrington D. Pharmaceuticals as hospital hazards: managing the risks. *J Occup Med* 1991; 33: 155-58.
2. IARC. *Some antiviral and antineoplastic drugs and other pharmaceutical agents*. Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Vol. 76, 2000.
3. Falk K, Grohn O, Sorsa M, Vainio H, Heinonen E, Holsti LR. Mutagenicity of urine in nurses occupationally exposed to antineoplastic drugs in an oncology department. *Lancet* 1979; 1: 1250-51.
4. Fuchs J, Hengstler JG, Jung D et al. DNA damage in nurses handling antineoplastic agents. *Mutat Res* 1995; 342: 17-23.
5. Kopjar N, Garaj-Vrhovac V. Application of the alkaline comet assay in human biomonitoring for genotoxicity: a study on Croatian medical personnel handling antineoplastic drug. *Mutagenesis* 2001; 16: 71-78.
6. Kopjar N, Garaj-Vrhovac V, Milas I. Assessment of chemotherapy-induced DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer patients using the alkaline comet assay. *Teratogen Carcinog Mutagen* 2002; 22: 13-30.
7. Jakab MG, Major J, Tompa A. Follow-up genotoxicological monitoring of nurses handling antineoplastic drug. *J Toxicol Environ Health A* 2001; 62: 307-18.
8. Hessel H, Radon K, Pethran A et al. The genotoxic risk of hospital, pharmacy and medical personnel occupationally exposed to cytostatic drugs—evaluation by themicronucleus assay. *Mutat Res* 2001; 497: 101-09.
9. Maluf SW, Erdtmann B. Follow up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 2000; 471: 21-27.
10. Machado-Santelli GM, Cerqueira EM, Oliveira CT et al. Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. *Mutat Res* 1994; 322: 203-08.
11. Pilger A, Kohler I, Mader RM et al. Long-term monitoring of sister chromatid exchanges and micronucleus frequencies in pharmacy personnel occupationally exposed to cytostatic drugs. *Int Arch Occup Environ Health* 2000; 73: 442-48.
12. Norppa H, Sorsa M, Vainio H et al. Increased sister chromatid exchange frequencies in lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs. *Scand J Work Environ Health* 1980; 6: 299-301.
13. Oestereicher U, Stephan G, Glatzel M. Chromosome and SCE analysis in peripheral lymphocytes of persons occupationally exposed to cytostatic drugs handled with and without use of safety covers. *Mutat Res* 1990; 242: 271-77.
14. Hu W, Wu W, Yeung SC, Freedman RS, Kavanagh JJ, Verschraegen CF. Increased expression of HSP70 in adherent ovarian cancer and mesothelioma following treatment with manumycin, a farnesyl transferase inhibitor. *Anticancer Res* 2002; 22(2A): 665-72.
15. Los M, Burek CJ, Stroh C, Benedyk K, Hug H, Mackiewicz A. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design. *Drug Discov Today* 2003; 8(2): 67-77.
16. Frankfurt OS, Krishan A. Apoptosis enzyme-linked immunosorbent assay distinguishes anticancer drugs from toxic chemicals and predicts drug synergism. *Chem Biol Interact* 2003; 145(1): 89-99.
17. Kim SH, Kim D, Jung GS, Um JH, Chung BS, Kang CD. Involvement of c-jun NH(2)-terminal kinase pathway in differential regulation of heat shock proteins by anticancer drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262(2): 516-22.