

## CITOGENETSKE PROMENE U OSOBA IZLOŽENIH POLIHLOOROVANIM BIFENILIMA

G. Joksić i B. Marković

Institut za medicinu rada i radiološku zaštitu »Dr Dragomir Karajović«, Beograd

Primljeno 20. XII. 1990.

U grupi radnika izloženih polihlorovanim bifenilima obavljene su sledeće citogenetske analize: analiza strukturnih hromozomskih aberacija u limfocitima u prvoj *in vitro* deobi, analiza učestalosti mikronukleusa u binuklearnim limfoblastima indukovanih citohalazinom B i analiza izmena sestrinskih hromatida u limfocitima periferne krvi u drugoj *in vitro* deobi u kulturi. Analizom je obuhvaćeno 48 ispitanika izloženih polihlorovanim bifenilima (iz dve različite fabrike) i 15 ispitanika neekspozovane, kontrolne grupe. Kod 16 pacijenata nađena je povećana učestalost nestabilnih hromozomskih aberacija (dicentričnih hromozoma, prstenastih hromosoma i acentričnih fragmenata), 19 ispitanika je bilo bez strukturnih hromozomskih aberacija, kod 11 ispitanika nađene su promene tipa hromozomskih i hromatidnih prekida koje nalazimo i kod neekspozovanog stanovništva. Kod dva ispitanika nađene su stabilne hromozomske aberacije (translokacije i inverzije). Učestalost mikronukleusa, kao i izmena sestrinskih hromatida povećana je u ekspanovanoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu neekspozovanog stanovništva.

*ključne reči:* hemijski mutageni, hromozomske aberacije, izmena sestrinskih hromatida, limfociti, mikronukleus, profesionalna izloženost.

Ispitivanja hromozomskih aberacija u limfocitima periferne krvi čine jednu od nezamenljivih metoda u proceni oštećenja genetičkog materijala nakon delovanja jonizujućeg zračenja. Dugogodišnja ispitivanja dejstva različitih mutagenih agenasa na genetički materijal pokazala su da mnogi hemijski mutageni takođe mogu dovesti do nastajanja hromozomskih aberacija. Rezultate izuzetno kompleksnih studija na različitim *in vitro* sistemima, *Naturajan* i *Obe* prezentirali su 1984. godine u vidu modela DNA lezija, koji pokazuje da mnogi hemijski mutageni svojim dejstvom dovode do stvaranja lezija na DNA, koje predstavljaju osnov za nastajanje hromozomskih aberacija (1). Ipak, hromozomske aberacije nisu samo rezultat direktne interakcije mutagena i ćelijske DNA. U nastajanju hromo-

---

\* *Opaska Uredništva:* Ovo priopćenje tiskano je na jeziku na kojem je bilo primljeno, recenzirano i prihvaćeno za tisak.

zomskih aberacija veliku ulogu imaju procesi replikacije i reparacije, koji deluju u sintetskoj i postsintetskoj fazi ćelijskog ciklusa. Iako je analiza strukturnih hromozomskih aberacija nezamenljiva u ispitivanjima uticaja različitih mutagena na humane ćelije, zahtevi za maksimalnu tačnost su sve veći te su od ogromne koristi i druge metode na osnovu kojih se mogu proceniti oštećenja genetičkog materijala. Metodom analize mikronukleusa CB («citohalazin blok») mogu se dobiti dragoceni podaci o stepenu oštećenja genetičkog materijala. Deobom humanih limfocita, čiji kariotip sadrži određene strukturne hromozomske aberacije, formiraju se mikronukleusi. Otkinuti delovi hromozoma, acentrični fragmenti pa čak i celi hromozomi, koji nisu uspešno podeljeni u anafazi ćelijske deobe, ostaće odvojeni od glavnog jedra i u citoplazmi ćelije formiraće mala jedra – mikronukleuse. Učestalost mikronukleusa kao pokazatelja oštećenja genetičkog materijala, može se koristiti samo onda kada se izrazi u odnosu na ćelijsku populaciju koja je prošla jednu deobu u kulturi. Korišćenjem citohalazina B dobijamo binuklearne limfoblaste, koji su prošli samo jednu deobu u kulturi, a vrlo ih je lako razlikovati od ostalih interfaznih blasta.

