

UČESTALOST IZMJENA KROMATIDA SESTARA
U V79 STANICA KINESKOG HRČKA
NAKON IZLOŽENOSTI TEŠKIM METALIMA

DJ. HORVAT, J. RAČIĆ i R. ROZGAJ

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

(Primljeno 6. X 1980)

Metodom izmjena kromatida sestara (SCE) testirana je mutagena aktivnost Pb^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} i Cd^{2+} . Rezultati su pokazali da u navedenim eksperimentalnim uvjetima olovo i nikal značajnije ne mijenjaju broj SCE, dok mangan, ovisno o dozi, uzrokuje povećan broj izmjena kromatida sestara. Kao izraziti mutagen pokazao se kadmij. Već nakon 2-satne inkubacije stanica V79 kineskog hrčka i s najnižom testiranom koncentracijom kadmija, broj SCE se udvostručuje.

Razvoj citoloških tehnika u ovoj dekadi omogućuje novi pristup studiju mutagenih učinaka na humanom i animalnom celularnom materijalu. U identifikaciji mutagenog učinka pojedinih kemijskih tvari, uz uobičajenu analizu na strukturne aberacije kromosoma, danas se paralelno prati i učestalost izmjena kromatida sestara (Sister chromatid exchange — SCE). Ta tehnika predstavlja suvremenu metodu probira za otkrivanje finih kromosomskih promjena, uzrokovanih mutagenim i mutageno-kancerogenim agensima. Detektibilnost izmjena kromatida sestara u standardiziranim eksperimentalnim uvjetima moguća je već pri izloženosti vrlo niskim koncentracijama mutagena, dapače znatno nižim od onih koje uzrokuju vidljive strukturne aberacije kromosoma (1, 2).

Mehanizam nastanka SCE još je uvijek nejasan. Sigurno je međutim da se mehanizmi nastanka strukturnih aberacija kromosoma i oni za formiranje SCE ozbiljno razlikuju. Smatra se da SCE predstavlja uočavanje rekombinacijskog procesa DNK u kojem dvolančani DNK segment u jednoj kromatidi S ili G_2 kromosoma mijenja poziciju s homolognim segmentima u drugoj kromatidi. Pri tom se obavlja »popravak« dvaju dvolančanih lomova u slučaju terminalnih SCE, odnosno četiriju dvo-

lančanih lomova u slučaju intersticijalnih SCE. Prema tome pojava SCE manifestira DNK oštećenje i njegov postreplikacijski popravak (3).

Fenomen SCE uočno je *Taylor* još 1958. godine i dokazao ga autoradiografskom metodom (4). Međutim, tom je tehnikom moć razdvajanja ograničena, pa je fenomen ostao dugo vremena zaboravljen. Prije nekoliko godina ponovno se pokušao vizualizirati primjenom finih, citoloških metoda. U vremenu od 1972. do 1974. u nekoliko laboratorija razvijeno je više varijanti te tehnike (5, 6, 7, 8, 9).

SCE nastale u *in vivo* i *in vitro* sistemu mogu se utvrditi i u somatskim i u spolnim stanicama. Najrazličitiji mutageni agensi mogu narušiti primarni integritet DNK molekula a spontani oporavak moguće je utvrditi primjenom metode za dokazivanje izmjene kromatida sestara.

Tom je metodom relativno jednostavno dokazivanje mutagenog učinka za kemijske agense tzv. direktnog djelovanja. Međutim, postoje tvori čija se mutagena svojstva izražavaju tek nakon metaboličke aktivacije u jetri ili drugim tkivima koja sadržavaju potrebne enzime. S tog razloga u test sistemu se upotrebljavaju životinje ili samo mikrosomska frakcija jetre koja se dodaje u hranidbeni medij *in vitro* kultiviranih stanica sisavaca (10, 11).

Učestalost kromosomskih aberacija i sestrinskih kromatidnih izmjena ispitana je na stanicama kineskog hrčka, tretiranim s 33 različita kemijska agensa. Mutagena aktivnost tih kemikalija procjenjivana kromosomskim aberacijama i metodom SCE nije uvijek bila jednoznačna za isti kemijski agens. Nađena je povećana učestalost SCE nakon izloženosti stanica 26-erim raznim kemikalijama, ili za mnoge od njih zabilježen je tzv. učinak doze (12).

