

## POTENCIJALNI GENOTOKSIČNI UČINAK CITOSTATIKA NA PROFESIONALNO IZLOŽENO OSOBLJE

V. Brumen i Đ. Horvat

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

*Primljeno 4. XII. 1991.*

S obzirom na poznate citotoksične učinke citostatika, željelo se upozoriti na moguće mutagenetske implikacije profesionalne izloženosti ovim agensima. Obrađena je skupina od 21 medicinske sestre koje rade s citostaticima, kao i odgovarajuća kontrolna skupina. Korištena je konvencionalna metoda za testiranje kemijskih mutagena – metoda izmjena sestara kromatida, SCE. Iako se rezultati dobiveni u izloženoj skupini nisu statistički značajno razlikovali od kontrole, visoki rasponi SCE vrijednosti u ispitanica koje rade s citostaticima potvrđuju sumnju na genotoksični učinak ovih agenasa.

*Ključne riječi:* interferentni faktori, medicinske sestre, metoda izmjena sestara kromatida, testiranje kemijskih mutagena.

Citostatici se definiraju kao skupina kemijskih agenasa koji sprečavaju rast i diobu stanice. Ova njihova osobina široko se primjenjuje u antineoplastičkoj terapiji, s obzirom na to da izvornim djelovanjem na ciklus tumorskih stanica usporavaju ili zaustavljaju rast malignoma. Međutim, učinci citostatika su neselektivni pa se suvremena antineoplastička terapija suočava s dva bitna problema; sekundarnim citostatičkim djelovanjem antineoplastika i na netumorska tkiva, osobito ona s visokom proliferativnom sposobnošću te primarnom ili sekundarnom rezistencijom ciljnih tkiva na ovu vrstu terapije. Pokusi na laboratorijskim životinjama, kao i podaci o razvoju sekundarnih tumora kod pacijenata u tretmanu citostaticima, upozorili su na mutagene, teratogene i karcinogene implikacije antineoplastičke terapije (1-3). Ove spoznaje opravdano su potakle niz istraživanja potencijalnih zdravstvenih rizika kojima je izloženo medicinsko osoblje zaposleno u pripremi i administriranju antineoplastika. Prilog tim istraživanjima jest i ova studija.

### ISPITANICE I METODE

Eksperimentalna skupina obuhvatila je 21 ispitanicu, prosječne životne dobi od 26,6 godina ( $\pm 7,7$  godina) koje rade na istom odjelu jedne kliničke bolnice, i to na pripremi i aplikaciji citostatske terapije. Sve su ispitanice medicinske sestre. Profesionalni kontakt s

citostaticima je svakodnevan i traje u prosjeku oko 4 godine ( $3,95 \pm 3,7$  godina). Najčešće primjenjuju adriamicin, vinkristin, vinblastin, endoksan i metotreksat.

Dvadeset i jedna osoba zaposlena u administrativno-tehničkim službama iste bolnice obrađena je prema jednakim metodološkim principima kao i izložena skupina, a u svrhu formiranja kontrolne skupine. Ova je skupina po dobi i spolu bila usporediva s izloženom (prosječna životna dob  $28,5 \pm 6,6$  godina, uniformno ženski spol), s tim da odabrane osobe nisu nikada imale profesionalni ili terapijski kontakt s antineoplastcima.

Obrada je započeta uzimanjem detaljnog anamnestičkog upitnika, koji je obuhvatio podatke o osobnoj, obiteljskoj i radnoj povijesti ispitanika, s posebnim osvrtom na iz literature poznate interferentne faktore koji mogu modificirati rezultate mutagenetskog testiranja. Također su uzeti podaci o vrsti antineoplastika s kojima je eksponirana skupina najčešće u dodiru te o vrsti i regularnosti upotrebe osobnih zaštitnih sredstava.

Kako se metoda izmjena sestara kromatida (sister chromatid exchange, internacionalno prihvaćena kratica SCE) smatra metodom izbora za detekciju učinka kemijskih mutagena, ona je u adaptiranom obliku primijenjena i u ovim ispitivanjima (4).