U našem ispitivanju pored hromozomskih aberacija i učestalosti mikronukleusa ispitivana je i učestalost izmena sestrinskih hromatida, jer je poznato da učestalost izmena sestrinskih hromatida može biti osetljiv indikator DNA oštećenja.

### ISPITANICI I METODE

Ispitivanjem su obuhvaćene dve grupe radnika iz dve različite fabrike (ekspozovana grupa I i II). Radnici I grupe radili su na proizvodnji kondenzatora. Tehnološki postupak proizvodnje kondenzatora podrazumeva korišćenje ulja pod komercijalnim nazivom Pyralen. Radnici na ovim poslovima (motači kalemova, monter kondenzatora, radnici na impregnaciji i poslovima metalizacije) izloženi su tzv. otvorenim polihlorovanim bifenilima (PCB) i metodom indirektno procene intenziteta ekspozicije smatraju se najizloženijima (PCB-u. Prva grupa ispitanika brojala je 26 ljudi. Druga grupa (22 radnika) radila je na poslovima u trafostanicama (uklopničari, rukovaoci postrojenjima) i bili su izloženi tzv. zatvorenom PCB-u. Citogenetski su ispitani samo radnici koji su bili zdravi, a to znači da su bili bez znakova neke akutne bolesti, da nisu uzimali lekove zbog hroničnih bolesti i da nisu bili dijagnostički pregledani rendgenom u poslednjih godinu dana. Prosečna starost ispitanika prve grupe iznosila je  $42,52 \pm 10,59$  godina, a druge grupe  $35,88 \pm 8,78$  godina. Ekspozicioni radni staž u obe grupe bio je približno isti i iznosio je  $14,47 \pm 8,4$  za prvu grupu i  $13,56 \pm 8,27$  za drugu grupu. Kontrolnu grupu činilo je 15 ispitanika, zdravih ljudi (profesori jedne škole) koji na svojim radnim mestima nisu bili izloženi mutagenim agensima ili jonizujućem zračenju. Prosečna starost ispitanika kontrolne grupe iznosila je  $44,90 \pm 9,6$  godina.

Za analizu hromozomskih aberacija postavljene su kulture limfocita u medijumu RPMI-1640, uz dodatak 0,2% autolognog seruma i 0,1% fitohemaglutinina. Fiksacija i preparacija hromozoma obavljena je nakon 48 sati inkubacije na 37 °C uz dodatak 0,1% kolcemida poslednja tri sata inkubacije, kada se najveći broj limfocita nalazio u prvoj *in vitro* deobi. Preparirana ćelijska suspenzija se zatim nanosi na predmetna stakla, suši i boji Gimza bojom. Za analizu mikronukleusa korišćena je modifikovana metoda *Fenecha i Morelya* (2): postavljene su kulture limfocita na isti način, a nakon 48 sati inkubacije na 37 °C, svakoj limfocitnoj kulturi je dodat citohalazin B u finalnoj koncentraciji 3 µg/ml medijuma. Inkubacija kultura se zatim nastavi još 24 sata, nakon čega se ćelije fiksiraju. Dobijena suspenzija ćelija u kojoj su i binuklearni limfoblasti nanosi se zatim na predmetna stakla i boji Gimza bojom. Za analizu izmena sestrinskih hromatida korišćena je metoda po *Perryu*

