

# ANTINEOPLASTIČNI LIJEKOVI KAO ČIMBENIK RIZIKA U RADNOM OKOLIŠU: MEHANIZMI DJELOVANJA NA RAZINI STANICE I PREGLED METODA ZA OTKRIVANJE NJIHOVIH GENOTOKSIČNIH UČINAKA

Nevenka KOPJAR, Davor ŽELJEŽIĆ, Vilena KAŠUBA i Ružica ROZGAJ

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska*

Primljeno u siječnju 2010.  
Prihvaćeno u veljači 2010.

U članku je prikazana osnovna podjela antineoplastičnih lijekova prema mehanizmima djelovanja na razini stanice. Objašnjeni su mehanizmi genotoksičnosti najvažnijih vrsta lijekova koji se primjenjuju u okviru uobičajenih protokola za liječenje zloćudnih novotvorina. Navedena je važeća klasifikacija antineoplastika prema kancerogenom potencijalu, podaci o mutagenom potencijalu te je prikazana njihova podjela u skladu s anatomsko-terapijsko-kemijskim sustavom klasifikacije. Sustavno su prikazani najvažniji rezultati svjetskih i hrvatskih istraživanja na populacijama radnika izloženih antineoplasticima, provedenih u razdoblju 1980.-2009. s pomoću četiri najčešće primjenjivane metode: analize izmjena sestrinskih kromatida, analize kromosomskih aberacija, mikronukleus-testa i komet-testa. Objašnjena su osnovna načela navedenih metoda te raspravljene njihove prednosti i nedostaci. Biološki pokazatelji daju važne podatke o individualnoj osjetljivosti profesionalno izloženih ispitanika koji mogu poslužiti unaprjeđenju postojećih uvjeta rada i upravljanju rizicima pri izloženosti genotoksičnim agensima. Na osnovi prednosti i nedostataka citogenetičkih metoda zaključeno je da je mikronukleus-test, koji podjednako uspješno dokazuje klastogene i aneugene učinke, jedna od najboljih metoda dostupnih za otkrivanje štetnih djelovanja antineoplastičnih lijekova koji su u aktivnoj primjeni.

**KLJUČNE RIJEČI:** *DNA, izmjene sestrinskih kromatida, komet-test, kromosomske aberacije, mikronukleus-test*

Liječnici specijalisti medicine rada u okviru svoje prakse provode i zdravstveni nadzor nad radnicima koji rukuju različitim vrstama lijekova za liječenje zloćudnih bolesti. Do izloženosti tim lijekovima dolazi pod različitim okolnostima, počevši od njihove proizvodnje, preko prijevoza od proizvođača do korisnika, pohrane na mjestima skladištenja, pripreme infuzijskih otopina u bolničkim ljekarnama ili na odjelima, primjene lijekova u liječenju bolesnika i naposljetku uklanjanja citotoksičnog otpada te čišćenja prostora i predmeta s kojima su bolesnici

bili u kontaktu. Najčešći putovi unosa tih lijekova u organizam jesu udisanje i kontakt preko kože te nehotečno gutanje i ubodne ozljede što se nerijetko događa zbog nepoznavanja ili nepoštivanja propisa za siguran rad (1).

Većina lijekova za liječenje zloćudnih bolesti ubraja se u skupinu opasnih lijekova (1) koji imaju najmanje jednu od šest značajki, potvrđenih na eksperimentalnim životinjama i/ili populacijama liječenih bolesnika, odnosno u kratkotrajnim testovima u uvjetima *in vitro*. To su: (a) kancerogenost; (b) teratogenost ili

embriotoksičnost; (c) reproduktivna toksičnost; (d) toksični učinci na pojedine organe ili sustave organa dokazivi već pri niskim dozama; (e) genotoksičnost, odnosno mutagenost i/ili klastogenost; (f) struktura i/ili aktivnost slična ranije dokazanim opasnim lijekovima. Njihova podjela prema anatomsko-terapijsko-kemijskom (ATK) sustavu razvrstavanja lijekova (2, 3) prikazana je na tablici 1.

Razine izloženosti opasnim lijekovima ovise o nekoliko glavnih čimbenika, među kojima su najvažniji vrste i količine lijekova koje se pripremaju, učestalost i trajanje pripreme lijekova, tehnički uvjeti i opremljenost prostora u kojima se pripremaju i primjenjuju lijekovi te odlaže nastali otpad, primjena osobnih zaštitnih sredstava pri radu i obučenosn radnika, a osobito pridržavanje propisa za siguran rad (1). Unatoč primjeni svih sigurnosnih mjera i propisa pri radu, štetni su učinci za zdravlje izloženih radnika neizbježni pa je ta vrsta izloženosti povezana s rizicima koje poslodavac mora prepoznati, smanjivati i njima upravljati na odgovarajući način.

U ovome preglednom radu ograničit ćemo se ponajprije na antineoplastične lijekove (citostatici, citotoksični lijekovi, antitumorski lijekovi) i objasniti njihov kancerogeni i mutageni potencijal te raspraviti o osnovnim mehanizmima njihove toksičnosti na razini stanice. Također ćemo dati kratak prikaz najvažnijih citogenetičkih metoda koje se mogu primijeniti u nadzoru nad profesionalno izloženim populacijama.

#### *Kancerogeni i mutageni potencijal antineoplastičnih lijekova*

Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) Svjetske zdravstvene organizacije sa sjedištem u Lyonu (Francuska) vrednuje kancerogeni potencijal različitih kemijskih i fizikalnih agensa te ih razvrstava u nekoliko skupina: 1 - kancerogeni za ljude; 2A - vjerojatno kancerogeni za ljude; 2B - moguće kancerogeni za ljude; 3 - ne mogu se klasificirati kao kancerogeni za ljude (nema dovoljno dokaza); 4 - vjerojatno nisu kancerogeni za ljude (4).

Razvrstavanje antineoplastičnih lijekova prema kancerogenom potencijalu prikazano je na tablici 2. gdje su navedeni i ostali najvažniji podaci o lijekovima koji su u aktivnoj primjeni pa je sigurno da bi medicinsko osoblje pri radu moglo s njima dolaziti u kontakt. U tijeku je priprema novog volumena 100A koji će sadržavati najnovije podatke o kancerogenom potencijalu antineoplastičnih lijekova, a ponajprije onih svrstanih u skupinu 1. U međuvremenu su neki lijekovi slijedom novih dokaza prebačeni u druge

**Tablica 1** Podjela lijekova za liječenje zloćudnih bolesti prema anatomsko-terapijsko-kemijskom (ATK) sustavu razvrstavanja lijekova (2,3)

#### **L Lijekovi za liječenje zloćudnih bolesti**

##### L01 ANTINEOPLASTICI

##### **L01A Alkilirajući lijekovi**

*L01AA Analozni dušikova plikavca*

*L01AB Alkil-sulfonati*

*L01AC Etilen-imini*

*L01AD Nitrozouree*

*L01AG Epoksidi*

*L01AX Ostali alkilirajući lijekovi*

##### **L01B Antimetaboliti**

*L01BA Analozni folne kiseline*

*L01BB Analozni purina*

*L01BC Analozni pirimidina*

##### **L01C Biljni alkaloidi i ostali prirodni spojevi**

*L01CA Vinka-alkaloidi i njihovi analozni*

*L01CB Derivati podofilotoksina*

*L01CC Derivati kolhicina*

*L01CD Taksani*

*L01CX Ostali biljni alkaloidi i prirodni spojevi*

##### **L01D Citotoksični antibiotici i njima srodne tvari**

*L01DA Aktinomycin*

*L01DB Antraciklini i njima srodni spojevi*

*L01DC Ostali citotoksični antibiotici*

##### **L01X Ostali antineoplastici**

*L01XA Spojevi platine*

*L01XB Metilhidrazini*

*L01XC Monoklonska protutijela*

*L01XD Lijekovi koji se primjenjuju u fotodinamičkoj i/ili radioterapiji*

*L01XE Inhibitori protein-kinaze*

*L01XX Ostali*

*L01XY Kombinacije antineoplastičnih lijekova*

##### L02 ENDOKRINA TERAPIJA

##### L03 IMUNOSTIMULATORI

##### L04 IMUNOSUPRESIVI

skupine, primjerice etopozid iz skupine 2A u skupinu 1 (5).

Za čovjeka je sigurno kancerogeno osam vrsta antineoplastičnih lijekova koji su u aktivnoj primjeni (busulfan, ciklofosfamid, etopozid, klorambucil, melfalan, metil-CCNU, tiotepa i treosulfan), jedan koji se primjenjuje samo u istraživačke svrhe (klornafazin) te dvije kombinacije lijekova: etopozid s bleomicinom i cisplatinom i kemoterapijski protokol MOPP (klormetin, vinkristin, prokarbazin i prednizon) zajedno s drugim kombiniranim protokolima koji sadržavaju alkilirajuće lijekove (5). Vjerojatno je kancerogeno osam vrsta antineoplastika koji su u aktivnoj primjeni

te tri koja se primjenjuju samo u istraživačke svrhe (klorozotocin, *N*-etil-*N*-nitrozourea i *N*-metil-*N*-nitrozourea) (5). Moguće kancerogeno ih je devet (5), od čega je sedam u aktivnoj primjeni. Preostala dva su aziridin (etilen-imin) i merfalan (racemična smjesa melfalana koji se aktivno primjenjuje i njegova desnog enantiomera medfalan) (6). Sedam vrsta antineoplastika zbog nedostatka dokaza ne može se klasificirati kao kancerogeno za ljude (5). Međutim, u aktivnoj je primjeni i najmanje dvadesetak vrsta antineoplastičnih lijekova čiji kancerogeni potencijal IARC još nije vrednovao (tablica 2), što upućuje na rastuću zabrinutost zbog mogućih zdravstvenih rizika u izloženosti osoblja koje njima svakodnevno rukuje.

Premda se kancerogeni i mutageni potencijal nužno ne trebaju preklapati, većina kancerogenih antineoplastičnih lijekova ujedno je i mutagena, što je dodatni rizik za zdravlje izloženih radnika (1). Poznavanje mutagenog potencijala pojedinih vrsta antineoplastika osobito je važno u nadzoru nad profesionalno izloženim populacijama jer posljedice mutacija nastalih pod utjecajem antineoplastika ne moraju biti vidljive neposredno nakon što se dogodila izloženost i katkada dolaze do izražaja tek više godina nakon njezina prestanka. O rizicima profesionalne izloženosti antineoplastičnim lijekovima ozbiljnije se počelo raspravljati 1979. kada su Falck i suradnici (7) dokazali mutagenost urina medicinskih sestara koje su rukovale antineoplastima.

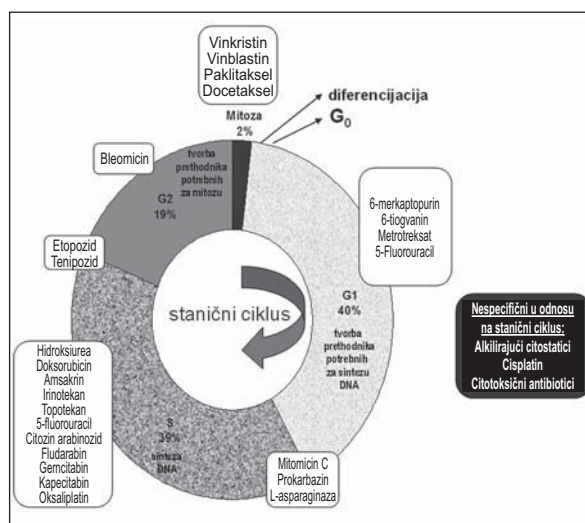
Antineoplastični lijekovi koji su trenutačno u aktivnoj primjeni međusobno se razlikuju prema mutagenom potencijalu, koji se može procijeniti s pomoću različitih testova. Vrlo mutageni su primjerice alkilirajući lijekovi, međutim, tek nakon metaboličke aktivacije putem citokroma P450 (8). Slično je utvrđeno za cisplatin i njegove analoge (9). Općenito uzevši, mutageni je potencijal antineoplastika u uskoj vezi s njihovim mehanizmima djelovanja (10). Također, razlike u mutagenim koncentracijama tih lijekova mogu iznositi i do nekoliko redova veličine. Dok su neki lijekovi, primjerice aktinomycin D i daunorubicin, mutageni već pri vrlo niskim koncentracijama ( $3 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> do  $1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>), drugi su mutageni tek pri visokim koncentracijama. Takav je primjer dakarbazin koji je slabo mutagen tek pri  $2 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> (11).

Do današnjih je dana mutageni potencijal antineoplastika na profesionalno izloženim populacijama istražen i dokazan primjenom različitih metoda, o čemu ćemo pobliže raspraviti u drugom dijelu članka.