Svakoj ispitanici izložene i kontrolne skupine venepunkcijom je uzeto 5 ml krvi. Rađena je 72-satna kultura limfocita, uz dodatak  $10 \mu\text{g/ml}$  bromdeoksiuridina (Calbiochem). Analizirano je 50 dobro vidljivih metafaza po uzorku. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost broja SCE po metafazi. Kao granična vrijednost uzeta je normala Laboratorija za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, koja iznosi 7. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni Studentovim t-testom i  $\chi^2$ -testom (5, 6).

## REZULTATI

Srednja vrijednost frekvencije izmjena sestara kromatida dana je za obje skupine ispitanica na tablici 1. Statistička obrada primjenom t-testa nije pokazala signifikantan porast SCE vrijednosti u izloženoj u odnosu na kontrolnu skupinu ( $t=0,45$ ,  $P<0,6$ ).

Međutim, iako se srednja vrijednost broja SCE po metafazi smatra reprezentantom rezultata, autori su smatrali potrebnim prikazati i raspone u kojima su se kretale SCE vrijednosti u svakom pojedinom slučaju, kako bi upozorili na činjenicu da su gornje granice tih raspona u većine ispitanica izložene skupine premašile normalnu vrijednost. Kada se promatraju isti rasponi kod kontrolne skupine, vidi se da nije zabilježen ni jedan takav slučaj.

Da bi se dobiveni rezultati sa što više sigurnosti mogli povezati s profesionalnom izloženošću kod obje skupine ispitanica registrirani su interferentni faktori koji mogu biti modifikatori SCE vrijednosti. U slučaju izloženosti citostaticima to su navika pušenja, recentne virusne infekcije, recentna cijepljenja, uzimanje kontraceptiva te medicinski indicirana radiodijagnostika, radioterapija i citostatska terapija (7). Ako je anamneza na pojedini interferentni faktor bila pozitivna, razlika u proporciji njegove zastupanosti između izložene i kontrolne skupine testirana je na statističku značajnost pomoću  $\chi^2$ -testa.

Podaci o navici pušenja – broj cigareta na dan i duljina pušačkog staža, navedeni su za svaku pojedinu ispitanicu na tablici 2. Sve se ispitanice – pušačice mogu ubrojiti u istu kategoriju lakih pušačica – do 20 cigareta na dan. Razlika u proporciji njihove zastupanosti između izložene i kontrolne skupine nije statistički značajna ( $\chi^2=0,43$ ,  $P<0,50$ ).

Anamneza na recentne virusne infekcije odnosno cijepljenja bila je kod svih izloženih i kontrolnih osoba negativna. Isto se odnosi i na radioterapiju odnosno citostatsku terapiju. Osim jedne ispitanice izložene skupine, sve su druge negirale uzimanje oralnih kontraceptiva, pa ni ovaj interferentni faktor nismo detaljnije statistički evaluirali.



Tablica 1.

Pojedinačni prikaz srednjih vrijednosti i raspona vrijednosti SCE u ispitanica izloženih citostaticima i u kontrolnoj skupini

Ispita- nik	Izložena skupina				Kontrolna skupina		
	Dob (god)	Staż (god)	SCE	Raspon	Dob (god)	SCE	Raspon
1	27	7	12	8-16	28	4,6	0-6
2	26	7	8,3	2-14	30	4,8	1-5
3	23	2,5	8,3	2-15	24	4,2	0-7
4	24	1	7,5	1-20	40	4,9	2-6
5	30	7	8,2	5-11	28	4,5	1-6
6	41	8	8,6	6-14	34	5,8	0-7
7	29	6	4,4	1-15	30	4,6	3-6
8	22	2	3,3	1-6	28	4,8	1-6
9	23	3	4,1	0-12	41	5,2	1-7
10	24	0,5	4,1	1-12	27	5,5	3-7
11	26	1,5	4,1	2-7	34	4,8	2-6
12	25	0,5	4,6	1-10	34	5,7	3-6
13	30	6	5,1	2-10	18	4,6	0-5
14	22	2,5	4,1	2-9	21	5,8	0-7
15	25	1	2,8	0-5	26	5,3	2-6
16	21	1,5	5,8	2-9	42	5,4	3-6
17	24	1,5	6,6	2-11	26	4,8	1-6
18	52	16	6,3	3-12	22	4,6	1-5
19	24	5	5,9	1-11	20	6,3	2-7
20	37	2	5,6	2-12	28	5,4	1-6
21	22	1,5	4,2	0-11	22	5,8	3-6