Kultura ljudskih limfocita je vrlo pogodan celularni materijal za testiranje mutagenosti zbog mogućnosti ekstrapolacije podataka na čovjeka. *Littlefield* i suradnici su 1979. pratili pojavu SCE na ljudskim limfocitima, tretiranim citostatskim preparatima koji se upotrebljavaju u tretmanu ljudskih neoplazmi. Nađen je povećan broj izmjena kromatida sestara, ovisno o dozi testiranog preparata, mitomicina C, klorambucila i tiotepe, dok metotreksat, citorabin i bleomicin nisu značajno mijenjali učestalost SCE (13).

Nils Petter Nevstad testirao je adriamicin u *in vivo* i *in vitro* uvjetima. Paralelno je pratio učestalost strukturnih aberacija kromosoma, pojavu SCE i mikronukleusa. Iz dobivenih podataka zaključuje se da je test na SCE u kulturi ljudskih limfocita najosjetljivija citološka tehnika u odnosu na još praćene kromosomske aberacije i mikronukleus test. Osim toga nađeno je da učestalost SCE u kromosomima limfocita ovisi o trajanju izloženosti adriamicinu i njegovoj koncentraciji (14). Sličnih podataka za niz kemijskih agensa ima izvanredno mnogo.

Uz preparate uporabive u humanoj medicini značajnu grupu čine pesticidi i herbicidi s kojima čovjek dolazi u dodir prilikom njihove primje-

ne. *Crossen* i suradnici su 1978. godine testirali veliku grupu upravo tih spojeva i našli da pojedini pesticidi i herbicidi, iako mutageni u čistom test sistemu, ne uzrokuju citogenetske promjene u dobro zaštićenih osoba koje njima rukuju. Istovremeno neadekvatna osobna zaštita pri radu i duža izloženost ovim spojevima vjerojatni su razlog povećanoj učestalosti SCE (15).

Mnogi biološki agensi, virusi i bakterije mogu uzrokovati citogenetska oštećenja i povećan broj SCE (16, 17). Određene bolesti i hereditarna stanja karakteriziraju učestalije kromatidne izmjene (16). Fizikalni agensi, kao što je ultravioletno svjetlo, fluorescentno svjetlo i ultrazvuk, također uzrokuju učestalije izmjene kromatida sestara (18, 19, 20, 21).

Citološka detektibilnost SCE in vitro ovisi o primjeni bromdeoksiuridina (BrdU), koji i sam na žalost, može izazvati SCE. *Lambert* i suradnici ispitivali su uz ostalo i učinak BrdU na frekvenciju SCE u limfocita periferne krvi čovjeka. Njihovi rezultati jasno pokazuju da je učestalost SCE ovisna o povišenju koncentracije BrdU. Dapače, kod viših koncentracija BrdU uočene su i strukturne aberacije kromosoma. Autori zaključuju da BrdU, u koncentraciji oko 100 μ M, nije pogodan u screening testovima na mutagenost ili kancerogenost jer mnogi od ispitanih agenasa mogu mijenjati ritam staničnog ciklusa, ili eventualno ući u interakciju s BrdU. Prema tome, pri testiranju nekog agensa na mutagenost treba se uvijek koristiti niskim koncentracijama ili s više koncentracija BrdU kako bi se mogao razlučiti utjecaj BrdU i utjecaj testirane supstancije na učestalost SCE (3).

Pojedini kemijski zagađivači čovjekove radne i životne sredine nerijetko su ozbiljni mutageni, kancerogeni i teratogeni. Zbog svoje osjetljivosti metoda SCE vrlo je pogodna za procjenu genetskog rizika u kontaminiranoj sredini, te može upozoriti na nužnost poduzimanja određenih preventivnih mjera za pojedinca ili populaciju. U mnogim tehnološkim procesima dopijevaju u okoliš teški metali u značajnim koncentracijama i izloženost čovjeka ili životinja njima može imati vrlo ozbiljne fiziološke i citogenetske posljedice.