## MEHANIZMI TOKSIČNOSTI ANTINEOPLASTIČNIH LIJEKOVA NA RAZINI STANICE

Toksičnost antineoplastičnih lijekova na razini stanice zasniva se na različitim mehanizmima, a za njihovo je tumačenje korisno poznavati podjelu tih lijekova u glavne skupine. Najjednostavnija podjela u antineoplastične lijekove svrstava: lijekove koji izravno ili neizravno oštećuju DNA; antimetabolite; lijekove koji djeluju na mikrotubule diobenog vretena; hormone; ostale i radiofarmaceutike (12). Znanstvenici se, međutim, nisu potpuno usuglasili oko jedinstvene podjele antineoplastičnih lijekova, pa se u literaturnim izvorima nerijetko nailazi na svrstavanje jednog te istog lijeka u različite skupine. Primjer je cisplatin koji neki ubrajaju među alkilirajuće lijekove, dok ga drugi sustavi klasifikacije svrstavaju među ostale antineoplastike.

Za razumijevanje mehanizama toksičnosti antineoplastika treba dobro poznavati osnovne značajke staničnog ciklusa, budući da različiti lijekovi nisu podjednako učinkoviti u svim fazama staničnog ciklusa (13). Na slici 1. shematski je prikazan stanični ciklus i naznačeni su primjeri specifičnog djelovanja nekih vrsta lijekova. Za razliku od lijekova koji su ovisni o određenoj fazi staničnog ciklusa (primjerice oni koji remete sintezu DNA imaju najjače djelovanje u S-fazi), neki drugi lijekovi, ponajprije alkilirajući lijekovi i citotoksični antibiotici, nespecifičnog su djelovanja u odnosu na stanični ciklus (12).



Slika 1 Shematski prikaz staničnog ciklusa i primjeri djelovanja nekih vrsta antineoplastičnih lijekova. Prilagođeno prema (13).

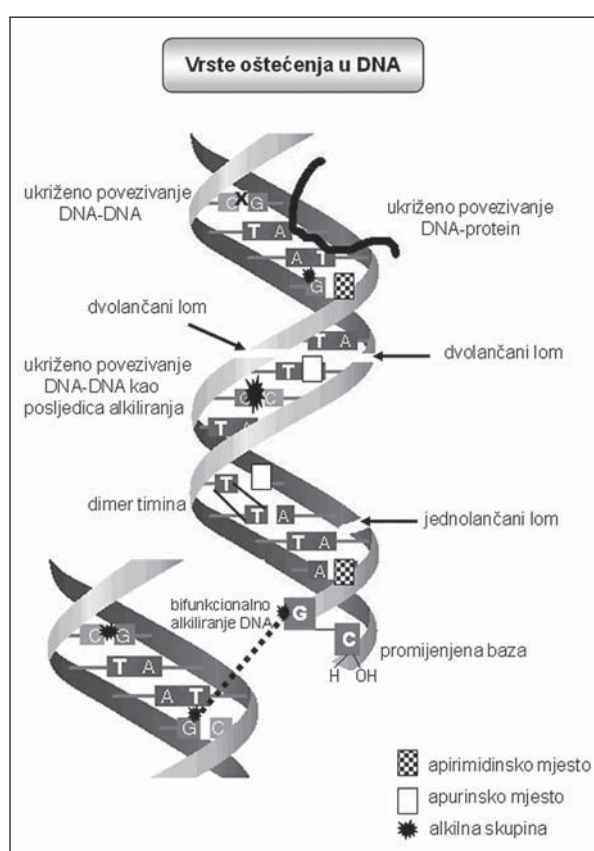
**Tablica 2** Podjela antineoplastika prema kancerogenosti i anatomsko-terapijsko-kemijskom (ATK) sustavu razvrstavanja lijekova (1-5)

Status prema IARC*	Generičko ime	Zaštićeno ime	CAS broj / Šifra ATK	Klasifikacija
1	Busulfan	Myleran®	55-98-1; L01AB01	Alkilirajući lijekovi; alkil-sulfonati
	Ciklofosamid	Endoxan®	50-18-0; L01AA01	Alkilirajući lijekovi; analozi dušikova plikavca
	Etopozid	Etoposide®, Vepesid®	33419-42-0; L01CB01	Biljni alkaloidi; derivati podofilotoksina
	Klorambucil	Leukeran®	305-03-3; L01AA02	Alkilirajući lijekovi; analozi dušikova plikavca
	Melfalan	Alkeran®	148-82-3; L01AA03	Alkilirajući lijekovi; analozi dušikova plikavca
	Metil-CCNU	Semustine®	13909-09-6; L01AD03	Alkilirajući lijekovi; nitrozouree
	Tiotepa	Thiopex®	52-24-4; L01AC01	Alkilirajući lijekovi; etilen-imini
	Treosulfan	Treosulfan®	299-75-2; L01AB02	Alkilirajući lijekovi; alkil-sulfonati
2A	Azacitidin	Vidaza®	320-67-2; L01BC07	Antimetaboliti; analozi pirimidina
	Cisplatin	Cisplatin®, Platinex®	15663-27-1; L01XA01	Ostali antineoplastici; spojevi platine
	Doksorubicin	Adriablastina®	23214-92-8; L01DB01	Citotoksični antibiotici i njima srodne tvari; antraciklini
	Karmustin	BICNU®	154-93-8; L01AD01	Alkilirajući lijekovi; nitrozouree
	Klormetin	Mustargen®	51-75-2; L01AA05	Alkilirajući lijekovi; analozi dušikova plikavca
	Lomustin	CeeNU®	13010-47-4; L01AD02	Alkilirajući lijekovi; nitrozouree
	Prokarbazin	Natulan®	366-70-1; L01XB01	Ostali antineoplastici; metilhidrazini
Tenipozid	Vumon®	29767-20-2; L01CB02	Biljni alkaloidi; derivati podofilotoksina	
2B	Amsakrin	AMSA PD®	51264-14-3; L01XX01	Ostali antineoplastici
	Bleomicin	Blenoxane®	11056-06-7; L01DC01	Citotoksični antibiotici i njima srodne tvari; ostali
	Dakarbazin	Dacarbazine®	4342-03-4; L01AX04	Alkilirajući lijekovi; ostali
	Daunomicin	Daunoblastina®	20830-81-3; L01DB02	Citotoksični antibiotici i njima srodne tvari; antraciklini
	Mitomycin C	Mutamycin®	50-07-7; L01DC03	Citotoksični antibiotici i njima srodne tvari; ostali
	Mitoksantron	Mitoxantrone®	65271-80-9; L01DB07	Citotoksični antibiotici i njima srodne tvari; antraciklini
	Streptozotocin	Zanosar®	18883-66-4; L01AD04	Alkilirajući antineoplastici; nitrozouree
3	Aktinomicin D	Cosmegen®	50-76-0; L01DA01	Citotoksični antibiotici i njima srodne tvari; aktinomocini
	5-Fluorouracil	Fluorouracil®	51-21-8; L01BC02	Antimetaboliti; analozi pirimidina
	Ifosfamid	Holoxan®	3778-73-2; L01AA06	Alkilirajući lijekovi; analozi dušikova plikavca
	6-Merkaptopurin	Puri-nethol®	50-44-2; L01BB02	Antimetaboliti; analozi purina
	Metotreksat	Methotrexate®	59-05-2; L01BA01	Antimetaboliti; analozi folne kiseline
	Vinblastin	Velbe®	143-67-9; L01CA01	Biljni alkaloidi; vinka-alkaloidi i njihovi analozi
	Vinkristin	Vincristine®, Oncovin®	2068-78-2; L01CA02	Biljni alkaloidi; vinka-alkaloidi i njihovi analozi
???	Citarabin	Cytosar®	69-74-9; L01BC01	Antimetaboliti; analozi pirimidina
	Docetaksel	Taxotere®	114977-28-5; L01CD02	Biljni alkaloidi; taksani
	Epirubicin	Farmorubicin®	57918-25-9; L01DB03	Citotoksični antibiotici i njima srodne tvari; antraciklini
	Estramustin	Estracyt®	2998-57-4; L01XX11	Ostali antineoplastici
	Fludarabin	Fludara®	75607-67-9; L01BB05	Antimetaboliti; analozi purina
	Gemcitabin	Gemzar®	95058-81-4; L01BC05	Antimetaboliti; analozi pirimidina
	Hidroksiureja	Litalir®	8029-68-3; L01XX05	Ostali antineoplastici
	Idarubicin	Zavedos®	58957-92-9; L01DB06	Citotoksični antibiotici i njima srodne tvari; antraciklini
	Irinotekan	Campto®,	136572-09-3; L01XX19	Ostali antineoplastici
	Kapecitabin	Xeloda®	158798-73-3; L01BC06	Antimetaboliti; analozi pirimidina
	Karboplatin	Paraplatin®	41575-94-4; L01XA02	Ostali antineoplastici; spojevi platine
	Kladribin	Litak®, Leustatin®	4291-63-8; L01BB04	Antimetaboliti; analozi purina
	L-asparaginaza	Elspar®, Kidrolase®	9015-68-3; L01XX02	Ostali antineoplastici
	Oksaliplatin	Eloxantin®	63121-00-6; L01XA03	Ostali antineoplastici; spojevi platine
	Paklitaksel	Taxol®	33069-62-4; L01CD01	Biljni alkaloidi; taksani
	Tegafur	Ftorafur®	82294-77-7; L01BC03	Antimetaboliti; analozi pirimidina
	Temozolomid	Temodal®	85622-93-1; L01AX03	Alkilirajući antineoplastici; ostali
	Tiogvanin	Lanvis®	5580-03-0; L01BB03	Antimetaboliti; analozi purina
	Topotekan	Hycamtin®	119413-54-6; L01XX17	Ostali antineoplastici
	Vinorelbin	Navelbine®	71486-22-1; L01CA04	Biljni alkaloidi; vinka-alkaloidi i njihovi analozi

\* - Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) razvrstala je antineoplastične lijekove prema kancerogenosti u nekoliko skupina: 1 - kancerogeni za ljude; 2A - vjerojatno kancerogeni za ljude; 2B - moguće kancerogeni za ljude; 3 - ne mogu se klasificirati kao kancerogeni za ljude (nema dovoljno dokaza). O kancerogenosti lijekova označenih s ??? IARC još nije dao nikakve službene podatke.



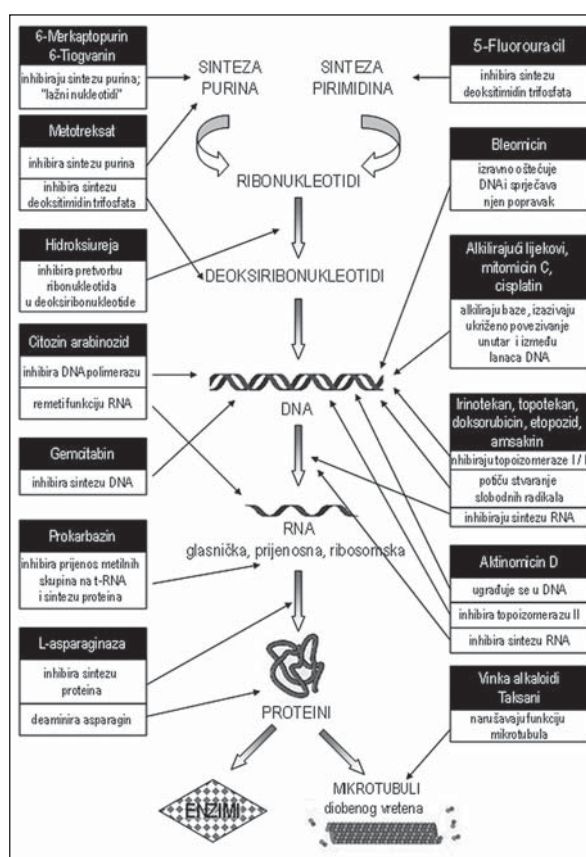
Pri tumačenju djelovanja antineoplastičnih lijekova na razini genoma važno je poznavati glavne vrste oštećenja koja takvi spojevi mogu izazvati u molekuli DNA. Primjeri glavnih ciljnih mjesta djelovanja antineoplastičnih lijekova u molekuli DNA prikazani su na slici 2. Oštećenja u molekuli DNA neposredno izazivaju svi alkilirajući lijekovi, dakarbazin, prokarbazin, cisplatin i karboplatin, dok ona mogu nastati i posrednim djelovanjem nekih antineoplastika, poput citotoksičnih antraciklinskih antibiotika, kamptotecina, epopodofilotoksina, bleomicina i aktinomomicina D (12).



**Slika 2** Najvažnija ciljna mjesta i vrste oštećenja u molekuli DNA koja nastaju pod utjecajem antineoplastičnih lijekova

Na slici 3. dan je prikaz osnovnih mehanizama toksičnosti antineoplastičnih lijekova u stanici, počevši od sinteze purina i pirimidina kao prethodnika sinteze DNA i RNA, preko sinteze proteina i drugih staničnih komponenata nužnih za održavanje stanične strukture i funkcije (13).

Kratki prikaz mehanizama toksičnosti iznosimo u skladu s njihovom ranije navedenom klasifikacijom prema anatomsko-terapijsko-kemijskom (ATK) sustavu razvrstavanja lijekova (2, 3).