U dijela ispitanica obih skupina bila je pozitivna anamneza na rendgensku dijagnostiku u zadnju godinu dana prije ove obrade. Tip pretrage kojoj je pojedina ispitanica bila podvrgnuta prikazan je na tablici 2. Udio ovakvih ispitanica u izloženoj u odnosu prema kontrolnoj skupini statistički se nije značajno razlikovao ( $\chi^2=1,2$ ,  $P>0,30$ ).

#### RASPRAVA I ZAKLJUČAK

Suvremena literatura raspolaže nizom podataka o ranim, akutnim i opservaciji dostupnim toksičnim učincima citostatika na profesionalno izloženo zdravstveno osoblje. Subjektivne tegobe koje najčešće navodi ova profesionalna skupina jesu gastrointestinalne (bol u trbuhu, mučnina, povraćanje), respiratorne (kašalj), dermatološke (hiperpigmentacija, alopecija, urtikarija) i neurološke naravi (glavobolja, vrtoglavica, osjećaj opijenosti, neurološki ispadi) (7). Simptomi se javljaju već pet minuta do tri sata nakon početka izloženosti (8). *Sotaniemi i suradnici* izvijestili su i o sporadičnim slučajevima oštećenja jetre i slezene kod medicinskih sestara koje rade s citostaticima (9). Histološka podloga ovih promjena je hepatitis odnosno hepatalna fibroza (9). Međutim znatno manje se zna o prolongiranim biološkim učincima citostatika koji uključuju njihovo mutageno, teratogeno i karcinogeno djelovanje. Dostupni literaturni podaci su često kontradiktorni, a vjerojatni razlozi za to su činjenice da su stvarne vrijednosti izloženosti i apsorpcije na radnom

Tablica 2.

Prikaz anamnestičkih podataka o interferentnim faktorima u skupini izloženoj citostaticima i u kontrolnoj skupini

Ispita- nik	Izložena skupina		Kontrolna skupina	
	RDG pretrage	Cigareta na dan/god	RDG pretrage	Cigareta na dan/god
1	pluća	-	-	-
2	-	15/16	pluća	15/8
3	pluća	-	pluća	-
4	pluća	15/4	-	-
5	pluća	-	skočni zglob	20/4
6	pluća	15/20	pluća	15/6
7	-	20/7	-	15/10
8	-	10/2	-	5/8
9	pluća	-	sinusi	-
10	pluća	-	pluća	10/10
11	pluća	20/7	-	-
12	pluća	-	-	6/5
13	-	10/12	pluća	-
14	pluća	-	-	10/2
15	-	-	pluća	-
16	-	15/5	-	-
17	sinusi	-	-	-
18	pluća	10/16	-	-
19	pluća	-	pluća	-
20	pluća	20/17	-	-
21	-	20/2	-	-

mjestu teško mjerljive i u osnovi nepoznate. Skupine autora izrazito se razlikuju po dizajniranju studija i kriteriju interpretacije rezultata.

Indikatorima izloženosti citostaticima smatraju se povećana mutagena aktivnost u urinu, prisutnost citogenetskih abnormalnosti (kromosomskih aberacija i povišenih SCE vrijednosti) te ekskrecija antineoplastika i/ili njihovih metabolita u urinu (7).

Mutagena aktivnost u urinu najčešće se određuje Amesovim testom, pri čemu se koristi *Salmonella typhimurium* (10). Dok neki autori tvrde da je kod osoba profesionalno izloženih citostaticima mutagena aktivnost u urinu povišena (11-13), drugi ovu tvrdnju negiraju (14-16).