U živoj stanici teški metali vežu se nespecifično na niz intracelularnih struktura. Svojom prisutnošću najčešće mijenjaju enzimsku aktivnost u stanici, a time narušavaju normalne metaboličke procese. Takve promjene uzrokuju toksički procesi, koji će u određenim uvjetima biti ireverzibilni. Međutim poznato je da pojedini metali djeluju u specifičnim uvjetima na procese sinteze deoksiribonukleinske kiseline, te da su kancerogeni. Uz to neki djeluju direktno na razini DNK i kromosoma, i imaju izrazite karakteristike mutagena. Kao snažni mutageni agensi pokazali su se u određenim koncentracijama kadmij i mangan (22).

Olovo, koje inhibira sintezu DNK u HeLa stanica, ne mijenja trajno strukturu te molekule. Vraćanjem stanica u medij bez prisutnosti iona olova, procesi postaju reverzibilni i sinteza DNK se normalizira (23).

Da bi se odredila mutagena aktivnost olova, mangana, kadmija i nikla u skali raznih koncentracija tih metala, primijenjena je metoda sestrijskih kromatidnih izmjena.

MATERIJAL I METODA

Kao eksperimentalni celularni materijal upotrijebljene su stanice kineskog hrčka, soj V79. Testirani su teški metali Pb^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} i Ni^{2+} u koncentracijama $10^{-6}M$, $10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-4}M$ i $2,5 \times 10^{-4}M$. Inkubacijski period stanica s pojedinim metalom trajao je jedan generacijski ciklus, odnosno za kadmij 2, 4, 6 sati zbog njegova snažnog citotoksičnog i mutagenog djelovanja. Eksperimentalni postupak bio je po adaptiranoj *Katovoj* metodi (7).

1. Nasađene stanice inkubirane su 48 sati na temperaturi od $37^{\circ}C$.
2. Četrdeset osmi sat dodan je BrdU u paralelne uzorke, u koncentraciji $10 \mu g/ml$ medija.
3. Stanice su inkubirane na $37^{\circ}C$ u prisutnosti BrdU jedan generacijski ciklus.
4. Nakon inkubacije dodane su spomenute koncentracije metala i ponovo nastavljena inkubacija u vremenu jednog generacijskog ciklusa, ili 2, 4, 6 sati za Cd.
5. Sat i pol prije fiksacije dodan je kolhicin $0,5 \mu g/ml$.
6. Preparati kromosoma su priređeni primjenom hipotonije s KCl-om.
7. Suhi preparati tretirani su s Na_2HPO_4 , te osvijetljeni UV lampom.
8. Slijede kupke preparata u zasićenoj otopini $Ba(OH)_2$, $0,1 N HCl$, te u 10% -tnom NH_4OH .
9. Preparati su obojeni Giemsinom otopinom, obrađeni paralelno pod mikroskopom i na fotografijama.
10. Brojeno je ili obrađeno 50 mitozu po uzorku, što je u skladu s načinom obrade drugih autora.

REZULTATI I DISKUSIJA

Dobiveni rezultati za 3 testirana metala prikazani su na tablici 1. Spontana incidencija SCE prisutna je u granicama očekivanog od 5 izmjena po mitozu, uz $10 \mu g/ml$ BrdU (sl. 1).