**Slika 3** Prikaz osnovnih mehanizama toksičnosti antineoplastičnih lijekova na razini stanice. Prilagođeno prema (13).

### Alkilirajući lijekovi

Alkilirajući lijekovi okosnica su mnogih kemoterapijskih protokola za liječenje zloćudnih novotvorina. U tu skupinu lijekova ubrajamo dušikov plikavac (klometin ili meklorektamin), prvi u povijesti upotrijebljeni antineoplastik te nekoliko njegovih analoga. Njihove vrlo reaktivne molekule mogu se kovalentno vezati s različitim kemijskim skupinama (fosfatna, amino, sulfhidrilna, hidroksilna, imidazolna) u nukleinskim kiselinama i proteinima stvarajući DNA-adukte koji ometaju udvostručavanje DNA i transkripciju. Najčešće mjesto alkiliranja je N<sup>7</sup> položaj gvanina (12, 14). Iako se položaj O<sup>6</sup> u bazama rjeđe alkilira, O<sup>6</sup>-alkilG i O<sup>4</sup>-alkilT visoko su mutagene i genotoksične lezije, dok su N-alkilirana mjesta (npr. 3-alkilA i 1-alkilA) citotoksične, ali manje mutagene lezije u DNA (15). Razlikujemo monofunkcionalna i bifunkcionalna alkilirajuća sredstva. Potonja imaju dvije reaktivne kloroetilne skupine koje mogu reagirati s N<sup>7</sup> u gvaninu iz drugog lanca DNA dovodeći do ukriženog (unakrsnog) povezivanja lanaca. Ako se ukriženo povežu DNA i proteini, takva oštećenja

uvelike remete njihove funkcije i uzrokuju smrt stanice.

Najčešće primjenjivani lijek iz ove skupine je ciklofosamid. Kako njegova farmakokinetika uključuje metaboličko aktiviranje u jetri, smatramo ga predlijekom (16). Srodan mu je ifosfamid (17). Melfalan i klorambucil obično se primjenjuju *per os* (18). U podskupinu etilen-imina spada tiotepa (12). Od predstavnika alkil-sulfonata najvažniji je busulfan, bifunkcionalni agens koji specifično reagira sa -SH-skupinama u aminokiselinama i proteinima (17). U podskupinu nitrozourea ubrajaju se karmustin ili biskloretil nitrozourea (BCNU) koji djeluje bifunkcionalno te lomustin ili cikloheksil-kloretil-nitrozourea (CCNU) i semustin ili metil-CCNU, kao monofunkcionalna alkilirajuća sredstva (19). U ostale alkilirajuće lijekove ubraja se dakarbazin (17). Od predstavnika novije generacije značajan je temozolomid (18). Svi navedeni lijekovi alkiliranjem DNA izazivaju različita oštećenja u DNA (lomove, gubitak baza, otvaranje prstenova) koja dovode do mutacija, a uklanjanje pogrešno sparenih nukleotida može rezultirati i fragmentiranjem molekule DNA (12).

#### *Antimetaboliti*

Djelovanje im se zasniva na različitim mehanizmima, uključujući nadmetanje za aktivna mjesta na enzimima i ugradnju u nukleinske kiseline. Na taj način remete sintezu DNA ili RNA, dovodeći do inhibicije rasta ili smrti stanice (12). Najvažniji predstavnik podskupine analoga folne kiseline je metotreksat, snažan inhibitor dihidrofolat reduktaze (18). U analoge purina ubrajaju se 6-merkaptopurin i 6-tiogvanin, analozi baza hipoksantina i gvanina koji inhibiraju *de novo* sintezu purina i njihovu ugradnju u DNA, a i sami se mogu ubacivati kao lažni nukleotidi (12, 17). Fludarabin inhibira enzime DNA-polimerazu a, ribonukleotid reduktazu i DNA-primazu, a kao lažni nukleotid može se ugraditi u molekulu DNA (18). Kladribin je analog deoksiadenozina specifičan za limfoidne stanice (12). Najpoznatiji i najčešće upotrebljavan analog pirimidina je 5-fluorouracil koji inhibira timidilat sintetazu i stvaranje deoksitimidin trifosfata, jednog od četiri potrebna prethodnika sinteze DNA (18). Citozin arabinozid je analog 2-deoksicitidina koji se kao kompetitivni inhibitor, a ujedno i supstrat DNA-polimeraze, ugrađuje u DNA i time onemogućava daljnje produljenje lanca. Noviji predstavnici ove skupine su gemcitabin i kapecitabin. Gemcitabin trifosfat ugrađuje se u molekulu DNA

inhibirajući sintezu DNA. Izaziva apoptozu te inhibira timidilat sintetazu i ribonukleotid reduktazu (12, 20). Kapecitabin se pak u stanici prevodi u fluorouracil čiji su učinci opisani ranije.

#### *Biljni alkaloidi i ostali prirodni spojevi*

Prema mehanizmima djelovanja dijelimo ih na inhibitore mitoze i inhibitore funkcije kromatina. U inhibitore mitoze ubrajamo vinka-alkaloide i taksane te njihove analoge (12). Vinka-alkaloide i njihovi analozi vežu se na tubulin, osnovni građevni element mikrotubula koji stvaraju diobenno vreteno. Sprječavanjem polimerizacije tubulina te izazivanjem depolimerizacije postojećih tubula nepovratno narušavaju funkciju diobenog vretena i uzrokuju zastoj u kasnoj G<sub>2</sub>-fazi, odnosno smrt stanice u metafazi (12, 21). Najvažniji prirodni vinka-alkaloide su vinkristin i vinblastin, a sintetski vindesin i vinorelbin. Taksani (paklitaksel i docetaksel) izazivaju nepovratnu stabilizaciju mikrotubula dovodeći do njihova nakupljanja u stanici čime remete ravnotežu između slobodnog tubulina i mikrotubula (21, 22).

U lijekove koji remete funkciju kromatina ubrajamo polusintetske glikozidne derivate podofilotoksina: etopozid i tenipozid, inhibitore DNA-topoizomeraze II, enzima koji sudjeluje u selektivnom odmatanju pojedinih odsječaka DNA tijekom transkripcije i udvostručavanja (12). Stvaranjem kompleksa s navedenim enzimom etopozid i tenipozid remete njegovu funkciju te izazivaju jednolančane i /ili dvolančane lomove u DNA. Toksičnosti etopozida pridonose i slobodni radikali koji nastaju u stanici (14, 22).

#### *Citotoksični antibiotici i njima srodne tvari*

Imaju različite mehanizme djelovanja, ali većina se ubacuje (interkalira) između parova baza u DNA i narušava sintezu i/ili funkciju nukleinskih kiselina, dok neki izazivaju lomove u DNA i inhibiciju enzima DNA-topoizomeraze II (12).

Aktinomicin D inhibira sintezu mRNA čime je onemogućena i sinteza proteina (12, 21, 24). Antraciklinski antibiotici doksorubicin i daunomicin vežu se na dvolančanu molekulu DNA i umetanjem između lanaca remete sintezu i DNA i RNA, inhibiraju DNA-topoizomerazu II, izazivaju dvolančane i jednolančane lomove u DNA te stvaranje slobodnih radikala. Doksorubicin također alkilira makromolekule, potiče stvaranje slobodnih radikala koji dodatno oštećuju DNA (12, 14) i vrlo je kardiotoksičan.

Daunorubicin može inhibirati aktivnost enzima polimeraze i utječe na regulaciju ekspresije gena (25). Doksorubicinu su strukturno i funkcionalno srodni epirubicin i mitoksantron, a daunorubicinu idarubicin.

Bleomicin je mješavina peptida male molekularne mase. Veže se na DNA te nakon stvaranja kompleksa sa željezom izaziva brojne jednolančane i dvolančane lomove koji dovode do fragmentiranja DNA. Osim toga, aktivira kisik pri čemu nastaje superoksid radikal. Uzrokuje inhibiciju sinteze DNA, a u manjoj mjeri utječe na inhibiciju sinteze RNA i proteina (12, 26-28).

Mitomycin C nakon aktiviranja u stanici djeluje kao alkilirajući agens uzrokujući ukriženo povezivanje lanaca. Potiče stvaranje slobodnih radikala i lomova u DNA. Inhibira sintezu i funkciju DNA, a u višim koncentracijama i RNA (12, 14, 21, 24).

#### *Ostali antineoplastici*

Spojevi koji sadržavaju platinu po mehanizmu djelovanja slični su alkilirajućim lijekovima. Najpoznatiji je cisplatin koji alkilira N<sup>7</sup> gvanina i adenina u DNA i RNA dovodeći do promjena u konformaciji DNA i inhibicije sinteze DNA (14). Srodan mu je karboplatin, slabije neurotoksičnosti i nefrotoksičnosti, koji izaziva slična oštećenja na razini DNA (12, 14, 29). Noviji srodnik im je oksaliplatin koji je i značajno citotoksičniji te selektivno inhibira sintezu DNA, a pri višim koncentracijama i sintezu RNA i proteina (30).

Od metilhidrazina značajan je prokarbazin koji postaje citotoksičan nakon metaboliziranja u jetri. Metilira O<sup>6</sup> položaj gvanina. Inhibira prijenos metilnih skupina na tRNA i sintezu proteina, što posljedično inhibira i sintezu RNA i DNA. Potiče stvaranje slobodnih radikala, a može inhibirati i monoamin oksidazu. Izaziva lomove u DNA, te inhibira prijelaz iz G<sub>1</sub> u S-fazu staničnog ciklusa (31, 32).

Brojni antineoplastični lijekovi ne mogu se svrstati ni u jednu od navedenih skupina, pa se prikazuju odvojeno. U skupinu ostalih ubraja se amsakrin koji se može interkalirati u molekulu DNA, izazivajući dvolančane lomove te inhibirati enzim DNA topoizomerazu II (33).

L-asparaginaza je enzim koji hidrolizira L-asparagin, a na to su djelovanje posebice osjetljive neke zloćudne stanice koje ga same ne mogu proizvoditi (12, 14, 31).

Hidroksiurea inhibira pretvorbu ribonukleotida u deoksiribonukleotide čime sprječava sintezu DNA.

Zaustavlja stanice u S-fazi ciklusa te ih sinkronizira na prijelazu G<sub>1</sub>-S-faza (34, 35).

Estramustin je hormonski predlijek čija je molekula građena od estradiola i alkilirajućega dušičnog plikavca, a toksičnost mu je ovisna o metaboličkom aktiviranju. Može se vezati i na tubulin ili proteine mikrotubula te zaustaviti diobu stanice u metafazi, ometa udvostručavanje DNA, potiče stvaranje slobodnih radikala, lomove u DNA, a dovodi i do apoptoze i aneuploidije (31, 36, 37).

Polusintetski derivati biljnog alkaloida kamptotecina topotekan i irinotekan inhibiraju enzim topoizomerazu I, koja proizvodi prolazne (reverzibilne) jednolančane lomove u DNA tijekom udvostručenja DNA. Ti lomovi opuštaju torzijsku napetost u molekuli DNA. Vezanjem na kompleks topoizomeraze I-DNA sprječavaju ponovno spajanje lanca DNA dovodeći do dvolančanih lomova u DNA i smrti stanice (14, 21).

#### ANTINEOPLASTIČNI LIJEKOVI KAO ČIMBENIK RIZIKA U RADNOM OKOLIŠU

Uzevši u obzir sve ranije navedene mehanizme djelovanja antineoplastičnih lijekova na razini stanice, jasno je da je svakodnevno rukovanje takvim agensima rizično za izložene radnike. Glavni nedostatak većine antineoplastičnih lijekova je slaba selektivnost zbog koje oni, osim ciljnih - zloćudno promijenjenih stanica, oštećuju i zdrave stanice i tkiva. Iz te činjenice proizlazi i niz rizika povezanih s primjenom kemoterapije, koji se odražavaju i na liječenoga bolesnika i na izloženo medicinsko osoblje. Zato je nužno poduzeti odgovarajuće mjere kako bi se ostvarila dobrobit za bolesnika i istodobno zaštitilo osoblje uključeno u njegovo liječenje i njegu (38). Kako se većina antineoplastika primjenjuje u kombiniranoj terapiji, medicinsko osoblje je pri radu istodobno izloženo spojevima koji imaju vrlo različite mehanizme djelovanja te različiti genotoksični i kancerogeni potencijal. Stanice u organizmu nisu jednako osjetljive na štetne učinke takvih agensa. Da podsjetimo, stanice u nekome tkivu općenito mogu biti u tri stanja: aktivno dijeleće, diferencirane i stanice u mirovanju (koje mogu ući u diobu pod utjecajem vanjskih čimbenika) (12). Sukladno tomu, razlikuju se i rizici proizašli iz rukovanja antineoplastičnim lijekovima u profesionalno izloženog osoblja. Kako su u zdravog čovjeka diobeno najaktivnije različite



vrste epitelnih stanica (primjerice sluznice probavnog sustava, folikula dlake, kože), stanice koštane srži te spolne stanice, u radnika izloženih antineoplastcima povećan je rizik od pojave mutacija upravo u tim vrstama stanica i tkiva.

Zbog nasumičnog pojavljivanja oštećenja ne postoji razina izloženosti antineoplastičnim lijekovima koja bi se mogla smatrati sigurnom. Stoga postojeće smjernice za siguran rad s antineoplastcima (1, 39-41) preporučuju izloženost svesti na najmanju moguću mjeru, što se postiže radom u odgovarajućem tehnički opremljenom prostoru uz poštivanje mjera zaštite na radu i primjenu osobnih zaštitnih sredstava.