Kontradiktorni su i rezultati citogenetskih testiranja selekcioniranih profesionalnih skupina. Međutim, metodološki pristup je gotovo uniforman i svodi se na metodu izmjena sestara kromatida, što je učinjeno i u ovom radu. Niz autora izvješćuje o povišenim frekvencijama izmjena sestara kromatida kod medicinskog osoblja koje rukuje citostaticima (17-19), a neki od njih nalaze i signifikantan porast kromosomskih aberacija kod ovog osoblja (19-21). Jedan broj autora ovakav signifikantan porast SCE vrijednosti ne nalazi (13, 22, 23). Iako naši rezultati nisu pokazali signifikantan porast SCE vrijednosti u izloženoj u odnosu prema kontrolnoj skupini, smatramo da genotoksični učinak citostatika nije moguće sa sigurnošću isključiti, na što upozoravaju i visoki rasponi SCE vrijednosti dobiveni u izloženoj skupini.



Pri interpretaciji rezultata dobivenih ovom metodom, potrebno je voditi računa o interferentnim faktorima koji mogu povećati učestalost izmjena sestara kromatida. Prvi na listi takvih faktora je pušenje. I o ovom aspektu problema mišljenja autora su podijeljena. Dio njih nalazi pri istim režimima izloženosti signifikantne razlike u učestalosti izmjena sestara kromatida kod medicinskog osoblja – pušača u odnosu prema nepušačima (22, 24), dok drugi potpuno negiraju značenje pušenja kao interferentnog faktora (15).

Na temelju mišljenja da treba uvažiti pušenje kao interferentni faktor, testirali smo statističku značajnost razlike u broju pušača zastupanih u izloženoj u odnosu prema kontrolnoj skupini. Rezultati obrade pomoću  $\chi^2$ -testa pokazali su da se taj broj ne razlikuje značajno. Nije nam namjera da validiramo pušenje kao interferentni faktor, već samo da upozorimo na činjenicu da je odabir naših ispitanika bio takav da ovaj čimbenik nije signifikantno modificirao rezultate.

Pokazalo se da virusne infekcije (herpes, influenca, hepatitis) mogu povećati učestalost izmjena sestara kromatida (25). Stoga smo obratili pozornost na ovaj interferentni faktor, ali nijedna od naših ispitanica nije anamnestički upozorila na infekciju u referentnom periodu od godine dana prije obrade. Isti podaci dobiveni su i za cijepljenja, za koja je također u literaturi referirano da povisuju SCE vrijednosti (26), odnosno uzrokuju kromosomske aberacije (27).

Postoji sumnja da oralni kontraceptivi povisuju frekvenciju izmjena sestara kromatida u cirkulirajućim limfocitima (28). Kako je populacija obuhvaćena ovom studijom bila isključivo ženskog spola, povelj smo računa i o ovom interferentnom faktoru. Međutim, samo je jedna ispitanica izložene skupine potvrdila uzimanje oralnih kontraceptiva, što i bez statističke evaluacije očito nije moglo bitno modificirati cjelinu naših rezultata.

Ionizirajuće zračenje *per se* dokazano djeluje mutageno (29) te valja očekivati da izloženost ovom agensu modificira rezultate SCE metode. Stoga većina autora registrira kod svojih ispitanika jatrogena ozračenja u referentnom periodu od godine dana prije vlastitog istraživanja (22). Dio ispitanica u obje naše skupine bio je podvrgnut radiodijagnostici, ali se njihova zastupanost u izloženoj u odnosu prema kontrolnoj skupini nije statistički značajno razlikovala. Kao i u slučaju pušenja, namjera ove statističke obrade nije bila validiranje interferentnog faktora, već anuliranje njegova utjecaja na razlike u rezultatima. Anamneza na terapijsko ozračivanje u referentnom periodu bila je kod svih ispitanica negativna.

Svi autori koji se bave problemom profesionalne izloženosti citostaticima, iz razumljivih razloga *a priori* iz svojih istraživanja isključuju osobe koje imaju ili su imale terapijsku indikaciju za primjenu antineoplastika, jer je nemoguće razlučiti efekte jatrogene i profesionalne izloženosti. Ovo osnovno pravilo poštovali smo i u svojoj studiji.

Teško je egzaktno istraživati teratogene rizike kojima je izloženo osoblje angažirano na pripremi i aplikaciji antineoplastika. *Selevan* i *suradnici* upozoravaju da je kod medicinskih sestara koje rade s citostaticima rizik da trudnoća završi gubitkom ploda 2 do 3 puta veći nego u općoj populaciji (30). Dvije naše ispitanice – medicinske sestre navele su u anamnezi spontani pobačaj u prvom trimestru trudnoće.