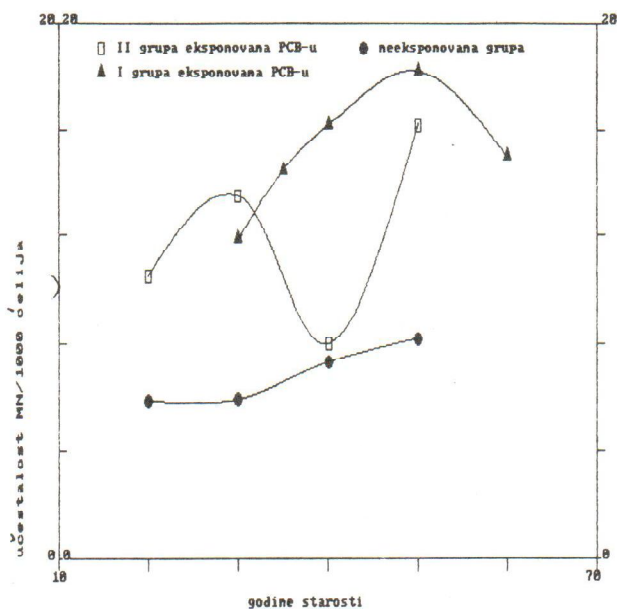


i Wollfu (3): limfocitnim kulturama dodaje se BrdU u koncentraciji 8  $\mu\text{g/ml}$  kulture. Nakon 56 sati inkubacije na 37 °C, uz dodatak kolcemida poslednja tri sata inkubacije, vrši se fiksacija, a dobijena ćelijska suspenzija nanosi na predmetna stakla i diferencijalno boji.

## REZULTATI

Rezultati analize hromozomskih aberacija, učestalosti mikronukleusa i izmena sestričnih hromatida u 48 ispitanika profesionalno izloženih dejstvu polihlorovanih bifenila prikazani su na tabeli. Za svakog ispitanika analizirano je 200 metafaza u prvoj *in vitro* deobi a analizirano je ukupno 9600 ćelija. U prvoj grupi eksponovanih radnika nađena je veća učestalost dicentričnih hromozoma, (koji čine 18% svih strukturnih hromozomskih aberacija), dok u drugoj grupi dicentrični hromozomi čine 10% ukupnih strukturnih hromozomskih aberacija. Značajna je i učestalost acentričnih fragmenata. Stabilne hromozomske aberacije koje su nađene u drugoj grupi eksponovanih radnika veoma je teško interpretirati, s obzirom na to da se radi o promenama u kariotipu koje se mogu dosta dugo održavati te nije sasvim sigurno njihovo poreklo (posledica profesionalne ekspozicije ili medicinske rendgenske dijagnostike, s obzirom na to da se ispitanici ne mogu uvek setiti svakog pregleda unazad nekoliko godina).

Ostale hromozomske aberacije (hromozomski i hromatidni prekidi) pripadaju kategoriji strukturnih promena koje se mogu naći i kod stanovništva koje profesionalno nije izloženo delovanju mutagenih agenasa. Citogenetski je obrađeno i 15 ispitanika kontrolne grupe. Za svakog od njih analizirano je po 200 metafaza u prvoj *in vitro* deobi na prisustvo



Slika 1. Učestalost mikronukleusa u ispitivanim grupama

hromozomskih aberacija. Ukupno je analizirano 3000 ćelija, a od hromozomskih aberacija nađen je jedan hromozomski i četiri hromatidna prekida.