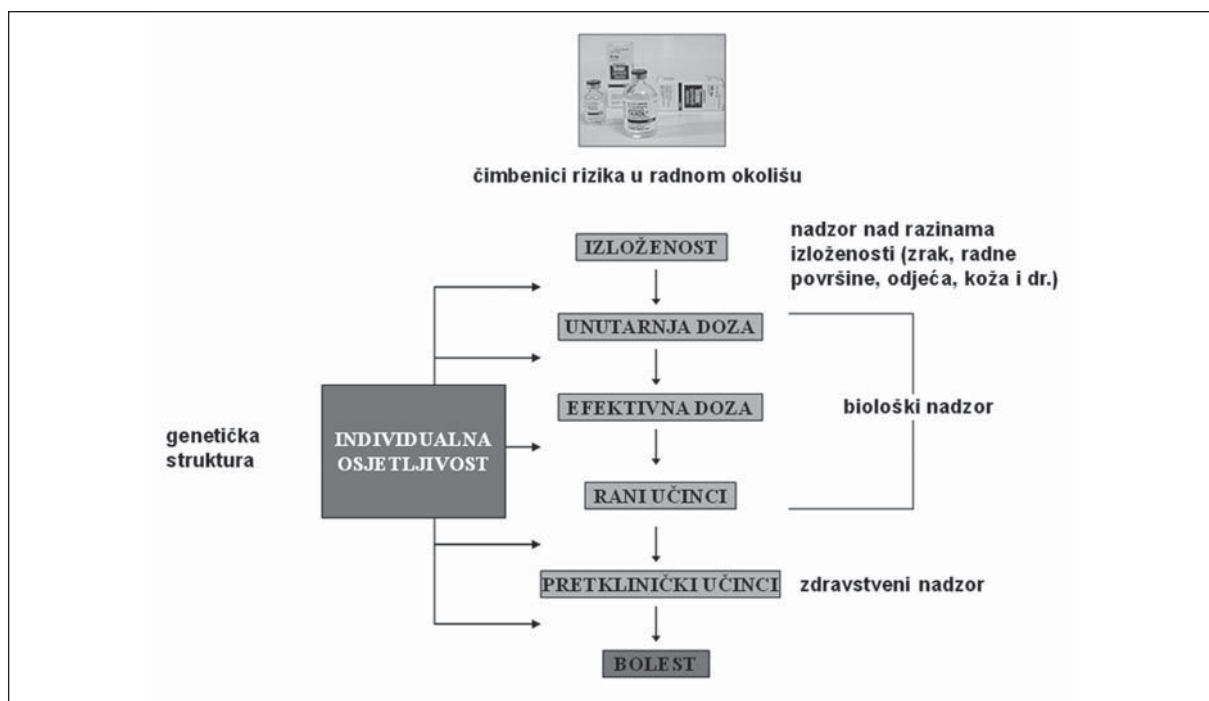
Slika 4. shematski prikazuje događaje i procese koji su uključeni u slijed od izloženosti rizičnim čimbenicima u radnom okolišu do mogućega zdravstvenog učinka, a naznačena su i mjesta na kojima se mogu poduzeti preventivne mjere, kao što su nadzor nad radnim okolišem te biološki i zdravstveni nadzor. Nadzor nad radnim okolišem uključuje mjerenje koncentracija antineoplastika u zraku, na radnim površinama, zaštitnoj odjeći radnika i sl. (42). Biološki nadzor (engl. *biomonitoring*) zasniva se na mjerenju (ili bilježenju učestalosti) različitih bioloških pokazatelja (a to mogu biti različiti spojevi, strukture, pojave, procesi i sl.) koji omogućuju otkrivanje najranijih, još popravljivih bioloških učinaka koji upućuju na pojavu zloćudnih i/ili drugih bolesti koje

se mogu dovesti u vezu s profesionalnom izloženosti. Njihovom primjenom na razini izloženih populacija možemo otkriti ispitanike koji su pod povišenim rizikom.

Dobar biljeg trebao bi imati sljedeće značajke: specifičnost, osjetljivost, dokazanu ovisnost između doze i učinka te bi morao omogućiti utvrđivanje interindividualne i intraindividualne varijabilnosti (43).

Za kvalitetan biološki nadzor uvijek bi se trebalo rukovoditi procjenom opasnosti te poznavati kojim vrstama lijekova ispitanici rukuju jer to može kritično utjecati na izbor najspecifičnije metode za dokazivanje izloženosti. Uvijek valja imati na umu da loša procjena opasnosti vodi k izboru neprikladne metode za otkrivanje biološkog učinka, a nemogućnost dokazivanja biološkog učinka, iako postoji realna izloženost, vodi u neopravdan financijski trošak. Podaci dobiveni biološkim nadzorom rabe se u zdravstvenom nadzoru izloženih radnika, pa potrebu za provođenjem specifičnih analiza i njihovu učestalost određuje specijalist medicine rada.

U biološkom nadzoru radnih populacija izloženih antineoplastičnim lijekovima, koji se provodi od početka 1980-ih, najviše se primjenjuju tri standardne citogenetičke metode: analiza izmjena sestrinskih kromatida (engl. *Sister Chromatid Exchanges, SCE*) (44-79), analiza kromosomskih aberacija (engl.



Slika 4 Položaj biološkog nadzora u slijedu od izloženosti rizičnim čimbenicima u radnom okolišu do pojave zdravstvenih učinaka koji se dovode u vezu s profesionalnom izloženosti



*Chromosome Aberrations, CA* (45, 47, 50-56, 61, 64, 66, 69, 71, 75, 76, 79, 80-95) i mikronukleus-test (engl. *Micronucleus, MN*) (79, 86, 91, 92, 96-109) te molekularno-biološka metoda komet-test (79, 101,

103-105, 107-116), koji sve više dobiva na značenju zadnjih 10-ak godina. Pregled provedenih istraživanja, vrste primijenjenih bioloških pokazatelja te dobiveni rezultati sustavno su prikazani na tablici 3.

**Tablica 3** Pregled istraživanja provedenih primjenom različitih citogenetičkih i molekularno-bioloških metoda u svrhu nadzora nad populacijama profesionalno izloženim antineoplastičnim lijekovima

Metoda	Rezultat	Izložena skupina	Država	Literaturni navod
Komet-test	+	med. sestre (N=19)	Turska	Izdes i sur. 2009. (116)
SCE	+	med. osoblje (N=402)	Hrvatska	Kopjar i sur. 2009. (78)
SCE, CA, MN-test, Komet-test	+, +, +, +	med. osoblje (N=50)	Hrvatska	Kopjar i sur. 2009. (79)
CA	+	med. osoblje (N=72)	Slovačka	Mušák i sur. 2009. (95)
MN-test, Komet-test	+, +	med. sestre i ljekarnici (N=20)	Brazil	Rombaldi i sur. 2009. (109)
MN-test, Komet-test	+, +	med. sestre (N=83)	Italija	Cornetta i sur. 2008. (108)
Komet-test	+	med. sestre (N=121)	Japan	Sasaki i sur. 2008. (115)
MN-test, MN <sub>BE</sub> -test	+, +	med. sestre (N=23)	Italija	Cavallo i sur. 2007. (106)
SCE	-	ljekarnici (N=12)	Japan	Ikedo i sur. 2007. (77)
Komet-test, MN-test, MN <sub>BE</sub> -test	+, +, +	med. sestre (N=60)	Indija	Rekhadevi i sur. 2007. (107)
CA	+	med. osoblje (N=76)	Italija	Testa i sur. 2007. (94)
MN-test, Komet-test	+, +	radnici u proizvodnji (N=15)	Kina	Deng i sur. 2006. (104)
MN-test, Komet-test	-, +	med. sestre (N=30)	Portugal	Laffon i sur. 2006. (105)
SCE, CA	+, +	med. sestre (N=339)	Mađarska	Tompa i sur. 2006. (76)
Komet-test	+	med. sestre (N=19)	Japan	Yoshida i sur. 2006. (114)
Komet-test <sub>L, BE</sub>	-/+	med. sestre (N=30)	Italija	Ursini i sur. 2006. (113)
CA, MN-test, MN <sub>BE</sub> -test	+, -, +	med. sestre (N=25) i ljek. tehničari (N=5)	Italija	Cavallo i sur. 2005. (93)
MN-test, Komet-test	+, +	radnici u proizvodnji (N=21)	Kina	Deng i sur. 2005. (103)
CA, MN <sub>BE</sub> -test	-, +	med. osoblje (N=11)	Kuba	Domínguez Odio i sur. 2004. (92)
CA, MN-test	+, +	med. sestre (N=16)	Kina	Xu i sur. 2003. (91)
CA	+	med. sestre (N=20)	Turska	Burgaz i sur. 2002. (90)
Komet-test	+	med. sestre (N=16)	Kina	Yang i sur. 2002. (112)
CA, MN-test	+, +	med. sestre (N=24)	Iran	Ansari-Lari i sur. 2001. (89)
MN-test	-	ljekarnici i med. osoblje (N=100)	Njemačka	Hessel i sur. 2001. (102)
SCE, CA	+, +	med. sestre (N=95)	Mađarska	Jakab i sur. 2001. (75)
Komet-test	+	med. osoblje (N=50)	Hrvatska	Kopjar i Garaj-Vrhovac 2001. (111)
MN-test	+	ljekarnici i med. sestre (N=10)	Brazil	Maluf i Erdtmann 2000. (100)
MN-test Komet-test	+, +	ljekarnici i med. sestre (N=10)	Brazil	Maluf i Erdtmann 2000. (101)
SCE, MN-test	-, -	ljekarnici (N=32)	Austrija	Pilger i sur. 2000. (74)
MN-test, MN <sub>BE</sub> -test	+, +	med. sestre (N=26)	Turska	Burgaz i sur. 1999. (99)
SCE, MN-test	-, +	med. sestre (N=20)	Hrvatska	Kašuba i sur. 1999. (72)
SCE	-	med. sestre (N=23)	Italija	Lanza i sur. 1999. (73)
Komet-test	+	med. sestre (N=30)	Turska	Ündeger i sur. 1999. (110)
SCE, CA, MN-test	+, +, +	med. sestre (N=38)	Hrvatska	Fučić i sur. 1998. (69)
MN-test	+	med. sestre (N=10)	Hrvatska	Garaj-Vrhovac i Kopjar 1998. (98)
SCE, CA	+, +	med. osoblje (N=30)	Egipat	Mahrous i sur. 1998. (71)
SCE, MN-test	+, +	med. sestre (N=10)	Njemačka	Kevekordes i sur. 1998. (70)
CA	+	med. sestre i liječnici (N=20)	Češka	Rubeš i sur. 1998. (88)
SCE, MN-test	-, -	ljekarnici (N=13)	Njemačka	Ensslin i sur. 1997. (68)
SCE	+	med. sestre (N=17)	Hrvatska	Brumen i Horvat 1996. (67)
SCE, MN-test	-, -	ljekarnici (N=45)	Njemačka	Peschke i sur. 1995. (65)
SCE, CA	-, -	radnici u proizvodnji	Švedska	Thulin i sur. 1995. (66)
CA, MN-test	+, +	med. sestre (N=20)	Egipat	Anwar i sur. 1994. (86)
MN <sub>BE</sub> -test	+	med. sestre (N=25)	Brazil	Machado-Santelli i sur. 1994. (97)

Metoda	Rezultat	Izložena skupina	Država	Literaturni navod
SCE, CA, MN-test	+, -, -	ljekarnici (N=6)	Finska	Roth i sur. 1994. (64)
CA	+	med. sestre i ljek. tehničari (N=28)	Češka i Nizozemska	Sessink i sur. 1994. (87)
SCE	+	med. osoblje	Poljska	Gorecka i Gorski 1993. (63)
CA	+	med. osoblje (N=106)	Njemačka	Grummt i sur. 1993. (85)
SCE, CA	+, +	med. sestre (N=15)	Brazil	Goloni-Bertollo i sur. 1992. (61)
SCE	+	ljekarnici (N=34)	SAD	McDiarmid i sur. 1992. (62)
CA	+	med. sestre (N=42)	Hrvatska	Milković-Kraus i sur. 1992. (84)
CA	-	ljekarnici (N=50) i med. sestre (N=11)	Ujedinjeno Kraljevstvo	Cooke i sur. 1991. (83)
SCE	-	ljekarnici (N=15)	Nizozemska	Guinee i sur. 1991. (57)
SCE, CA	+, +	med. sestre (N=42)	Hrvatska	Milković-Kraus i Horvat 1991. (58)
SCE, MN-test	+, -	med. sestre (N=60)	Švedska	Thiringer i sur. 1991. (59)
SCE	+	med. sestre (N=23)	Turska	Şardaş i sur. 1991. (60)
SCE, CA	-, -	med. sestre	Kanada	Krepinsky i sur. 1990. (54)
CA	+	med. osoblje	Češka	Medkova 1990. (82)
SCE, CA	-, +	med. sestre (N=16) i ljekarnici (N=8)	Njemačka	Oestreicher i sur. 1990. (55)
SCE, CA	-, -	med. sestre (N=12)	Italija	Sarto i sur. 1990. (56)
SCE, CA	-, -	med. sestre (N=29)	Francuska	Benhamou i sur. 1988. (52)
CA	+	osoblje kemijskog laboratorija (N=38)	Češka	Rössner i sur. 1988. (81)
SCE, CA, MN-test	-, -, +	industr. radnici, med. sestre, ljekarnici	Finska	Sorsa i sur. 1988. (53)
MN-test	+	industr. radnici, med. sestre, ljekarnici	Finska	Yager i sur. 1988. (96)
SCE	-	med. sestre (N=18)	SAD	Jordan i sur. 1986. (49)
SCE, CA	+, +	osoblje kemijskog laboratorija (N=38)	Češka	Pohlová i sur. 1986. (50)
SCE, CA	-, -	med. sestre (N=16)	Francuska	Stücker i sur. 1986. (51)
SCE	-	med. sestre (N=21)	Italija	Barale i sur. 1985. (48)
CA	+	med. sestre (N=11)	Finska	Nikula i sur. 1984. (80)
SCE	-	med. sestre (N=10)	Švedska	Kolmodin-Hedman i sur. 1983. (46)
SCE, CA	-, -	med. sestre (N=5) i liječnici (N=4)	Njemačka	Stiller i sur. 1983. (47)
SCE, CA	+, +	med. sestre (N=10)	Norveška	Waksvik i sur. 1981. (45)
SCE	+	med. sestre (N=20)	Finska	Norppa i sur. 1980. (44)

SCE - analiza izmjena sestrinskih kromatida; CA - analiza kromosomskih aberacija; MN-test - mikronukleus-test; BE - stanice epitela bukalne sluznice; L - limfociti

## PREGLED BIOLOŠKIH METODA KOJE SE MOGU PRIMIJENITI ZA OTKRIVANJE TOKSIČNIH UČINAKA ANTINEOPLASTIKA NA RAZINI STANICE

Kratke prikaze osnovnih značajki metoda iznosimo kronološkim slijedom kojim su se one rabile u svrhu biološkog nadzora izloženih populacija.