Podaci o razvoju sekundarnih tumora kod pacijenata u antineoplastičkoj terapiji (3, 31) izazvali su opravdanu sumnju na potencijalno karcinogeno djelovanje citostatika i na profesionalno izloženo osoblje. Iako ove sumnje nipošto nije moguće ukloniti, u literaturi nema prikladnih longitudinalnih epidemioloških studija koje bi omogućile jednoznačno zaključivanje.

Dosadašnje znanje o biološkim učincima citostatika kao i rezultati ove studije, upozoravaju na potencijalni genotoksični učinak antineoplastika na izloženo zdravstveno osoblje. Stoga je nužno stvoriti sustav kontinuiranog praćenja zdravstvenog stanja ovih populacijskih skupina i osigurati prikladne uvjete radne sredine.

Iz literature je poznato da se relativno jednostavnim sanitacijsko-tehničkim mjerama, kao i pravilnom i redovitom upotrebom osobnih zaštitnih sredstava, zdravstveni rizici za izloženo osoblje mogu znatno smanjiti ili čak anulirati (8). U prilog tome govore i naši rezultati. Naime, sve ispitanice koje rade s citostaticima redovno su se koristile osobnom zaštitom, a manipulacija se obavljala u digestoru. Međutim, uvjeti većine radnih sredina su neadekvatni, a upotreba osobne zaštite ne zadovoljava. Većinom se upotrebljavaju samo maske i rukavice, rjeđe zaštitna odijela, dok su prostorije za rad neadekvatno ventilirane. Uskladištenje citostatika, a pogotovo dispozicija kontaminiranog otpada, najčešće su neregularni. Stoga je odgovarajuća edukacija profesionalnog i rukovodećeg kadra od jednake važnosti kao i zdravstveno odnosno biološko praćenje rizičnih populacijskih skupina.

*Zahvala* – Autori zahvaljuju gdi J. Račić, višoj tehničkoj suradnici Laboratorija za mutagenezu, na kvalitetnoj tehničkoj pomoći i zalaganju prilikom izrade ovog rada.

Ovaj rad je sufinanciran sredstvima Ministarstva znanosti, tehnologije i informatike Republike Hrvatske (Projekt br. 3-01-139).

#### LITERATURA

1. Herrera LA, Tittelbach H, Cebhard E, Ostrosky-Wegman P. Changes in the proliferation of human lymphocytes induced by several cytostatics and revealed by the premature chromosome condensation technique. *Mutat Res* 1991;236:101-6.
2. Dale G, Smith R. Transitional cell carcinoma of the bladder associated with cyclophosphamide. *Urology* 1974;112:603-4.
3. Hoover R, Fraumeni J. Drug-induced cancer. *Cancer* 1981;47:1071-80.
4. Kato H. Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BrdU-labeling method. *Nature* 1974;252:70-2.
5. Pavlič I. Statistička teorija i primjena. Tehnička knjiga Zagreb 1970.
6. Sachs L. *Angewandte Statistik*. Springer Verlag, 4th edition, 1974.
7. Rogers B. Health hazards to personnel handling antineoplastic agents. *Occupational medicine: State of the Art Reviews* 1987; 2(3):513-24.
8. Reynolds R. Advance reactions to AMSA in medical personnel. *Cancer Treat Rep* 1983;66:410.
9. Solunemi E.A, Sulinen S, Arranto A. et al. Liver damage in nurses handling cytostatic agents. *Acta Med Scand* 1983;214:181-9.
10. Yamasaki E, Ames BN. Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: cigarette smokers have mutagenic urines. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1977;74:3555-9.
11. Falck K, Grohn P, Sorsa M. et al. Mutagenicity of urine handling cytostatic drugs (letter). *Lancet* 1979;1:1250-1.
12. Anderson RW, Puckett W, Dana W. et al. Risk of handling injectable antineoplastic agents. *Am J Hosp Pharm* 1982;39:1881-7.
13. Kolmodin-Hedman B, Harlving P, Sorsa M, Falck K. Occupational handling of cytostatic drugs. *Arch Toxicol* 1983;54:25-33.
14. Gibson JF, Gompertz D, Hedworth-Whitty R. Mutagenicity of urine from nurses handling cytotoxic drugs. *Lancet* 1984;1:100-1.
15. Hoffman DM. Lack of urine mutagenicity of nurses administering pharmacy prepared doses of antineoplastic agents. *Am J Intrav Therapy Clin Nut* 1983;1:28-31.
16. Cloak M. Occupational exposure of nursing personnel to antineoplastic agents. *Oncology Nursing Forum* 1985;12:33-9.
17. Norppa H, Sorsa M, Vainio H. et al. Increased sister chromatid exchange frequencies in lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs. *Scand J Environ Health* 1980;6:299-301.
18. Waksvik H, Kleppo O, Brogger O. Chromosome analysis of nurses handling cytostatic agents. *Cancer Treat Rep* 1981;65:607-10.



