

MUTAGENO I KARCINOGENO DJELOVANJE VINIL KLORID MONOMERA NA ČOVJEKA

A. Fučić¹, Đ. Horvat¹ i B. Dimitrović²

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb¹ i
»Vinilplastika« Zdravstvena stanica, Zadar²*

Primljeno 9. I. 1990.

Vinil klorid monomer kao sirovina u proizvodnji plastičnih materijala počeo se upotrebljavati tridesetih godina ovog stoljeća i danas se pretpostavlja da su u toj industriji zaposleni milijuni radnika. Tek nakon prvih opisanih slučajeva karcinoma u radnika izloženih visokim koncentracijama ovog plina počeo se intenzivno istraživati njegov mogući mehanizam djelovanja na organizam. U radu je prikazan dio dosadašnjih spoznaja o djelovanju vinil klorid monomera kao tvari koja, nakon metaboličke aktivacije u organizmu, postaje snažan karcinogen i mutagen.

Ključne riječi: citogenetska analiza kromosoma, genotoksični agensi, industrija plastičnih proizvoda, limfociti, mutageni agensi, trovanje plinom.

Vinil klorid monomer (VCM) je plin koji je prvi put sintetiziran 1883. godine (1), a danas se upotrebljava u proizvodnji plastičnih materijala. Još prije tridesetak godina nitko nije sumnjao u štetnost olefinskih plastičnih monomera kao što je VCM pa je čak služio i kao anestetik u kirurgiji te propelant u aerosolima za lakove i deodorane. VCM nije bio posebno toksikološki istraživani dulje vrijeme nakon što je počela njegova proizvodnja i primjena. Tehnologija proizvodnje VCM-a izazvala je posebnu pažnju tek 1937. godine kada je ustanovljeno njegovo moguće karcinogeno djelovanje na čovjeka (2). Rizik trovanja ovim plinom pripisivao se u početku samo radnicima zaposlenim u plastičnoj industriji koji su tokom tehnološkog procesa povremeno izloženi izuzetno visokim koncentracijama VCM-a, prilikom čišćenja kotlova za polimerizaciju, ili, s druge strane, dugotrajno izloženi manjim koncentracijama unutar tvorničkoga kruga. Poznato je da je rizična populacija znatno veća jer se velika količina VCM-a gubi u atmosferu prilikom proizvodnje te su izložene i populacije koje žive u blizini tvornica plastičnih proizvoda. Isto tako ugroženi su i potrošači koji uzimaju hranu iz PVC ambalaže, a koja sadrži određene količine nevezanog VCM-a, kao i potrošači vode iz

plastičnih cijevi koje isto tako sadrže kemijski nevezani VCM. Osnovni put ekspozicije čovjeka VCM-u je inhalacija iako se on može unijeti u organizam i kroz kožu te putem hrane i vode. Premda je stav mnogih istraživača da je svaka koncentracija VCM-a, osim nulte, karcinogena, ipak u literaturi i praksi, pa i u nekim našim pogonima još uvijek se bilježe izrazito visoke koncentracije koje daleko premašuju i naše i svjetske propise od 2 ppm (3–6). Istraživanja putova karcinogene i mutagene aktivnosti VCM-a nisu izuzetno interesantna samo zbog njega samog, već i zato što je mehanizam kojim VCM postaje mutagena i karcinogena tvar zajednički i za neke druge tvari u kemijskoj industriji. Osim toga istraživanje karcinogene aktivnosti VCM-a zanimljivo je s obzirom na činjenicu da ga dim cigarete sadrži 30 ppb-a, dakle u koncentraciji koja je relativno niska, ali koja u kombinaciji sa svim ostalim karcinogenim tvarima u dimu dobiva puno veće značenje (7).

Metabolizam i aktivacija VCM-a u organizmu sisavaca složen je proces. Podaci govore da se male doze VCM-a izlučuju u obliku metabolita u urinu (8). Dva od tri glavna urinarna metabolita su identificirana kao acetilhidroksietilcistein i tioglikolna kiselina. Oni govore da se primarni metaboliti VCM-a izlučuju u urin kao konjugati glutationa i cisteina. Na temelju ovakvih urinarnih metabolita može se pretpostaviti da se VCM metabolizira putem mikrosomskih enzima u jetri u primarne reaktivne metabolite kloretilenoksid koji se pretvara u kloroacetaldehid te daljom oksidacijom u kloroacetalnu kiselinu. Metabolička aktivacija VCM-a u mutagene metabolite putem jetrenih mikrosomskih sistema ovisi o prisutnosti kofaktora kao što su NADPH i kisik (8). Dokazano je da je jetrena mikrosomska frakcija zajedno s kofaktorima nužna u vezanju metabolita VCM-a za makromolekule. Jaka mutagena aktivnost kloretilenoksida u usporedbi s drugim metabolitima VCM-a pokazuje da su baš oni odgovorni za mnogobrojne kliničke manifestacije i mutageni učinak koji se očituje nakon ekspozicije VCM-u (9).