### Izmjene sestrinskih kromatida (SCE)

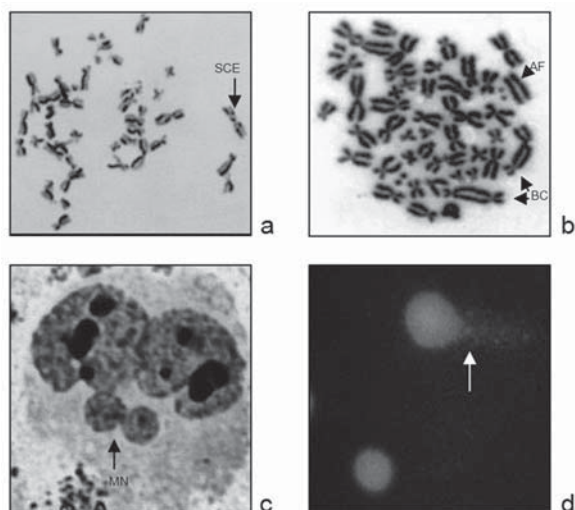
SCE su citološka očitovanja loma i ponovnog spajanja DNA na prividno homolognim mjestima dviju kromatida istog kromosoma. Indirektni su pokazatelj razine oštećenja prisutnih u DNA prije njezina udvostručavanja. Točan mehanizam njihova nastanka nije potpuno razjašnjen (117, 118). Kako sam događaj uključuje lomove u četiri lanca DNA (tj. dvije dvostruke uzvojnice), prebacivanje odsječaka tih lanaca između kromatida istog kromosoma i njihovo

ponovno spajanje na novim položajima, iznimno je važno da se ti procesi zbivaju vjerno, tj. bez stvaranja bilo kakvih modifikacija u genetskom kodu.

Nastanak SCE ovisi o sposobnosti stanice da uspješno popravi ili ukloni oštećenja u DNA prije ulaska u S-fazu ciklusa. Učestalost SCE u stanicama značajno raste nakon izlaganja genotoksičnim spojevima koji stvaraju kovalentne veze s DNA, odnosno na bilo koji način interferiraju s njezinim metabolizmom ili popravkom (118, 119). Pojavu SCE nerijetko prate i zastoji u staničnim ciklusima (120). Najviše vrijednosti SCE izazivaju alkilirajući spojevi, dok se učestalost SCE značajno ne mijenja pod utjecajem genotoksičnih agensa koji izazivaju samo lomove u molekuli DNA (121).

Analiza SCE opće je prihvaćena u genetičkoj toksikologiji i biološkom nadzoru, a zasniva se na 72-satnom uzgoju stanica u uvjetima *in vitro* u prisutnosti 5-bromodeoksiuridina (analoga timina) koji se ugrađuje u nosivostetizirani lanac DNA.

Zbog različitog afiniteta za vezanje citološke boje, "nova" kromatida oboji se svjetlije od "stare", pa se pod svjetlosnim mikroskopom (slika 5a) jasno mogu razlikovati mjesta na kojima je došlo do izmjene njihovih odsječaka (117). Broj izmjena utvrđuje se na metafaznim kromosomima druge stanične diobe. Obično se pregledava 50 metafaza i izračunava srednja vrijednost te raspon SCE (118, 121).



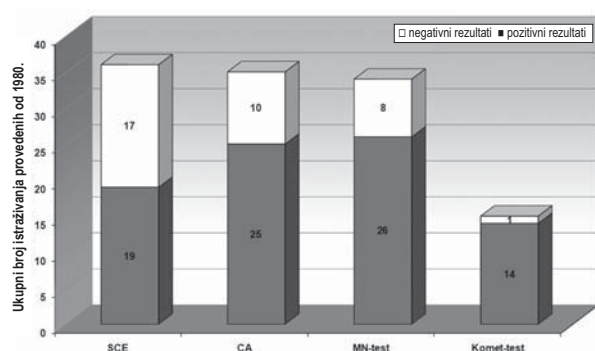
**Slika 5** Fotomikrografije ljudskih limfocita u kojima su strelicama označene: (a) izmjene sestrinskih kromatida (SCE); (b) strukturne aberacije kromosoma; (c) mikronukleusi (MN); (d) obris jezgre s oštećenom DNA (tzv. "komet"); donja jezgra nema oštećenja DNA. SCE - izmjene sestrinskih kromatida (od engl. *Sister Chromatid Exchanges*)  
AF - acentrični fragment  
BC - bicentrični kromosom  
MN - mikronukleus

Primjenom analize SCE može se procijeniti razina citogenetičkih oštećenja u limfocitima periferne krvi koja nastaju zbog višegodišnje kronične izloženosti, kada nastanak i popravak oštećenja u DNA dolaze u svojevrsno stanje ravnoteže. U slučaju akutne izloženosti ili nakon prestanka kronične izloženosti, optimalno vrijeme za uzorkovanje krvi za analizu SCE bilo bi unutar nekoliko sati, ali najviše dva dana nakon prestanka izloženosti. Naime, učestalost SCE snižava se s produljenjem razdoblja proteklog između izloženosti i uzorkovanja krvi, a razlogi tomu su popravak DNA, smrt vrlo oštećenih stanica apoptozom i/ili nekrozom te njihovo nadomještanje novim stanicama (121). Iznimka su neke populacije dugoživućih T-limfocita koje mogu preživjeti i do desetak godina, tzv. HFC (engl. *High Frequency Cells*). U tim stanicama učestalost SCE premašuje

95 % od ukupne raspodjele pojedinačnih vrijednosti SCE utvrđenih u svih članova kontrolne populacije (122). Te su stanice vrlo osjetljiv pokazatelj kronične izloženosti genotoksičnim agensima te se preporučuje tijekom klasične analize SCE utvrditi i njihovu učestalost (123). Neki autori smatraju da su HFC dugoživući limfociti koji nose postojano oštećenje ili osjetljiva subpopulacija stanica s defektnim popravkom (124). Drugi pak navode da HFC mogu biti subpopulacija dugoživućih limfocita u kojima se u uvjetima *in vivo*, tijekom G<sub>0</sub>-faze, nakuplja više oštećenja, pa prema tome imaju predispoziciju za veći broj SCE. Smatra se da visoke vrijednosti SCE utvrđene u ovim stanicama mogu odražavati kumulativno oštećenje genoma uzrokovano kroničnim izlaganjem mutagenima (125).

Općenito, na učestalost SCE u ljudskim limfocitima utječu različiti čimbenici, od kojih su najvažniji životna dob, spol i navika pušenja. U nekim je istraživanjima dokazan porast učestalosti SCE s dobi (126, 127). Žene općenito imaju nešto više vrijednosti SCE od muškaraca (125, 127, 128, 129). Primijećeno je da učestalost SCE raste i tijekom trudnoće, što se pripisuje učinku hormona (130). U mnogim istraživanjima utvrđena je pozitivna korelacija između povišenog SCE i pušenja, a u pušača su utvrđena i postojana oštećenja DNA koja omogućuju kasniju pojavu SCE (131-135). Uzimanje nekih antibiotika također može utjecati na pojavu SCE (136). Ionizirajuće zračenje općenito značajno ne povisuje učestalost SCE (137), dok su ranija istraživanja dokazala pozitivan učinak ultrazvuka (138, 139). Međutim, pri tumačenju rezultata analize u obzir valja uzeti i moguće sinergističke učinke različitih medicinskih izloženosti koji mogu rezultirati visokim vrijednostima SCE (78). Vrijednosti SCE mogu porasti u nekim bolestima (140-142) ili kao posljedica liječenja, osobito primjenom kemoterapije (143, 144).

Analiza SCE bila je prva citogenetička metoda primijenjena u biološkom nadzoru radnika izloženih antineoplastičnim lijekovima (44). U Hrvatskoj (58, 67, 69, 72, 78, 79) to je donedavno bila i jedina metoda koja se izvodila kao dodatna pretraga u okviru zdravstvenih pregleda medicinskog osoblja izloženog antineoplastičnim. Iz grafičkog prikaza (slika 6) vidljivo je da je broj istraživanja, koja su primjenom SCE utvrdila pozitivne i negativne rezultate, sličan. U mnogim istraživanjima negativan nalaz SCE dovodi se u vezu s dobrom praksom i pridržavanjem mjera zaštite na radu (46, 65, 68, 73, 74).



**Slika 6** Zastupljenost citogenetičkih metoda u biološkom nadzoru profesionalne izloženosti antineoplastičnim lijekovima u razdoblju 1980.-2009. uz prikaz odnosa između broja istraživanja koja su prikazala pozitivne ili negativne rezultate

Uzmu li se u obzir sve značajke analize SCE i poznati mehanizmi djelovanja antineoplastika ova je metoda prikladna za otkrivanje oštećenja u ispitanika koji rukuju svim vrstama alkilirajućih lijekova, te nekim lijekovima iz drugih skupina čije se djelovanje zasniva i na alkiliranju DNA, primjerice citotoksičnim antibioticima mitomicinom C i doksorubicinom, svim lijekovima koji sadržavaju platinu, prokarbazinom, dakarbazinom te estramustinom.

Međutim, pri odabiru SCE kao metode za procjenu izloženosti antineoplastičnim lijekovima treba biti oprezan te uzeti u obzir i nedostatke analize, odnosno manjak specifičnosti u odnosu na druge raspoložive citogenetičke metode (tablica 4). Kako suvremeni

protokoli kemoterapije primjenjuju sve veći broj novih lijekova čiji su mehanizmi djelovanja vrlo specifični i mnogi ne uključuju sposobnost izazivanja SCE (primjerice taksani) primjenom samo te metode ne može se vjerodostojno procijeniti izloženost svim vrstama antineoplastičnih lijekova s kojima medicinsko osoblje može doći u kontakt pri radu. Nadalje, jedan od najvećih nedostataka analize SCE jest neodgovarajuća prediktivnost metode u vezi s rizikom od pojave raka (145).

## OŠTEĆENJA (ABERACIJE) KROMOSOMA

Općenito razlikujemo numeričke i strukturne aberacije kromosoma. Numeričke upućuju na promjene broja kromosoma koje su posljedica poremećaja u diobi stanice. Aneuploidija označava višak (hiperploidija) ili manjak (hipoploidija) pojedinih kromosoma, a nastaje zbog oštećenja diobenog vretena i njegovih elemenata, oštećenja podstrukture kromosoma, promjena u fiziologiji stanice te mehaničkih oštećenja (121). Agense koji mogu izazvati aneuploidiju nazivamo aneugenima ili aneuploidogenima. Poliploidiju obilježava prisutnost više setova normalnog kromosomskog komplementa, a mehanizmi njezina nastanka manje su razjašnjeni.

Strukturna oštećenja kromosoma nastaju kao posljedica: (I) lomova u molekuli DNA, (II) udvostručavanja DNA na osnovi informacije sadržane

**Tablica 4** Usporedba osnovnih značajki i osjetljivosti testova koji se primjenjuju za otkrivanje genotoksičnih učinaka.