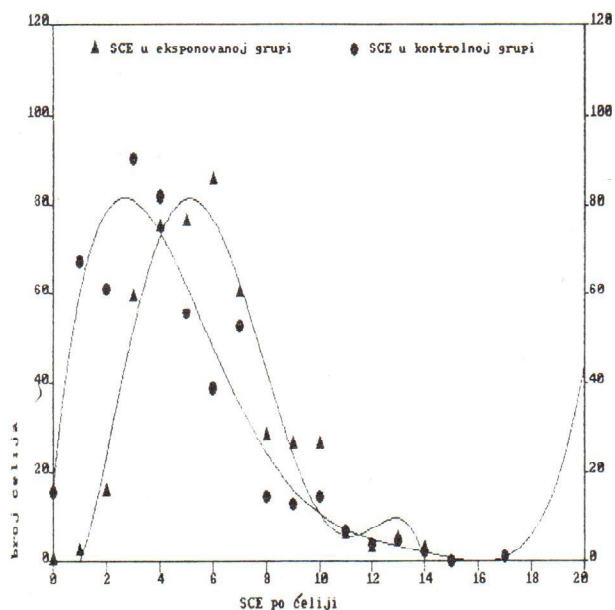
Prosečna vrednost mikronukleusa na 1000 analiziranih binuklearnih limfoblasta indukovanih citohalazinom B u I grupi eksponovanih radnika iznosi  $15,94 \pm 12,5$ , u drugoj grupi  $10,86 \pm 7,41$ , dok u kontrolnoj grupi prosečna učestalost mikronukleusa iznosi  $10,16 \pm 5,63$ . Iako na spontanu učestalost mikronukleusa utiče dob ispitanika, postoji sasvim jasna razlika u prinosu mikronukleusa između eksponovane i kontrolne grupe (tabela, slika 1).

Tabela

*Učestalost hromozomskih aberacija, mikronukleusa i izmena sestrinskih hromatida u eksponovanoj i kontrolnoj grupi*

Grupa	Broj analiziranih ćelija	Hromozomske aberacije	Srednja vrednost MN	Učestalosti SCE
eksponovana grupa I (26 radnika)	5200	5 dicentrika 7 acentrika 12 hromoz. prekida 7 hromatid. prekida	$15 \pm 12,5$	$8,21 \pm 1,52$
eksponovana grupa II (22 radnika)	4400	2 dicentrika 1 prstenasti hromozom 1 acentrik 2 translokacije 2 inverzije 6 hromozom. prekida 1 hromatid. prekid	$10,86 \pm 7,41$	$8,05 \pm 1,39$
ukupno eksponovana grupa	9600	7 dicentrika 1 prstenasti hromozom 2 translokacije 2 inverzije 8 acentrika 18 hromozom. prekida 8 hromatid. prekida	$13,61 \pm 9,55$	$8,14 \pm 1,47$
kontrolna grupa	3000	1 hromozom. prekid 4 hromatid. prekida	$10,16 \pm 5,63$	$4,33 \pm 0,99$

Učestalost izmena sestrinskih hromatida u eksponovanoj grupi takođe pokazuje veće vrednosti ( $8,14 \pm 1,47$ ) izmena po ćeliji u odnosu na kontrolnu grupu ( $4,33 \pm 0,99$  izmena po ćeliji). Iako je jasna razlika u učestalosti izmena sestrinskih hromatida između kontrolne i eksponovane grupe (u kontrolnoj grupi najveći broj ćelija sadrži tri izmene po ćeliji, dok u eksponovanoj grupi najveći broj ćelija sadrži pet izmena), po literaturnim podacima obe vrednosti spadaju u normalne (4). Učestalost izmena sestrinskih hromatida u obe ispitivane grupe predstavljena je na tabeli i slici 2.



Slika 2. Učestalost izmena sestrinskih hromatida u eksponovanoj i kontrolnoj grupi

#### DISKUSIJA

Rezultati analize hromozomskih aberacija i mikronukleusa u limfocitima periferne krvi ljudi izloženih PCB-u pokazuju povećanu učestalost hromozomskih aberacija kod 18,7% ispitanika (gde su nađeni dicentrični i prstenasti hromozomi). Hromozomske aberacije nisu nađene kod 40% ispitanika, dok su u limfocitima ostalih ispitanika (41,4%) nađene hromozomske aberacije (hromozomski i hromatidni prekidi) koje se mogu naći i kod neekspozovanog stanovništva. Rezultati našeg ispitivanja ukazuju na značajne promene na genetičkom materijalu u uslovima profesionalne ekspozicije PCB-u, naročito pri radu sa »otvorenim« PCB-om. Rad sa »zatvorenim« PCB-om je sa znatno manjim rizikom, što potvrđuje i nalaz hromozomskih aberacija.