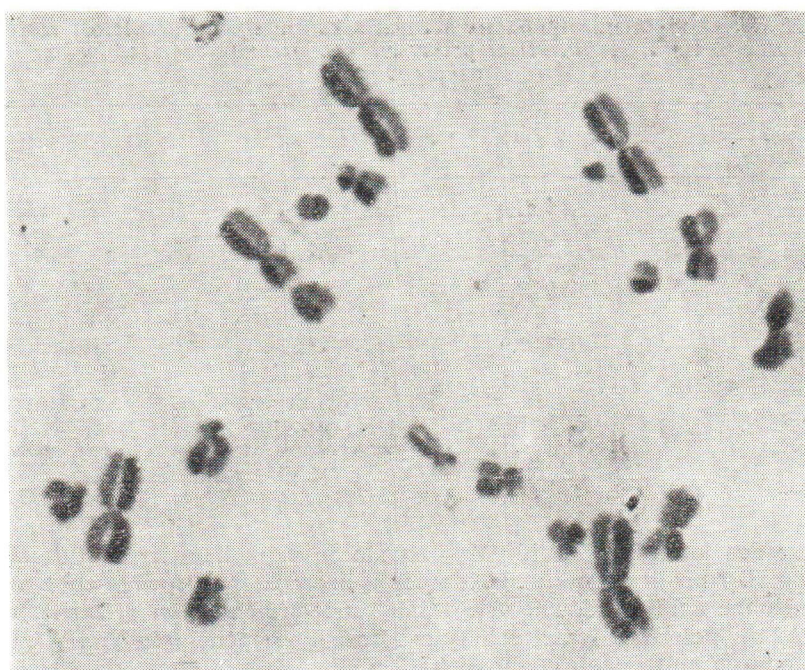
Tretman stanica Pb^{2+} u navedenim koncentracijama nije uzrokovao učestalije kromatidne izmjene. Kako se radi o citološkoj metodi, neznatne razlike između pojedinih uzoraka, mogu se smatrati eksperimentalnom greškom.

Nikal po svojoj mutagenoj aktivnosti u V79 stanica kineskog hrčka istog je reda veličine kao i olovo. Tek najviša testirana koncentracija od $2,5 \times 10^{-4}M Ni^{2+}$ uzrokuje učestalije kromatidne izmjene.

Tablica 1.

Učinak doze metala na učestalost izmjena kromatida sestara. Inkubacija V79 stanica kineskog hrčka s metalima trajala je jedan generacijski ciklus. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija.

Metal mol dm ⁻³	Pb ²⁺	Ni ²⁺	Mn ²⁺
0 (Kontrola)	4,9 \pm 1,6	4,9 \pm 1,6	4,9 \pm 1,6
10 ⁻⁶	4,9 \pm 1,7	4,7 \pm 1,5	5,8 \pm 1,5
10 ⁻⁵	5,4 \pm 1,6	4,5 \pm 1,7	5,6 \pm 1,5
5 \times 10 ⁻⁵	5,8 \pm 1,7	4,9 \pm 1,8	6,6 \pm 4,7
10 ⁻⁴	5,5 \pm 1,6	5,5 \pm 1,9	9,4 \pm 6,3
2,5 \times 10 ⁻⁴	5,9 \pm 1,6	7,0 \pm 2,5	11,2 \pm 3,0



Sl. 1. Sestrinske kromatidne izmjene u V79 stanica kineskog hrčka — kontrolna skupina (snimljeno: mikroskop Orthoplan Leitz, okular 10, imerzijski objektiv 100/1, 30)

Slijedeći testirani metal bio je mangan. U apsolutno jednakim eksperimentalnim uvjetima taj metal uzrokuje povišenje broja kromatidnih izmjena, ovisno o koncentraciji metala.

Najočitije mutageno djelovanje nađeno je testiranjem kadmija. Već najniža koncentracija metala od 10^{-6} M uzrokuje značajno povišenje broja kromatidnih izmjena. Za tu dozu zabilježeno je u prosjeku 8 izmjena po mitozu, a 10^{-5} M kadmija udvostručuje broj izmjena kromatida sestara.

Dok je za olovo, nikal i mangan bila moguća normalna obrada rezultata u svim testiranim uzorcima, kadmij, već pri dozi od 5×10^{-5} M izaziva takva strukturna oštećenja kromosoma da nije moguća zadovoljavajuća obrada na SCE. Nakupljene su brojne mitoze, ali s izuzetno velikim brojem strukturnih oštećenja kromosoma, koji najčešće imaju oblik pulverizirane kromatinske mase. Zbog toga je mutageni učinak kadmija praćen u kraćem vremenskom periodu (tablica 2). Već dvosatno izlaga-

Tablica 2.