Metoda	SCE	CA	MN-test	Komet-test
Utvrđivanje oštećenja na razini	kromosoma	kromosoma	DNA / kromosoma i/ili diobenog vretena	DNA
Uzgoj stanica u uvjetima <i>in vitro</i>	+	+	+	-
Trajanje testa	do 20-ak dana	do 3 dana	do 4 dana	5 h do 2 dana
Mogućnost otkrivanja apoptoze/ nekroze	-	-	+	+
Mogućnost otkrivanja aneuploidije	-	-	+ (uz FISH)	-
Mitotski indeks	+	+	+	-
Mogućnost automatizirane analize	-	+/-	+	+
Upućuje li na povišeni rizik od pojave raka?	-	+	+	?

SCE - analiza izmjena sestrinskih kromatida; CA - analiza kromosomskih aberacija; MN-test - mikronukleus-test



u oštećenom kalupu ili osnovici, (III) inhibicije sinteze DNA i (IV) drugim mehanizmima, primjerice djelovanjem inhibitora DNA-topoizomerase II (121).

U citogenetičkom nadzoru populacija izloženih genotoksičnim agensima vrlo je važno utvrđivanje učestalosti strukturnih aberacija u limfocitima periferne krvi. Stanice se 48 sati uzgajaju u uvjetima *in vitro*, nakon čega se pristupa izradi mikroskopskih preparata koji se pregledavaju pod svjetlosnim mikroskopom (slika 5b). Obično se analizira 100 do 200 metafaza prve diobe *in vitro* te utvrđuje ukupan broj i vrste oštećenja na kromosomima (146-148).

Razlikujemo kromatidne aberacije koje zahvaćaju samo jednu sestrinsku kromatidu jednoga ili više kromosoma i kromosomske aberacije koje uključuju obje sestrinske kromatide jednoga ili više kromosoma (119). Kromatidne aberacije (lomovi i izmjene dijelova između kromatida različitih i/ili istih kromosoma) nastaju kao posljedica oštećenja DNA u  $G_2$ -fazi staničnog ciklusa, dakle nakon sinteze i udvostručenja DNA (147). Kromosomske aberacije (kromosomski lomovi, acentrični fragmenti, bicentrični i policentrični te prstenasti kromosom) nastaju kao posljedica oštećenja DNA izazvanog u  $G_1$ -fazi staničnog ciklusa, tj. prije udvostručenja (119, 147, 148). Strukturne aberacije kromosoma mogu se također podijeliti na nestabilne i stabilne. Učestalost nestabilnih aberacija u limfocitima postupno se smanjuje nakon prestanka izlaganja mutagenu, dok se stabilne aberacije mogu otkriti i nakon mnogo godina (119). Nestabilne aberacije su bicentrični i prstenasti kromosomi, acentrični fragmenti te drugi asimetrični rearanžmani kromosoma. One mogu sterički ometati diobu stanice ili dovesti do gubitka genetskog materijala u stanicama kćerima, čime se mijenja ekspresija pojedinih gena, a u konačnici nastupa i smrt stanice (147). Stabilne aberacije su uravnotežene translokacije, inverzije i drugi simetrični rearanžmani koji se diobom mogu prenijeti u stanice kćeri. Mogu se detektirati samo posebnim tehnikama bojenja kromosoma (metode pruganja, FISH) (121, 146).

Agense koji uzrokuju oštećenja strukture kromosoma nazivamo klastogenima. Njihovo djelovanje može biti neovisno o S-fazi staničnog ciklusa (tj. sintezi DNA), pa u tom slučaju izazivaju lomove u molekuli DNA koji će se detektirati tek u prvoj metafazi nakon izloženosti kao (a) kromosomske aberacije ako je stanica u trenutku izloženosti bila u  $G_0$ -fazi, odnosno (b) kromatidne aberacije ako je stanica bila u S/ $G_2$ -fazi ciklusa. Primjer su ionizirajuće

zračenje i bleomicin. Međutim, djelovanje većine klastogenih kemikalija ovisno je o S-fazi i u tom slučaju oštećena stanica mora ući u S-fazu da bi prisutna, a nepopravljena, oštećenja postala vidljiva u metafazi prve diobe *in vitro* (121).

Pojavnost strukturnih CA u kromosomima limfocita ovisi o razini, trajanju i učestalosti izloženosti te mehanizmima klastogeneze uključenim u nastanak oštećenja (146). S obzirom na to da pri rukovanju antineoplastičnim lijekovima izloženo osoblje dolazi u kontakt s različitim agensima, moguće je da u krvi takvih ispitanika katkad budu prisutne relativno visoke koncentracije spojeva koji oštećuju DNA na druge načine, primjerice inhibiraju sintezu DNA ili njezinu funkciju narušavaju nekim drugim mehanizmima. Stoga se nakon vađenja krvi i provođenja citogenetičke analize u njih može utvrditi povišena učestalost aberacija.

Kako bi se procijenili učinci kronične izloženosti klastogenima, uzorkovanje krvi najbolje je provesti nakon što se uspostavila ravnoteža između indukcije oštećenja u DNA i njihova popravka. U slučaju akutne izloženosti ili prestanka kronične izloženosti nekom agensu čije djelovanje ovisi o S-fazi optimalno vrijeme za uzorkovanje krvi je unutar nekoliko sati, ali najviše unutar dva dana (121). Razlozi su slični kao oni ranije opisani za analizu SCE.

Na "osnovnu razinu" CA u ljudskim limfocitima utječu različiti čimbenici: životna dob, virusne infekcije, neke nasljedne bolesti, navika pušenja i konzumiranje alkohola, uzimanje lijekova, izloženost dijagnostičkim postupcima koji uključuju ionizirajuće zračenje i dr. (119, 147, 148, 149). Izloženost bilo kakvom obliku ionizirajućih zračenja općenito se dovodi u vezu s porastom učestalosti CA, zbog čega se ova metoda gotovo ekskluzivno rabi u svrhu procjene takve izloženosti, bilo ambijentalne, profesionalne ili terapijske (121, 146, 148). Također, dokazana je prediktivnost metode i uzročno-posljedična veza između povišene razine kromosomskih aberacija i povišenog rizika od pojave raka (145, 150).

Analiza CA prvi je put primijenjena u biološkom nadzoru radnika izloženih antineoplastičnim lijekovima početkom 1980-ih (45). Do danas su objavljeni rezultati brojnih istraživanja (tablica 3), uključujući i nekoliko provedenih u Hrvatskoj (58, 69, 79, 84). Iz odnosa broja istraživanja koja su prikazala pozitivne ili negativne rezultate dobivene primjenom CA (slika 6) vidljivo je da je važnost ove metode u otkrivanju genotoksičnih učinaka antineoplastika nešto manja negoli je važnost analize SCE.

Uzmu li se u obzir sve značajke analize CA i poznati mehanizmi djelovanja lijekova, ova se metoda može primijeniti za otkrivanje oštećenja u ispitanika koji rukuju antineoplastičima čije se djelovanje primarno zasniva na stvaranju velikog broja lomova u DNA, primjerice citotoksičnim antibioticima bleomicinom, doksorubicinom, daunorubicinom i njihovim analogima, te lijekovima koji neizravno povećavaju razine lomova u DNA djelovanjem na DNA-topoizomerase I i II: irinotekan, topotekan, etopozid i tenipozid.

Pri izboru analize CA kao metode za procjenu rizika od izloženosti antineoplastičnim lijekovima i tumačenju dobivenih rezultata u obzir svakako valja uzeti njezine nedostatke (tablica 4), od kojih je najveći nemogućnost utvrđivanja oštećenja na razini diobenog vretena, zbog čega štetni učinci nekih antineoplastika novije generacije mogu biti podcijenjeni.

#### *MN-test*

Mikronukleusi su samostalne kromatinske strukture koje su potpuno odvojene od jezgre (slika 5c). Nastaju kondenzacijom acentričnih kromosomskih fragmenata ili čitavih kromosoma zaostalih u anafazi koji se nisu ugradili u jezgre stanica kćeri. Promjer mikronukleusa obično je između 1/16 i 1/3 promjera glavnih jezgara. Prisutnost mikronukleusa smatra se kvantitativnim pokazateljem postojanja strukturnih i/ili numeričkih aberacija kromosoma koje su u ciljnim stanicama nastale pod utjecajem različitih genotoksičnih agensa u uvjetima *in vitro* i/ili *in vivo* (151).

Mikronukleusi koji sadržavaju fragmente kromosoma nastaju: (I) direktnim oštećenjem, primjerice zbog loma molekule DNA; (II) udvostručavanjem DNA na osnovi informacije sadržane u oštećenom kalupu, (III) inhibicijom sinteze DNA. Mikronukleusi koji sadržavaju čitave kromosome nastaju ponajprije zbog oštećenja diobenog vretena, oštećenja kinetohora ili drugih dijelova mitotskog aparata, oštećenja kromosomskih podstruktura, promjena u fiziologiji stanice ili mehaničkih oštećenja (121).

Učestalost mikronukleusa može se utvrđivati u različitim vrstama stanica, bilo izravno, bilo nakon uzgoja u staničnoj kulturi. U novije vrijeme u biološkom nadzoru sve veću važnost ima i primjena raznih vrsta "ne-krvnih" stanica koje su lako dostupne uzorkovanju (stanice bukalne i nosne sluznice, stanice iz folikula dlake, stanice bronhoalveolarnog epitela, epitela kolona, cerviksa, mokraćnih putova i muške spolne stanice) (152). Pri izboru ciljnih stanica ili tkiva

koja će se rabiti u analizi važno je poznavati mehanizme djelovanja agensa kojima je ispitanik izložen. Uvijek je najbolje provesti analizu na tkivu koje je najbliže mjestu kontakta s genotoksičnim agensom. Primjerice, za kancerogene koji ulaze gornjim dišnim putovima to može biti epitel nosne sluznice (121). Značenje takve izravne i minimalno invazivne metode za utvrđivanje učestalosti mikronukleusa u novije vrijeme sve više raste, a poduzimaju se i koraci prema standardizaciji te metode za nadzor profesionalne izloženosti genotoksičnim agensima (153).

U biološkom nadzoru ljudskih populacija ipak se najviše primjenjuje metoda utvrđivanja broja mikronukleusa u limfocitima periferne krvi, koji su zapravo "surogatne" ciljne stanice, jer se pretpostavlja da zbog svojega cirkuliranja kroz sve organe i tkiva mogu odražavati izloženost koja se dogodila bilo gdje u tijelu (153). MN-test na limfocitima periferne krvi (tzv. CBMN-test, engl. *Cytokinesis-Block Micronucleus Assay*) uključen je u standardnu bateriju testova genotoksičnosti. Brži je i jednostavniji od analize strukturnih aberacija kromosoma, a podjednako osjetljiv u otkrivanju oštećenja diobenog vretena i aberacija kromosoma (154, 155). Općeprihvaćeni protokol MN-testa koji su razvili Fenech i Morley (156) uključuje 72-satni uzgoj limfocita periferne krvi u uvjetima *in vitro*, pri čemu se radi inhibicije citokineze u 44. satu u stanične kulture dodaje citohalazin B. On sprječava diobu citoplazme pa se mikronukleusi mogu jednostavno brojiti unutar binuklearnih stanica. Mikronukleusi se mogu detektirati primjenom različitih boja koje se specifično vežu na DNA (157). Njihov broj može se utvrditi mikroskopskom analizom i s pomoću protočnog citometra (158).

U standardnom MN-testu blokiranom citohalazinom B na limfocitima periferne krvi obično se utvrđuje ukupni broj mikronukleusa na 1000 do 2000 stanica po ispitaniku (121). Usporedo se utvrđuje ukupni broj stanica s mikronukleusima i njihova raspodjela u stanicama. U MN-testu na epitelnim stanicama uobičajeno se pregledava 1000 do 3000 epitelnih stanica po ispitaniku, dok se primjenom sustava za automatizirano brojenje preporučuje analizirati čak i do 10000 epitelnih stanica (153).

MN-test ima prednost pred drugim metodama jer se osim razine ukupnog oštećenja kromosoma i/ili diobenog vretena može utvrditi i podrijetlo pojedinačnih mikronukleusa. U tu svrhu može se primijeniti C-pruganje (159), imunofluorescencijske tehnike s antikinetohornim protutijelima te FISH sa

sondama koje specifično detektiraju centromerna ili telomerna područja kromosoma. Općenito se smatra da mikronukleusi nastali od zaostalih kromosoma imaju kinetohore, dok oni koji ne sadržavaju kinetohor ili centromernu DNA obično sadržavaju acentrične fragmente (160).

Za ispravno provođenje biološkog nadzora primjenom MN-testa uzorkovanje krvi valja provesti unutar nekoliko sati do najviše dva dana nakon akutne ili prestanka kronične izloženosti (121). Razlozi su isti kao oni ranije opisani za analize SCE i CA. Uzmu li se uzorci i znatno kasnije (primjerice i nakon nekoliko mjeseci), MN-testom moguće je utvrditi dosta visoke razine oštećenja, osobito ako je ispitanik bio izložen agensima koji uzrokuju velik broj kromosomskih aberacija ili ako se nastala oštećenja sporo uklanjaju.

Mikronukleusi u epitelnim stanicama nastali su tijekom posljednje diobe koja je prethodila uzorkovanju. Kako točno vrijeme proteklo od posljednje diobe do migracije epitelne stanice na površinu obično nije poznato, teško je odrediti optimalno vrijeme za uzorkovanje takvih stanica u slučajevima akutne i kronične izloženosti. Općenito se smatra da je analiza mikronukleusa nastalih *in vivo* u epitelnim stanicama prikladnija za procjenu kronične izloženosti klastogenima/aneugenima (121).