Kliničke manifestacije nađene u radnika izloženih VCM-u mnogobrojne su i uočavaju se na raznim organskim sustavima. *Suciu i suradnici* su 1975. g. (10) proveli opsežna istraživanja patoloških promjena u radnika profesionalno izloženih VCM-u. Osnovne promjene su glavobolje, gubitak memorije, u krajnjem slučaju narkoza, smanjenje krvnog tlaka, suženje kapilara u plućima, Raynaudov sindrom, nagon na povraćanje, bol u želucu, povećana jetra, kašljanje, prolazni dermatitisi, insuficijencija štitnjače, tendencija leukopeniji, anemiji, splenomegalija, akroostelioza i dr. Istraživanje koje je potaknuo Francuski institut za medicinska istraživanja (INSERM) 1980. g. (11) pokazalo je da su ciljni organi za VCM u formiranju karcinogenih promjena jetra, mozak, pluća, vjerojatno hematopoetski sustav, usna šupljina i koža. Ovi rezultati slažu se sa sličnim istraživanjima u drugim zemljama (12–15). Nizu radova u kojima su bili opisani slučajevi pojave karcinoma u radnika izloženih VCM-u pridružila su se i istraživanja njegova mutagenog i teratogenog djelovanja (16–37).

Zabrinutost zbog mogućeg karcinogenog i mutagenog djelovanja genotoksičnih agenasa u ljudskoj populaciji eksponiranoj profesionalno ili slučajno načinom života, raste. Nažalost postoji relativno malo direktnih metoda za mjerenje mutacija. Jedna od nekoliko takvih koja otkriva velike promjene na molekuli deoksiribonukleinske kiseline (DNA) citogenetska je analiza kromosoma. Ova metoda izvodi se na kulturama

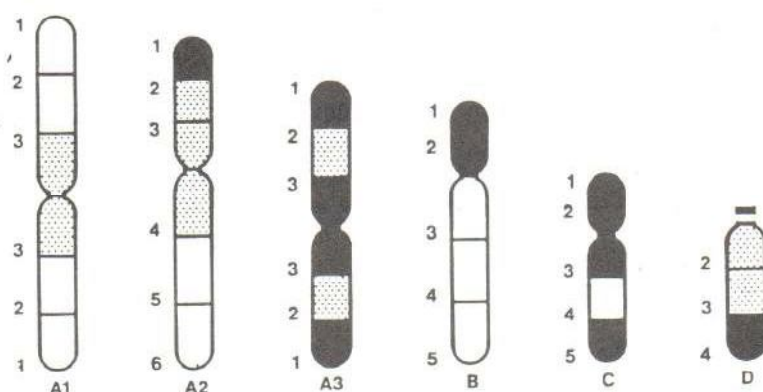
limfocita periferne krvi čiji je rast stimuliran fitohemaglutininom. Limfociti se inkubiraju 48 sati na 37 °C u hranjivom mediju. Nakon 45 sati dodaje se kolhicin koji blokira daljnje dijeljenje limfocita u kulturi. Limfociti se nakon 48 sati fiksiraju i boje. Oni limfociti koji su tokom inkubacije dosegli u staničnom ciklusu stadij metafaze uzimaju se u obradu. Analiziraju se promjene u strukturi kromosoma, koje se odnose na lomove i morfološku organizaciju vidljivu svjetlosnim mikroskopom. To je tzv. analiza strukturnih aberacija kromosoma. Druga, nešto finija, metoda je metoda sestrinskih kromatidnih izmjena kojom je moguće pratiti izmjene dijelova DNA unutar jednog kromosoma, ali između sestrinskih kromatida. Kao i metoda analize strukturnih aberacija kromosoma i ova se metoda bazira na kulturi limfocita periferne krvi u koju se ovaj put dodaje bromdeoksiuridin. Ugradnjom uridina koji na sebi nosi lako bojiv dodatak moguće je uočavanje onih dijelova DNA koji su u kulturi stanica tokom inkubacije bili zbog oštećenja ispravljeni i dograđivani. Ove dvije metode često se upotrebljavaju kao univerzalni pokazatelji djelovanja genotoksičnih agenasa (38).