Literaturni podaci koji se odnose na biološke efekte PCB-a u uslovima profesionalne ekspozicije su veoma oskudni. Većina literaturnih podataka odnosi se na eksperimentalno ispitivanje dejstva PCB-a na različitim eksperimentalnim model-sistemima (drozofilama, ćelijama kineskog hrčka ili bakterijskim sistemima). Naučnici u svojim radovima (5-7) skreću pažnju na interakciju metabolita PCB-a sa ćelijskim makromolekulima. Za tetrahlorobifenil (2,2',5,5') i njegove metabolite postoje dokazi da u ćeliji mogu da izazovu jednolančane prekide DNA lanca (8), iako Amesovim testom mutagenosti nije dokazano genotoksično dejstvo (9). Studije na eksperimentalnim životinjama su pokazale da dugotrajna ekspozicija malim dozama PCB-a može indukovati tumore na različitim organima (najčešće je zahvaćena jetra, limfatični i hematopoetski sistem) (10).



Ispitivanja hromozomskih aberacija u limfocitima periferne krvi rađena su kod lica akutno izloženih većim koncentracijama PCB-a (prilikom retkih akcidenata u elektroindustriji, najčešće prilikom požara), ali hromozomske aberacije nisu nađene (11). Što se genotoksičnih efekata tiče, smatra se da PCB ima pre ulogu u promociji nego u inicijaciji (10). Tretman eksperimentalnih životinja polihlorovanim bifenilima izaziva snažnu indukciju sinteze NADP-zavisnih citohrom P-448/P-450 oksidaza, koje imaju ključnu ulogu u transformaciji neutrofilnih hemijskih agenasa – promutagena u reaktivne, elektrofilne derivate (12). Na taj način prisustvo polihlorovanih bifenila pojačava dejstvo potencijalnih mutagena. Efekti PCB-a jako zavise i od broja izomernih oblika i vrste izomera: npr. planarni tetrahlorbifenil 3,4,3',4', uzrokuje hromozomske aberacije u kulturi limfocita *in vitro* i tom prilikom je učestalost hromozomskih aberacija zavisila od doze PCB-a u kulturi. Drugi oblik, neplanarni PCB 2,5,2',5', ne dovodi do formiranja hromozomskih aberacija, ali kada se limfocitnoj kulturi doda mešavina ova dva oblika PCB-a, učestalost hromozomskih aberacija je mnogo veća nego pojedinačnih izomera PCB-a (13).

Analiza radnih mesta naših ispitanika jasno je pokazala da se hromozomske aberacije najčešće nalaze kod ljudi koji rade na procesima metalizacije ili pranja i odmaščivanja, gde su pored PCB-a izloženi dejstvu različitih metala ili organskih rastvarača. Taj podatak potkrepljuje pretpostavku da su hromozomske aberacije posledica sinergetskog dejstva PCB-a i potencijalnih mutagena trenutno prisutnih u organizmu.

Istraživanje bioloških efekata PCB-a u uslovima profesionalne ekspozicije svakako treba nastaviti i uz pomoć metoda direktne procene izloženosti PCB-u odrediti što jasniju relaciju između dužine ekspozicije i citogenetskih promena.