Učinak doze i vremena inkubacije stanica s kadmijem na učestalost izmjena kromatida sestara. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija

Metal mol dm ⁻³	2 sata	6 sati	10 sati
0 (kontrola)	4,9 \pm 1,4	4,9 \pm 1,4	4,9 \pm 1,4
10^{-6}	5,8 \pm 2,3	7,2 \pm 1,8	7,6 \pm 3,2
10^{-5}	6,9 \pm 2,3	8,1 \pm 2,3	16,5 \pm 4,4
5×10^{-5}	10,2 \pm 2,9	10,8 \pm 2,6	Strukturna oštećenja kromosoma
$2,5 \times 10^{-4}$	11,5 \pm 10,2	Strukturna oštećenja kromosoma	Strukturna oštećenja kromosoma

nje stanica kadmiju ($2,5 \times 10^{-4}$ M) izazvalo je velik broj kromatidnih izmjena, ali i brojna strukturna oštećenja kromosoma. Upravo zbog strukturnih aberacija obrada je vrlo teška i možda ne sasvim precizna. Inače, kadmij pokazuje izrazitu ovisnost doze i vremena inkubacije s manifestacijom mutagene aktivnosti (sl. 2. i 3).

Ovom metodom dobiveni rezultati o mutagenoj aktivnosti testiranih metala potvrdili su naše ranije rezultate, kao i podatke drugih autora, dobivene praćenjem strukturnih aberacija kromosoma.



Sl. 2. Sestrinske kromatidne izmjene u V79 stanica kineskog hrčka nakon tretmana kadmijem $10^{-6}M$ tijekom jednog generacijskog ciklusa



Sl. 3. Strukturna oštećenja kromosoma V79 stanica kineskog hrčka nakon tretmana kadmijem $5 \times 10^{-5}M$ tijekom 6 sati

Tehnika izmjene kromatida sestara nedvojbeno je pokazala da u navedenim eksperimentalnim uvjetima olovo ne djeluje mutageno. Čak i visoka koncentracija Pb^{2+} od $2,5 \times 10^{-4} M$ nije mijenjala broj kromatidnih izmjena u odnosu na kontrolni uzorak. Slične rezultate zabilježio je Beck sa suradnicima na kromosomima ljudskih leukocita nakon testiranja olovnog acetata u dozi od $10^{-5} M$ (24).

Mutagena aktivnost mangana nešto je izraženija u odnosu na olovo. Međutim, to se odnosi na visoke koncentracije tog metala od $5 \times 10^{-3} M$ i $2,5 \times 10^{-4} M$.

Vrlo visoka učestalost kromatidnih izmjena sestara, u uzoraka inkubiranih već sa $10^{-6} M Cd^{2+}$ upozorila je na izuzetnu mutagenu aktivnost tog metala. Dobiveni podaci potvrđuju naše ranije analize strukturnih oštećenja kromosoma (25).

Promjene koje uzrokuju metali u stanici vjerojatno imaju više puteva nastanka. Oni se vežu prilično nespecifično i dobrim dijelom za proteinske strukture, pa je njihov inhibitory učinak na sintezu makromolekula posredan — enzimatski. To se svakako odnosi na niže koncentracije olova, nikla i mangana. Ovdje izneseni rezultati potkrepljuju tu pretpostavku, jer oštećenja DNK, izazvana olovom, niklom i manganom u našim uvjetima, nisu toliko značajna, a da bi mogla biti uzrokom i značajnih promjena na DNK (26).

Pretpostavlja se da će agens koji izaziva lomove na lancima DNK, kao i agens koji utječe na reparatorne procese tih lomova, utjecati i na učestalost SCE u normalnim stanicama. Kadmij izrazito potvrđuje ovu pretpostavku. Multipli lomovi kromosoma, odnosno njihova pulverizacija, kao i izuzetno velik broj SCE već pri niskoj koncentraciji kadmija, upućuje na to da je njegov put remećenja sinteze DNK vrlo direktan. Taj metal pokazuje i izrazitu mutagenu aktivnost.

Ukoliko strukturna oštećenja kromosoma i učestalost sestrinskih kromatidnih izmjena nisu značajno povećani u odnosu na netretirani uzorak, podatak može biti ozbiljan pokazatelj da testirana supstanca ne oštećuje genetsku masu stanice.