Mehanizam vezanja mutagenih metabolita VCM-a s molekulom DNA ispitivan je na DNA telećih timusa gdje je uočeno da pri eksponiranju životinja VCM-u nastaju produkti metabolita VCM-a, kloracetaldehida i DNA (39). U tim se eksperimentima ujedno vidjelo da metaboliti VCM-a dovode do depurinifikacije tj. izdvajanja purina iz DNA, čime nastaje tzv. gap ili ispražnjeno mjesto na DNA. Takvo se mjesto vrlo lako može nadomjestiti neodgovarajućom bazom i dovesti do fatalne promjene šifre gena. Kako je poznata veza između depurinifikacije i izazivanja karcinoma moguće je na bazi ovih podataka prihvatiti pretpostavku da je VCM mutagen i karcinogen (39). Potrebno je međutim naglasiti da se broj kromosomskih oštećenja u radnika koji su promijenili radno mjesto smanjuje. Takvi podaci upućuju na to da je moguće utjecati na razinu mutacija somatskih stanica i da će modernizacija tehnologije u tvornicama osigurati zdraviji i normalniji život radniku (5). S druge strane, ako su radnici izloženi izuzetno visokim koncentracijama VCM-a, prema našim neobjavljenim rezultatima takve promjene postaju ireverzibilne i zadržavaju se još godinama nakon potpunog prestanka rada u krugu tvornice. Rezultati testa sestrinskih kromatidnih izmjena u većini slučajeva prate sliku koju daje analiza na strukturne aberacije kromosoma (36). Naš laboratorij navedenom analizom kromosomskih aberacija (48-satna kultura limfocita periferne krvi stimulirana fitohemaglutininom u hranjivom mediju) prati grupu radnika jedne naše tvornice plastičnih proizvoda. Kao što je vidljivo na tablici 1, kariogrami radnika pokazuju značajno odstupanje od vrijednosti zabilježenih u kontrolnoj populaciji. Za specifičniju analizu djelovanja VCM-a na kromosom upotrijebili smo metodu koja dosada nije uobičajena u mutagenetskim analizama kromosomskih aberacija izazvanih kemijskim agensima. U svom istraživanju pratili smo lokaciju i frekvenciju pojave aberacije na pojedinim kromosomima *in vitro* kulture limfocita radnika izloženih VCM-u. Tu se susrećemo s pojmom fragilnih mjesta. Metodama pruganja – bandinga otkrivaju se fragilna mjesta na kromosomu, tj. one točke koje se pod utjecajem nekog agenasa oštete više od drugih. Ta okolnost može dovesti do reorganizacije genetičkog materijala organizma odnosno stanice (40). Fragilna mjesta mogu se dovesti u korelaciju s mehanizmom djelovanja VCM-a na DNA, a to je već opisana depurinifikacija. Neuravnoteženost sadržaja nukleotida je uvjet koji omogućuje

Tablica 1.

Promjene u genomu somatskih stanica radnika izloženih vinil klorid monomeru u usporedbi s kontrolnim ispitanicima bez evidentirane izloženosti genotoksičnim agensima

Ispitanik	A B E R A C I J E				Trans- lokacija	Tetra- ploid.	% abera- cija
	Kromat. lom	Kromos. lom	Acentrik	Bicentrik			
1	6	1			1		8
2	8						4
3	10	1	2				7,5
4	13		1	1	3		9
5	1	1	1				4
6	8	1	2	2			7
7	7	1			1	2	4,5
8	14	1	1		1		9,5
9	9						4,5
10	11				2		6,5
11	16	2	3	1	2		12
12	11	4	3				9
13	18	2	1				11,5
14	7	2	1				4,5
15	12	1	4				8,5
16	6	1	1				8
17	9	1	4		1		7,5
18	12						6
19	3		2	1			6
20	2	1					3
21	9	1			2		6
22	6	1	2		1		5,5
23	3	4	2		1		5
24	8		1		1		5
25	8	1	2	1	2		7
26	10	1					5,5
Kontrolni ispitanik							
1	1						0,5
2	2	1	1				2
3	2		1				1,5
4	1	1					1
5	3	1	1				2,5
6	2						1
7	1		1				1
8		1	1				1
9	1		1				1
10	2	1					1,5
11		1	1				1
12	2		2				2
13	3		2				2,5