Spontani nastanak mikronukleusa pokazatelj je oštećenja genoma akumuliranog tijekom životnog vijeka pojedinačne stanice. Pod utjecajem različitih čimbenika broj mikronukleusa može se značajno promijeniti. Stoga je pri tumačenju rezultata MN-testa važno poznavati mehanizme i uzroke spontanog nastanka mikronukleusa. Utvrđeno je da je broj mikronukleusa u pozitivnoj korelaciji sa životnom dobi ispitanika i da je u žena prosječno 1,4 puta veći nego u muškaraca (161, 162). Također je dokazano da se u mikronukleusima često nalaze X i Y-kromosomi, a u žena se sa starenjem sve više povećava udio X-kromosoma u mikronukleusima (163). Oko 50 % spontano nastalih mikronukleusa sadržava čitave kromosome, a ostali nastaju od acentričnih fragmenata (164). Mikronukleusi koji sadržavaju čitave kromosome češće se nalaze u starijih (>65 godina) nego kod mlađih (20 do 35 godina) ispitanika (127, 165). Na porast učestalosti mikronukleusa utječu i drugi čimbenici: kronične bolesti (166), uzimanje lijekova (167, 168), medicinska izloženost nekim dijagnostičkim postupcima (169, 170) te osobito pušenje duhana (171, 172).

MN-test je prvi put primijenjen u biološkom nadzoru radnika izloženih antineoplastičnim lijekovima 1988. (96). Rezultati istraživanja provedenih u različitim državama, uključujući i Hrvatsku (69, 72, 79, 98), prikazani su na tablici 3. U većini istraživanja primijenjen je MN-test na limfocitima periferne krvi, a u njih šest na epitelnim stanicama bukalne sluznice (92, 93, 97, 99, 106, 107). Iz odnosa broja istraživanja koja su primjenom MN-testa dobila pozitivne i/ili negativne rezultate (slika 6) vidljiv je bolji omjer nego u ostalih citogenetičkih metoda, koji upućuje na osjetljivost tehnike i njezinu dobru primjenjivost u nadzoru nad osobljem koje rukuje antineoplastičnim lijekovima. Pozitivni rezultati dobiveni su u 20 istraživanja gdje je primijenjen MN-test na limfocitima i svih šest na epitelnim stanicama bukalne sluznice (tablica 3).

Usporedimo li MN-test s ostalim metodama (tablica 4), vidljiv je niz prednosti ovoga testa koje ga čine jednom od trenutno najosjetljivijih metoda za biološki nadzor izloženih populacija. Posebna mu je prednost što omogućuje otkrivanje oštećenja na razini DNA/kromosoma i diobenog vretena, što ostale metode ne mogu (160). Stoga MN-test ima veliku važnost pri specifičnoj procjeni izloženosti antineoplastičnim lijekovima čiji mehanizmi djelovanja uključuju poremećaje u funkciji diobenog vretena (vinka-alkaloidi i taksani te njihovi analozi). Utvrđivanjem učestalosti nuklearnih pupova indirektno se može zaključiti o postojanju amplifikacije pojedinih gena, dok su nukleoplazmatski mostovi pokazatelj postojanja bicentričnih kromosoma koji se tijekom diobe nisu mogli raspodijeliti u stanice kćeri. Osim toga, ovaj test omogućuje i utvrđivanje broja stanica u apoptozi i nekrozi (151, 160). Nadalje, za MN-test dokazana je uzročno-posljedična veza s pojavom raka, a osobito urogenitalnih karcinoma i karcinoma probavnog sustava (173).

#### *Komet-test*

Komet-test ili mikroelektroforeza pojedinačnih stanica u agaroznom gelu djelotvorna je tehnika za brzo otkrivanje oštećenja i popravka u molekuli DNA. Analiza se može provesti na različitim vrstama stanica koje imaju jezgru, primjerice krvnim stanicama, epitelnim stanicama, spermijima i dr. (174). U ovome jednostavnom testu stanice se uklapaju u mikrogel agaroze. S pomoću otopine visoke koncentracije etilen-diamin-tetraoctene kiseline (EDTA) i detergenta liziraju se citoplazma i membranske strukture u stanici te se oslobađa ukupna DNA. Ona se zatim denaturira



u alkalnom ili neutralnom puferu i podvrgava elektroforezi tijekom koje mali odsječci (fragменти) DNA nastali jednolančanim ili dvolančanim lomovima putuju kroz pore gela prema anodi, dok glavina DNA zbog velike molekularne mase nema tu sposobnost (175). Kraći fragmenti brže putuju kroz gel pa zbog razlike u njihovoj duljini i brzini kretanja dolazi do razdvajanja prema veličini (176). DNA i obrasci putovanja njezinih fragmenata nakon bojenja fluorescencijskom bojom pod mikroskopom su vidljivi kao "kometi" (slika 5d). Za njihovu analizu i mjerenje najčešće se rabi epifluorescencijski mikroskop i računalni program za analizu slike. Mjeri se najmanje 50 kometa (a najčešće 100) na kojima se utvrđuju tri osnovna parametra: dužina repa kometa, intenzitet repa i repni moment. Dužina repa kometa jest najveća udaljenost na koju su otputovali najkraći odlomljeni fragmenti DNA; obično se mjeri od sredine glave kometa ili od ruba glave i izražava u mikrometrima. Intenzitet repa označava postotak DNA koja je migrirala u rep, a izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu. Repni moment se obično definira kao umnožak dužine repa i % DNA u repu, a izračunava ga računalni program s pomoću različitih formula (121, 174, 175).

Osnovna i najviše primjenjivana je izvedba kometnog testa u alkalnim uvjetima (177) koja omogućuje specifično otkrivanje jednolančanih lomova i mjesta osjetljivih na lužine (apurinska i apirimidinska mjesta nastala kao posljedica oštećenja molekule DNA), praćenje popravka stanične DNA te otkrivanje stanica u apoptozi i nekrotičnih stanica (174, 175, 178). Različite modifikacije alkalne tehnike omogućuju otkrivanje ukriženog povezivanja između staničnih makromolekula: DNA-DNA te DNA-proteini (178). U uvjetima alkalne elektroforeze pri vrijednostima  $\text{pH} \cong 12$  migraciji DNA najviše pridonose fragmenti nastali jednolančanim i dvolančanim lomovima. Elektroforeza u vrlo lužnatim uvjetima ( $\text{pH}=13$ ) specifična je za otkrivanje jednolančanih lomova te mjesta osjetljivih na djelovanje lužina, dok dvolančani lomovi čine manje od 5 % ukupne razine oštećenja koja se otkrivaju s pomoću ove izvedbe komet-testa (178). Komet-test općenito ima visoku osjetljivost za otkrivanje lomova u molekuli DNA - moguće je otkriti 0,2 do 2 loma na  $10^9$  daltona (179). U uvjetima neutralne elektroforeze (180, 181) većina fragmenata koja migrira potječe od dvolančanih lomova u DNA. Dvolančani lomovi pojavljuju se s 25 do 40 puta manjom učestalošću od jednolančanih lomova (178, 181).

Primarna oštećenja izmjerena primjenom komet-testa nastaju izravnim utjecajem genotoksičnog agensa ili su posljedica nepotpunog popravka DNA isijecanjem baza. Međutim, visokoj razini primarnih oštećenja DNA značajno pridonosi i oksidativni stres prouzročen u stanici djelovanjem reaktivnih kisikovih radikala koji nastaju i spontano i pod utjecajem genotoksičnih agensa. Spontano u stanici na dan može nastati oko 20000 oksidativnih oštećenja (najviše 8-oksogvanina). Spontani gubitak purina i rjeđe pirimidina dovodi do nastanka ~10000 apurinskih/apirimidinskih (AP) mjesta po stanici na dan (182). Kako standardni alkalni komet-test detektira ukupna oštećenja, njime se ne može razlučiti točna priroda oštećenja u DNA i teško je procijeniti radi li se o izravnom oštećenju nastalom zbog djelovanja toksičnog spoja ili o neizravnom učinku, primjerice oksidativnim oštećenjima, nastanku AP mjesta ili o popravku DNA.

Specifična oštećenja u molekuli DNA, primjerice DNA-adukti, dimeri timina i oksidativna oštećenja mogu se otkriti s pomoću modifikacija komet-testa. U tu svrhu rabe se posebna protutijela i enzimi koji sudjeluju u popravku DNA, primjerice bakterijske endonukleaze koje prepoznaju i uklanjaju oksidirane baze i pri tome u molekuli DNA stvaraju dodatne lomove. Najčešće se rabe endonukleaza III i formamidopirimidin DNA-glikozilaza (FPG) koje otkrivaju oksidirane pirimidine, odnosno promijenjene purine. FPG je specifična za otkrivanje oksidiranih purina: 8-okso-7,8-dihidrogvanin, 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin i 4,6-diamino-5-formamidopirimidin te drugih purina koji imaju otvorene prstenove. ENDOIII prepoznaje oksidirane pirimidine kao što su timin glikol i uracil glikol (183, 184). Nedostatak FPG-modificiranog komet-testa je što osim oksidiranih purina otkriva i AP-mjesta, različite purine s otvorenim prstenovima te adukte u molekuli DNA. Znatno specifičnija modifikacija je komet-test koji uključuje primjenu enzima 8-hidroksigvanin DNA-glikozilaze 1 (hOGG1), a to je glavni enzim koji popravlja 8-oksogvanin. Enzim hOGG1 može popraviti oksidirane baze samo kad su sparene s citozinom pa je puno specifičniji od FPG-enzima koji prepoznaje 8-oksogvanin kad je sparen s citozinom, gvaninom ili timidinom. hOGG1 je strukturno srodan s ENDOIII, a funkcionalno srodan s FPG; dakle posjeduje AP-litičku aktivnost, iako slabiju od FPG, zajedno s aktivnosti glikozilaze (184). Usporedbe i prednosti navedenih modifikacija opisane su na tablici 5.



**Tablica 5** Usporedba osnovnih značajki i osjetljivosti modifikacija komet-testa koje se primjenjuju za mjerenje razine primarnih oštećenja u molekuli DNA

Komet-test	Što se otkriva?	Prednost	Nedostatak
alkalni uvjeti	ukupna razina primarnih oštećenja genomske DNA	omogućuje brzu procjenu opće izloženosti	najmanja selektivnost (mjeri sve)
neutralni uvjeti	dvolančani lomovi u DNA	osjetljiva procjena razine izloženosti ionizirajućem zračenju	dvolančani lomovi pojavljuju se rjeđe od ostalih vrsta primarnih oštećenja DNA (manja specifičnost testa)
FPG + ENDO III	oksidirani pirimidini, promijenjeni purini; oštećenja u DNA izazvana alkilirajućim agensima	osjetljiviji i specifičniji od alkalne i neutralne modifikacije	otkriva i tzv. AP* mjesta u DNA, purine s otvorenim prstenovima i DNA-adukte
hOGG1	oksidirani gvanin (8-oksoG); oštećenja u DNA izazvana alkilirajućim agensima	osjetljiviji od ostalih modifikacija; najspecifičniji za otkrivanje oksidativnih oštećenja u DNA	dulje vrijeme potrebno za provođenje analize; veća cijena

\* AP = apurinska ili apirimidinska mjesta  
 8-oksoG = 8-oksogvanin  
 FPG = formamidopirimidin DNA-glikozilaza  
 ENDO III = endonukleaza III  
 hOGG1 = 8-hidroksigvanin DNA-glikozilaza 1

Vrste i količina primarnih oštećenja koja nastaju u molekuli DNA ovise o duljini izloženosti genotoksičnom agensu, a pojava prvih oštećenja koja se mogu otkriti komet-testom ovisi o mehanizmima koji dovode do oštećenja DNA (185). O tome, dakako, ovisi i brzina uklanjanja oštećenja, odnosno njihov popravak.

Namjeravamo li s pomoću komet-testa procijeniti genotoksične učinke kronične izloženosti, uzorkovanje valja provesti tek nakon što se uspostavila ravnoteža između indukcije i popravka oštećenja u DNA. Želimo li otkriti učinke akutne izloženosti ili razinu oštećenja DNA nakon prestanka kronične izloženosti nekom genotoksičnom agensu, uzorak za analizu trebalo bi uzeti unutar nekoliko sati (121). Naime, vrlo oštećene stanice ugibaju procesima apoptoze i/ili nekroze i bivaju nadomještene novim stanicama. S druge strane, većina primarnih oštećenja (osobito jednolančani lomovi) popravljaju se u roku od 15-ak minuta do nekoliko sati (177, 186). Razina popravka oštećene DNA viša je u proliferirajućim nego u mirujućim limfocitima (187). Utvrđujemo li razinu oštećenja DNA u diobeno aktivnim stanicama, valja imati na umu da sam proces udvostručenja DNA prati prolazni porast vrijednosti dužina repa, postotka DNA u repu i repnog momenta (188, 189). Naime, mjesta aktivne sinteze DNA nakon denaturacije u lužnatim uvjetima ponašaju se kao jednolančani lomovi te povisuju ukupnu razinu oštećenja DNA koja se otkriva metodom komet-testa (188).