19. Nikula E, Kivinitty K, Leist J. Chromosome aberrations in lymphocytes of nurses handling cytostatic agents. Scand J Work Environ Health 1984;10:71.
20. Chrysostomou A, Seshadri R, Morley A. Mutation frequency in nurses and pharmacists working with cytotoxic drugs. Aust NZ J med 1984;14:831-4.
21. Milković-Kraus S, Horvat Đ. Chromosomal abnormalities among nurses occupationally exposed to antineoplastic drugs. Am J Ind Med 1991;19:771-4.
22. Stucker I, Hirsch A, Doloy T. et al. Urine mutagenicity, chromosomal abnormalities and sister chromatid exchanges in lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs. Int Arch Occup Environ Health 1986;57:195-205.
23. Jordan D, Putil S, Jochimsen P. et al. Sister chromatid exchange analysis in nurses handling antineoplastic drugs. Cancer Invest 1986;4:101-7.
24. Bos R, Leenaars A, Theuvs J, Henderson P. Mutagenicity of urine from nurses handling cytostatic drugs. Int Arch Occup Environ Health 1982;50:359-69.
25. Kurvink K, Bloomfield CD, Cervenka J. Sister chromatid exchange in patients with viral disease. Exp Cell Res 1978;113:450.
26. Knuutila S, Mäki-Paakkanen J, Kahkonen M, Hokkanen E. An increased frequency of chromosomal changes in cultured blood lymphocytes of 12 subjects vaccinated against smallpox. Hum Genet 1978;41:89-96.
27. Kucerova M, Polivkova Z, Matousek V. Chromosomal aberrations and SCE in lymphocytes of children revaccinated against smallpox. Mutat Res 1980;71:263-7.
28. Husum B, Wulf HC, Niebuhr E. Normal sister chromatid exchanges in oral contraceptive users. Mutat Res 1982;103:161-4.
29. Michailowski A. Effects of radiation on normal tissues: hypothetical mechanisms and limitations of in situ assay of clonogenicity. Radiat Environ Biophys 1981;19:150-72.
30. Selevan S, Lindbohm M, Polsci C. et al. A study of occupational exposure to antineoplastic drugs and fetal loss in nurses. N Engl J Med 1985;313:1173-8.
31. Reimer R, Hoover R, Fraumeni J, Young R. Acute leukemia after alkylating agent therapy of ovarian cancer. N Engl J Med 1977;297:177-81.

#### Summary

#### A POSSIBLE GENOTOXIC EFFECT OF CYTOSTATIC DRUGS IN OCCUPATIONALLY EXPOSED PERSONNEL

The aim of the study was to determine possible mutagenic implications of occupational exposure to cytostatic agents. Twenty-one nurses handling antineoplastic drugs and a matching control group were examined. The conventional method for testing chemical mutagens, that of sister chromatid exchanges, SCE, was used. Although the results obtained in the exposed group did not significantly differ from those obtained for the controls, wide ranges of SCE values observed among the medical personnel handling cytostatic drugs confirm the suspicion of the genotoxic effect of those agents.

*Institute for Medical Research and Occupational Health University of Zagreb, Zagreb, Croatia*

*Key terms:* interfering factors, method of sister chromatid exchange, nurses, testing of chemical mutagens.