Slika 1. Schematski prikaz distribucije lomova izazvanih djelovanjem VCM-a po tipovima kromosoma. Područje kromosoma: ■ s malim brojem lomova, ▨ koje ne pokazuje statistički značajnu razliku u broju lomova od očekivane, □ s velikim brojem lomova.

ekspresiju specifičnih fragilnih mjesta, a koja će se izraziti u slučaju poremetnje u koncentraciji purina. S druge strane, poznato je da su fragilna mjesta često smještena na područjima kromosomskih prestrukturiranja. Nalaze se u kariotipu tumorskih stanica (41-46). Na osnovi toga se pretpostavlja da postoji veza između specifičnih fragilnih mjesta i određenih lomova na kromosomima uočeni kod pojedinih tipova karcinoma. Prema tome ekspresija fragilnih mjesta može biti faktor predispozicije za pojavu karcinoma u nekih osoba. Distribucija kromosomskih lomova nakon djelovanja VCM-a pokazuje da su s obzirom na fragilnost osjetljivi terminalni segmenti A-1, A-2 i B kromosoma i središnji dijelovi kromosoma grupe B i C (slika 1) (4). Za neke tipove karcinoma već postoje karte karcinom-specifičnih mjesta lomova (47). Ako raspored lomova koji izaziva VCM na kromosomima nije jednolik nego, kao što smo prikazali, grupiran na određenim položajima, onda se može reći da djelovanje VCM-a dovodi do ekspresije specifične skupine fragilnih mjesta. Povežu li se ta mjesta s regijama na kromosomima koje nose onkogene, moguće je naći potvrdu o specifičnim malignim transformacijama uzrokovanim profesionalnom izloženošću pojedinim tvarima (4).

Kako živimo u epohi s naglim razvojem medicinske znanosti, broj umrlih od raznih zaraznih bolesti drastično opada, a u isto vrijeme to je epoha u kojoj tisuće radnika umiru od različitih tipova karcinoma zbog izloženosti aromatskim aminima, silikatima, toluenu, vinil kloridu i mnogim drugim tvarima. Na temelju podataka iz eksperimentalnog rada na životinjama nije sa sigurnošću moguće procijeniti rizik koji ljudi u radu s bilo kojom istraživanom koncentracijom mutagenog ili teratogenog agensa jer je znanje o razlici u osjetljivosti između životinja i ljudi još uvijek nedovoljno. U slučaju VCM-a ovi eksperimenti imaju značenje jer nažalost postoje velika iskustva na ljudima. Po eksperimentalnim modelima pretpostavlja se da uz koncentraciju VCM-a nižu od 10 ppm, koja se postiže modernom tehnologijom rizik tumora za profesionalno izloženo osoblje jedva je nešto veći od rizika opće populacije. Potrebno je

obratiti pažnju na to da će samo čvrsto argumentirana istraživanja s velikim brojem sudionika biti ozbiljno shvaćena i imperativno uvjetovati konkretne promjene na radnom mjestu u tvorničkoj hali. Tek će se na temelju takvih podataka moći postavljati standardi industrijske higijene. U praksi je međutim opsežnih istraživanja malo, te se često standardi tvore na temelju toksikoloških analiza koje teorijski predviđaju koncentracije »sigurne« za ljudsko zdravlje. Sumnje u vrijednost tako normiranih koncentracija dolaze do izražaja, nažalost, tek nakon dovoljnog broja negativnih ishoda. Zbog toga ni časa ne bi trebalo zaboraviti da je »svaka koncentracija potencijalno mutagenih tvari, osim nulte, štetna za zdravlje«.