#### ZAKLJUČAK

Citogenetska ispitivanja u grupi radnika profesionalno izloženih PCB-u (u dva oblika: »otvorenom« i »zatvorenom«) pokazala su značajne promene na genetičkom materijalu pri dugotrajnoj ekspoziciji ovoj noksi. Pri tome su citogenetske promene veće u grupi koja radi sa »otvorenim« PCB-om. Analiza radnih mesta ljudi koji rade sa otvorenim PCB-om pokazala je da se hromozomske aberacije najčešće nalaze kod osoba koje su pored PCB-a istovremeno izložene organskim rastvaračima ili teškim metalima, što navodi na pretpostavku da su hromozomske aberacije posledica sinergetskog dejstva ovih toksičnih noksi.

#### LITERATURA

1. Natarajan AT, Obe G. Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. *Chromosoma* (Berlin), 1984;22:120-7.
2. Fenech M, Morely AA. Cytokinesis – block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low-dose X-irradiation. *Mutat Res* 1988;161:193-8.
3. Perry P, Wolff S. Differential giemsa staining of sister chromatids and the study of SCEs without autoradiography. *Chromosoma* 1974;48:344-58.
4. Carrano AV, Minkler JL, Stetku DG, Moore DH. Variation in the baseline SCE frequency in human lymphocytes. *Mutat Res* 1980;2:325-38.
5. Hesse S, Mezger M, Wolff T. et al. Activation of 14 chlorobiphenyls to protein-binding metabolites by rat liver microsomes. *Chem Biol Interact* 1978;20:355-65.
6. Hargraves WA, Allen JR. The *in vitro* binding of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl metabolites to rat liver microsomal proteins. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1979;25:33-52.

7. Wyndham C, Devenish J, Safe S. *et al.* The *in vitro* metabolism, macromolecular binding and bacterial mutagenicity of 4-chlorobiphenyl, a model PCB substrate. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1976;15:563-70.
8. Stadnicki SS, Lin FS, Allen JR. *et al.* DNA single-strand breaks caused by 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl and its metabolites. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1979;24:313-27.
9. Sheny R. Mutagenicity testing of chlorinated biphenyls and chlorinated dibenzofurans. *Mutat Res* 1982;101:45-56.
10. Iitula ML. Mutagenicity of PCBs and their pyrosynthetic derivates in cell-mediated assay. *Environ Health Perspect* 1985;60:255-7.
11. Rantanen JH, Silano VJ, Tarkowski S, Yrjanheikki E. (ur). PCBs, PCDDs and PCDFs: Prevention and control of accidental and environmental exposures. WHO: Environmental Health 1987;150-2.
12. Zimonjić D. Mutageni i kancerogeni u ljudskoj ishrani i vodi za piće: mehanizmi interakcija sa naslednim materijalom i moguće posledice njihovog dejstva. *Hrana i ishrana* 1984;30:101-8.
13. Sargent L, Roloff B, Meisner L. *In vitro* chromosome damage due to PCB interactions. *Mutat Res* 1989;224:79-88.

### Summary

#### CYTOGENETIC CHANGES IN PERSONS OCCUPATIONALLY EXPOSED TO POLYCHLORINATED BIPHENYLS

A cytogenetic study performed in a group of workers exposed to polychlorinated biphenyls comprised analysis of structural chromosomal aberrations in the lymphocytes in the first division *in vitro*, analysis of micronuclei frequency in binuclear lymphoblasts induced by cytochalasin B and analysis of sister chromatid exchanges. The study included 48 exposed workers and 15 controls. In 16 exposed workers increased incidence of unstable chromosomal aberrations (dicentric, rings and acentric) was found, while in 19 no structural chromosomal aberrations could be detected. In 11 workers changes defined as chromosomal and chromatid breaks were noted. This type of change, however, can be evidenced in a non-exposed population as well. In two workers stable chromosomal aberrations were recorded (translocations and inversions). The incidence of micronuclei as well as exchange of sister chromatids were elevated in the exposed group of workers compared to controls.

»Dr Dragomir Karajović« Institute of Occupational and Radiological Health, Beograd

*Key terms:* chemical mutagens, chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, lymphocytes, micronucleus, occupational exposure.