Literatura

1. Cox, R.: Comparative Mutagenesis in Cultured Mammalian Cells, Progress in Environmental Mutagenesis, Proceedings of the EEMS 9th Annual Meeting, Tučepi, Yugoslavia 30th September — 5th October, 1979, Elsevier/North-Holland Biomedical Press Amsterdam-New York-Oxford, (1980) 33.
2. Wolff, S.: Sister chromatid exchange: The most sensitive mammalian system for determining the effects of mutagenic carcinogens, Genetic Damage in Man Caused by Environmental Agents, Ur.: Kare Berg, Academic Press, 229.
3. Lambert, B., Hansson, K., Lindsten, J., Sten, M., Hereditas, 83 (1976) 163.

4. Taylor, J. H., Woods, P. S., Hughes, W. L.: Proc. Nat. Acad. Sci., 43 (1958) 122.
5. Zakharov, A. F., Egolina N. A.: Chromosoma (Berl.), 38 (1972) 341.
6. Latt, S. A.: Proc. Nat. Acad. Sci., 71 (1974) 3162.
7. Kato, H.: Nature, 251 (1974) 70.
8. Perry, P., Wolff S.: Nature, 251 (1974) 156.
9. Korenberg, J. R., Freedlender E. F.: Chromosoma (Berl.) 48 (1974) 355.
10. Stetka, D. G., Wolff, S.: Mutation Res., 41 (1976) 333.
11. Stetka, D. G., Wolff, S.: Mutation Res., 41 (1976) 343.
12. Abe, S., Sasaki, M.: J. Natl. Cancer Inst., 58 (1977) 1635.
13. Littlefield, G. L., Colyer, S., Sayer, A. M., Dufrain R. J.: Mutation Res., 67 (1979) 259.
14. Nevstad, N. P.: Mutation Res., 57 (1978) 253.
15. Crossen, P. E., Morgan, W. F.: New Zealand Med. J., 88 (1978) 192.
16. Lambert, B., Ehrnst, A., Hansson, K., Lindblad, A., Morad, M., Verelius B.: Hum. Genet., 50 (1979) 291.
17. Knuutila, S., Mäki-Paakkanen, J., Kähkönen, M., Hokkanen, E.: Hum. Genet., 41 (1978) 89.
18. Knuutila, S., Helminen, E., Vuopio, P., De La Chapelle, A.: Hereditas, 88 (1978) 189.
19. Scott, D.: Molecular Mechanisms of Chromosome Structural Changes, Progress in Environmental Mutagenesis, Proceedings of the EEMS 9th Annual Meeting Tučepi, Yugoslavia 30th September — 5th October, 1979, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam-New York-Oxford, 1980, 101.
20. Monticone, R. E., Schneider E. L.: Mutation Res., 59 (1979) 215.
21. Liebeskind, D., Bases, R., Mendez, F., Elequin P., Koenigsberg M.: Science, 205 (1979) 1273.
22. Murray, M. J., Flessel, C. P.: Biochim. Biophys. Acta, 425 (1976) 256.
23. Škreb Y., Habazin-Novak V.: Toxicology, 5 (1975) 167.
24. Beek, B., Obe, G.: Humangenetik, 29 (1975) 127.
25. Horvat, Đ.: Strukturalna oštećenja kromosoma u kulturi ljudskih i animalnih stanica nakon izloženosti kadmiju, neobjavljen rad.
26. Škreb, Y., Horvat, Đ., Račić, J.: Relationships Between Colony Forming Ability, DNA Synthesis and Sister Chromatid Exchanges in V79 Chinese Hamster Cells During Acute Intoxication by Heavy Metals, Proceedings of the II International Symposium »Tissue Culture in Medical Research«. Cardiff 1—3 IV 1980. Pergamon Press LTD, 107.

Summary

THE FREQUENCY OF SISTER CHROMATID EXCHANGES IN V79
CHINESE HAMSTER CELLS EXPOSED TO HEAVY METALS

The mutagenic activity of Pb^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} was tested by the method of sister chromatid exchanges (SCE). The results show that in the given experimental conditions lead and nickel did not cause any significant change in the SCE rate, while manganese, depending on the dose, increased the number of exchanges. Cadmium exerted a marked mutagenic action. At the end of a 2-hour incubation of V79 Chinese hamster cells even the lowest tested cadmium concentration brought about the doubling of SCE.

*Institute for Medical Research
and Occupational Health,
Zagreb*

*Received for publication
October 6, 1980*