LITERATURA

1. *Uzych L.* Male exposure to vinyl chloride and possible teratogenic and mutagenic risks. A review. *Human Toxicol* 1988;7:517.
2. *Creech JL, Johnson MN.* Angiosarcoma of liver in the manufacture of polyvinyl chloride. *J Occup Med* 1974;16:150.
3. *Zorica M, Šarić M, Konstantinović M, Kovač I.* Dva slučaja angiosarkoma jetre u ekspoziciji vinilkloridu. *Arh hig rada toksikol* 1975;26:275.
4. *Fučić A, Horvat D, Dimitrović B.* Localization of breaks induced by vinyl chloride in the human chromosomes of lymphocytes. *Mutat Res Lett* 1990;243:95-9.
5. *Hansteen I-L, Hillestad L, Thiis-Evensen E, Heldaas SS.* Effects of vinyl chloride in man. A cytogenetic follow-up study. *Mutat Res* 1978;31:271.
6. Maksimalno dopuštene koncentracije štetnih plinova, para i aerosola u atmosferi radnih prostorija i prostora. *Sigurnost* 1985;1-2:27.
7. *Antiweiler H.* Studies on the metabolism of vinyl chloride. *Environ Health Perspect* 1976;17:217.
8. *Bartsch H, Malaveille C, Barbin A, Bresil H, Tomatis L, Montezano R.* Mutagenicity and metabolism of vinyl chloride and related compounds. *Environ Health Perspect* 1976;17:193.
9. *Bartsch H, Montezano R.* Mutagenic and carcinogenic effects of vinyl chloride. *Mutat Res* 1975;32:93.
10. *Suciu I, Prodan L, Ilea E, Paduraru L.* Clinical manifestation in vinyl chloride poisoning. *Ann N Y Acad Sci* 1975;246:53.
11. *Laplanche A, Clavel F, Contarsot JC, Lenouzier C.* Exposure to vinyl chloride monomer: A report on a cohort study. *Br J Ind Med* 1987;44:711.
12. *Smilevich VB, Fedotova IV, Filatova VS.* Increasing evidence of the rise of cancer in workers exposed to vinyl chloride. *Br J Ind Med* 1988;45:93.
13. *Fox AJ, Collier PF.* Low mortality rates in industrial cohort studies due to selection for work and survival in the industry. *J Prev Soc Med* 1976;30:225.
14. *Monson RR, Peters JN, Johnson MN.* Proportional mortality among VC workers. *Lancet* 1974;11:397.
15. *Ott MG, Langer RR, Holder BB.* Vinyl chloride exposure in a controlled industrial environment. A long-term mortality experience in 594 employers. *Arch Environ Health* 1975;30:333.

16. Gedrigk P, Muller R, Bechtelsbeimer H. Morphology of liver damage among polyvinylchloride workers. *Ann N Y Acad Sci* 1975;246:278.
17. Maltoni C. Preliminary report on the carcinogenicity bioassays of vinyl chloride. US Dept Labor Informal Fact-Finding Hearing on Possible Hazards of Vinyl Chloride Manufacture and Use. Washington D.C. 1974;120.
18. Maltoni C, Lefemine G. Carcinogenicity bioassays of vinyl chloride. Current results. *Ann N Y Acad Sci* 1975;246:195.
19. Veltman G, Lange CE, Jube S, Stein G, Bachner U. Clinical manifestations and course of vinyl chloride disease. *Ann N Y Acad Sci* 1975;246:6.
20. Waxweiler RJ, Stringer W, Wagoner JK, Jones J, Falk H, Carter C. Neoplastic risk among workers exposed to vinyl chloride. *Ann N Y Acad Sci* 1976;271:39.
21. Salmon AG. Vinyl chloride: the evidence for human carcinogenicity in different target organs. *Br J Ind Med* 1985;42:73.
22. Viola PL, Bigotti A, Caputo A. Oncogenic response of rat skin, lungs and bones to vinyl chloride. *Cancer Res* 1971;31:516.
23. Storetvedt Heldaas S, Langard SL, Andersen. Incidence of cancer among vinyl chloride and polyvinyl chloride workers. *Br J Ind Med* 1984;41:25.
24. Rannug U, Ramel C. Mutagenicity of waste products from vinyl chloride industries. *Toxicol Environ Health* 1977;2:1019.
25. Maltoni C, Lefemine G, Ciliberti A, Cotti G, Carreti D. Carcinogenicity bioassay of vinyl chloride monomer: a model of risk assessment on an experimental basis. *Environ Health Perspect* 1981;41:3.
26. Gebring PJ, Watanabe PG, Park CN. Risk of angiosarcoma on workers exposed to vinyl chloride as predicted from studies in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979;49:15.
27. Makk L, Delmure F, Crelech JL et al. Clinical and morphologic effects of hepatic angiosarcoma in vinyl chloride workers. *Cancer* 1976;37:149.
28. Laplanche A, Clavel F, Contassot J-C, Lanouziere C. Exposure to vinyl chloride monomer: report on a cohort study. *Br J Ind Med* 1987;44:711.
29. Theriault G, Allard P. Cancer mortality of a group of Canadian workers exposed to vinyl chloride monomer. *J Occup Med* 1981;23:671.
30. Vainio H. Vinyl chloride and vinyl benzene (styrene) — metabolism, mutagenicity and carcinogenicity. *Chem Biol Interactions* 1978;22:117.
31. Rossner P, Sram RJ, Novakova J, Lambl V. Cytogenetic analysis in workers occupationally exposed to vinyl chloride. *Mutat Res* 1980;73:425.
32. Fleig I, Theiss AM. External chromosome studies undertaken on persons and animals with VC illness. *Mutat Res* 1978;53:187.
33. Funes-Cravioto F, Lambert B, Linsten J, Ehrenger L, Natarajan AT, Oarwenn-Golkar S. Chromosome aberrations in workers exposed to vinyl chloride. *Lancet* 1975;1:459.
34. Purchase IFH, Richardson CR, Anderson D, Paddle GM, Adams WGF. Chromosomal analysis in vinyl chloride-exposed workers. *Mutat Res* 1978;57:325.
35. Szentesi I, Hornyak E, Unvary G, Czeizel A, Bognar Z, Timar M. High rate of chromosomal aberrations in PVC workers. *Mutat Res* 1976;37:313.
36. Anderson D, Richardson CR, Purchase IFH, Evans HJ, O Riordan ML. Chromosomal analysis in vinyl chloride exposed workers: comparison of the standard technique with the sister chromatid exchange technique. *Mutat Res* 1981;83:137.

37. Ducatman A, Hirschhorn K, Selikoff IJ. Vinyl chloride exposure and human chromosome aberrations. *Mutat Res* 1975;31:163.
38. *International Atomic Energy Agency, IAEA*. Technical report series No 260 Vienna 1986;1.
39. Hathway DE. Comparative mammalian metabolism of vinyl chloride and vinylidene chloride in relation to oncogenic potential. *Environ Health Perspect* 1977;21:55.
40. Sutherland GR, Hecht F. Fragile sites on human chromosomes. U: Motulsky AG, Harper PS, Bobrow M, ur. New York: Oxford University Press. 1984;1.
41. LeBeau NH, Rowley JD. Heritable fragile sites in cancer. *Nature* 1984;308:607.
42. Hecht F, Glover TW. Cancer chromosome breakpoints and common fragile sites induced by aphidicolin. *Cancer Genet Cytogenet* 1984;13:185.
43. Yunis JJ, Soreng HL. Constitutive fragile sites and cancer. *Science* 1984;226:1199.
44. Glover TW, Coyle-Morris J, Morgan R. Fragile sites—overview, occurrence in acute nonlymphocytic leukemia and effects of coffee on expression. *Cancer Genet Cytogenet* 1986;19:141.
45. DeBraekeleer M. Fragile sites and chromosome breakpoints in constitutional rearrangements. *Clin Genet* 1985;27:523.
46. Hecht F, Hecht BK. Chromosome 9 in acute lymphoblastic leukemia: breaks in band 9p21-22 and fragile site. *Cancer Genet Cytogenet* 1986;21:1.
47. Hein S, Mitelman F. Nineteen of 26 cellular oncogenes precisely localized in the human genome map to one of the 83 bands involved in primary cancer-specific rearrangements. *Hum Genet* 1987;75:70.

Summary

MUTAGENIC AND CARCINOGENIC EFFECTS OF VINYL CHLORIDE MONOMER

The use of vinyl chloride monomer in industry dates back to the late 1930s. Today the number of occupationally exposed industrial workers is estimated to be several million. After the first described cases of cancer among workers exposed to high concentrations of this gas, extensive research was initiated into its possible mechanism of action on the living organism. This paper is a review of some current knowledge about the action of vinyl chloride monomer as a substance which after metabolic activation in the organism becomes a strong carcinogenic and mutagenic agent.

Institute for Medical Research and Occupational Health, University of Zagreb, Zagreb¹ and »Vinilplastika« Health Unit, Zadar²

Key terms: cytogenetic chromosome analysis, genotoxic agents, plastics industry, lymphocytes, mutagenic agents, gas intoxication.