Pri tumačenju rezultata komet-testa treba dobro poznavati mehanizme djelovanja agensa kojima

su ispitanici bili izloženi. Ako su u DNA prisutna ukrižena povezivanja DNA-DNA i DNA-proteini, otežano je razdvajanje lanaca DNA i oslobađanje odlomljenih fragmenata tijekom denaturacije (190) pa će migracija DNA biti značajno usporena (175, 178). Pri tumačenju rezultata valja voditi računa i o tome da su mnoga tkiva, a i sama periferna krv koja se najviše rabi kao izvor stanica za analizu, sastavljena od mješovitih populacija stanica čiji se životni vijek i osjetljivost mogu razlikovati.

Primjenjujemo li komet-test za otkrivanje razine oštećenja DNA u krvnim stanicama različitih ispitanika neke profesionalno izložene populacije, treba imati na umu i interindividualnu varijabilnost jer su razine primarnih oštećenja DNA genski uvjetovane te odražavaju individualnu genetičku osjetljivost, odnosno stabilnost ili nestabilnost genoma. Istraživanja na populacijama o spolno uvjetovanim razlikama u razinama primarnih oštećenja DNA dala su kontradiktorne rezultate (191-194), a neka istraživanja nisu utvrdila značajne razlike (195, 196). Neki autori našli su porast razine primarnih oštećenja DNA u ovisnosti o dobi (193, 197, 198), drugi ne (191, 192, 195, 196, 199).

Osim genotoksičnih agensa kojima su ispitanici izloženi za vrijeme rada, na primarna oštećenja DNA dodatno utječu i drugi čimbenici, poput niskih doza prirodnih zračenja u okolišu (200), onečišćenja u okolišu i razine sunčeve svjetlosti (201, 202), uzimanja nekih lijekova (203), medicinske izloženosti radioizotopima (204, 205) i X-zračenju (206), teških fizičkih napora (206), nekih bolesti (208, 209) i

upalnih procesa (210) i dr. Međutim, u najspominjanije čimbenike koji podižu razinu primarnih oštećenja DNA ubraja se pušenje duhana (191, 195, 196, 198, 199, 211).

Komet-test našao je primjenu i u mjerenju razine primarnih oštećenja DNA u stanicama i tkivima radnika koji rukuju antineoplastičnim lijekovima. Prvi je put u te svrhe primijenjen u Turskoj 1999. (110). Do danas su objavljeni rezultati 14 istraživanja koja su provedena u različitim državama, uključujući i Hrvatsku (79, 111) (tablica 3). U 13 studija za analizu su upotrijebljene krvne stanice, a u istraživanju koje su proveli Ursini i sur. (113) razine primarnih oštećenja DNA usporedo su mjerene na limfocitima i epitelnim stanicama bukalne sluznice. Važno je napomenuti da su svim istraživanjima, osim spomenutoga, primjenom komet-testa dobiveni pozitivni rezultati na limfocitima (tablica 3, slika 6), što dodatno upućuje na njegovu osjetljivost i prednosti u odnosu na druge metode.

Valja očekivati da će u budućnosti važnost metode komet-testa biti još veća s obzirom na to da se navedena tehnika neprekidno usavršava, kako uvođenjem novih modifikacija koje omogućuju osjetljivo otkrivanje specifičnih oštećenja u DNA tako i povezivanjem s drugim molekularno-biološkim tehnikama (primjerice komet-FISH, kombinacija s tehnikom fluorescencijske hibridizacije *in situ* koja omogućuje otkrivanje specifičnih dijelova kromosoma ili pojedinačnih gena u repu kometa) (212).

Usporedba komet-testa i standardnih citogenetičkih metoda prikazana je na tablici 4. Značajna mu je prednost što omogućuje osjetljivo otkrivanje oštećenih stanica unutar veće populacije stanica koje uopće ne trebaju pokazivati znakove oštećenja. Zbog te i svih ranije opisanih značajki komet-test ima najveću važnost u procjeni akcidentalne izloženosti. Ovaj test ipak ne može potpuno zamijeniti standardne citogenetičke metode (ponajprije zbog problema oko standardizacije koju otežava uporaba različitih računalnih programa za analizu), ali ih za sada vrlo korisno nadopunjuje. Nadalje, zbog relativno kratkog vremena primjene komet-testa u svrhu biološkog nadzora, njegovo značenje u potvrđivanju uzročno-posljedične veze između oštećenja i povišenog rizika od pojave raka još nije dovoljno dokumentirano. Teško je i očekivati da bi se mogla uspostaviti bilo kakva izravna povezanost, budući da su oštećenja DNA koja komet-test detektira prolazne prirode, dok se oštećenja koja mogu upućivati na povišeni rizik od pojave raka moraju "fiksirati" u genomu.

## ZAKLJUČAK

Primjenom različitih bioloških testova mogu se dobiti važne informacije o individualnoj osjetljivosti profesionalno izloženih ispitanika, koje u konačnici mogu poslužiti unaprjeđenju postojećih uvjeta rada i upravljanju rizicima pri izloženosti genotoksičnim agensima. Biološki je nadzor stoga važna preventivna mjera za zaštitu zdravlja izloženih radnika. Dosadašnja istraživanja na populacijama ispitanika profesionalno izloženih antineoplastičnim lijekovima upućuju na zaključak da je za dobivanje što potpunije slike o prirodi oštećenja genoma korisno primijeniti kombinacije više metoda. Premda se u novije vrijeme osim standardnih citogenetičkih metoda i komet-testa bilježe i slučajevi primjene nekih još osjetljivijih metoda, primjerice istraživanja na razini pojedinih genskih lokusa i polimorfizama gena (73, 94, 95, 103-105, 108, 113), zbog problema sa standardizacijom i nedovoljnog poznavanja čimbenika koji na njih utječu, ne treba očekivati da će te nove tehnike uskoro ući u širu primjenu. Uzevši u obzir sve prednosti i nedostatke raspoloživih citogenetičkih metoda, možemo zaključiti da se primjenom MN-testa mogu procijeniti štetni učinci izloženosti najvećem broju antineoplastičnih lijekova, uključujući i one koji remete funkciju diobenog vretena. Analiza SCE i dalje ostaje visoko osjetljiva i specifična metoda za otkrivanje učinaka alkilirajućih agensa, dok kometni test ima veliku važnost u slučajevima incidenata kada je potrebno provesti brzu procjenu izloženosti ispitanika.

## Zahvala

Rukopis je nastao u okviru znanstvenoistraživačkog rada na projektu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa br. 022-0222148-2137. Autori zahvaljuju prof. dr. sc. Vlasti Bradamante (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu) i prof. dr. sc. Mirjani Pavlica (Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu) na pregledavanju rukopisa i vrlo korisnim stručnim savjetima za unaprjeđenje teksta.

## LITERATURA

1. National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). NIOSH Alert. Preventing occupational exposures to antineoplastic and other hazardous drugs in health care settings. Publication Number 2004-165. Cincinnati (OH): NIOSH Publication Dissemination; 2004.
2. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. Guidelines for ATC classification and DDD assignment 2010

- [pristup 17. siječnja 2010.]. Dostupno na <http://www.whooc.no/filearchive/publications/2010guidelines.pdf>.
3. Vrhovac B, urednik. Farmakoterapijski priručnik. 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2003.
  4. International Agency for Research on Cancer (IARC). Complete List of Agents evaluated and their classification [pristup 17. siječnja 2010.]. Dostupno na <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>.
  5. International Agency for Research on Cancer (IARC). Agents reviewed by the IARC Monographs Volume 1-100A (by CAS numbers) [pristup 17. siječnja 2010.]. Dostupno na <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ListagentsCASnos.pdf>.
  6. International Agency for Research on Cancer (IARC). Summaries and Evaluations: Melphalan, Medphalan and Merphalan [pristup 17. siječnja 2010.]. Dostupno na <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol09/melphalan.html>.
  7. Falck K, Gröhn P, Sorsa M. Mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. *Lancet* 1979;1:1250-1.
  8. Sanderson BJ, Shield AJ. Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents. *Mutat Res* 1996;355:41-57.
  9. Sanderson BJ, Ferguson LR, Denny WA. Mutagenic and carcinogenic properties of platinum-based anticancer drugs. *Mutat Res* 1996;355:59-70.
  10. Jacobson MA, Stack HF, Waters MD. Genetic activity profiles of anticancer drugs. *Mutat Res* 1996;355:171-208.
  11. Singh B, Gupta RS. Mutagenic responses of thirteen anticancer drugs on mutation induction at multiple genetic loci and sister chromatid exchanges in chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1983;43:577-84.
  12. Page C, Curtis M, Sutter M, Walker M, Hoffman B, urednici. *Integrated Pharmacology*. 2. izd. Edinburgh: Mosby International Ltd.; 2002.
  13. Rang HP, Dale MM, Riffer JM, Moore PK, urednici. *Pharmacology*. 5. izd. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2003.
  14. Henke Yarbro C, Hansen Frogge M, Goodman M, urednici. *Cancer Nursing: Principles and Practice*. 6. izd. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers Inc.; 2005.
  15. Drabløs F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Díaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE. Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair* 2004;3:1389-407.
  16. Chen C-S, Lin JT, Goss KA, He Y, Halpert JR, Waxman DJ. Activation of the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide: identification of cytochrome P450 2B enzymes and site-specific mutants with improved enzyme kinetics. *Mol Pharmacol* 2004;65:1278-85.
  17. Chabner B, Longo DL, urednici. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*. 4. izd. Philadelphia (PA): Lippincot Williams and Wilkins; 2006.
  18. Skeel RT, urednik. *Handbook of Cancer Chemotherapy*. 7. izd. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins; 2007.
  19. Paci A, Rieutord A, Brion F, Prognon P. Separation methods for alkylating antineoplastic compounds. *J Chrom B* 2001;764:255-87.
  20. British Columbia Cancer Agency (BCCA). BC Cancer Agency Cancer Drug Manual<sup>®</sup> Gemcitabine [pristup 20. siječnja 2010.]. Dostupno na [http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/61DCBA09-705A-485C-9058-05B892064E80/19547/Gemcitabinemonograph\\_2Nov06.pdf](http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/61DCBA09-705A-485C-9058-05B892064E80/19547/Gemcitabinemonograph_2Nov06.pdf).
  21. American Cancer Society, Lenhard RE, Osteen RT, Gansler TS, urednici. *Clinical Oncology*. 2. izd. Malden (MA): Blackwell Science Inc.; 2001.
  22. Schellens JHM, McLeod HL, Newell DR, urednici. *Cancer Clinical Pharmacology*. New York (NY): Oxford University Press Inc.; 2005.
  23. Giaccone G, Schilsky R, Sondel P, urednici. *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers: Annual 19*. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 2001.
  24. Vig BK. Genetic toxicology of mitomycin C, actinomycins, daunomycin and adriamycin. *Mutat Res* 1977;48:189-238.
  25. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999;57:727-41.
  26. Vig BK, Lewis R. Genetic toxicology of bleomycin. *Mutat Res* 1978;55:121-45.
  27. Povirk LF, Austin MJF. Genotoxicity of bleomycin. *Mutat Res* 1991;257:127-43.
  28. Erexson GL, Bryant MF, Kwanyuen P, Kligerman AD. Bleomycin sulfate-induced micronuclei in human, rat, and mouse peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 1995;25:31-6.
  29. González-Cid M, Mudry M, Larripa I. Chromosome damage induced by carboplatin (CBDCA). *Toxicol Lett* 1995;76:97-103.
  30. British Columbia Cancer Agency (BCCA). BC Cancer Agency Cancer Drug Manual<sup>®</sup> Oxaliplatin [pristup 20. siječnja 2010.]. Dostupno na [http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/D0132051-8601-4B5E-89A0-5BB3B4739C83/31059/Oxaliplatinmonograph\\_1Nov08\\_formatted.pdf](http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/D0132051-8601-4B5E-89A0-5BB3B4739C83/31059/Oxaliplatinmonograph_1Nov08_formatted.pdf).
  31. Barton-Burke M, Wilkes GM, Ingwersen K, urednici. *Cancer Chemotherapy: A Nursing Process Approach*. 3. izd. Sudbury (MA): Jones and Bartlett Publishers, Inc.; 2001.
  32. British Columbia Cancer Agency (BCCA). BC Cancer Agency Cancer Drug Manual<sup>®</sup> Procarbazine [pristup 20. siječnja 2010.]. Dostupno na [http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/7B97C0C8-FFF9-4317-8397-81E6268746A9/29592/Procarbazinemonograph\\_1July08.pdf](http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/7B97C0C8-FFF9-4317-8397-81E6268746A9/29592/Procarbazinemonograph_1July08.pdf).
  33. British Columbia Cancer Agency (BCCA). BC Cancer Agency Cancer Drug Manual<sup>®</sup> Amsacrine [pristup 20. siječnja 2010.]. Dostupno na [http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/DC04BEFB-BF13-4A48-91A8-976A9650C6B8/30156/Amsacrinemonograph\\_1Sept08.pdf](http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/DC04BEFB-BF13-4A48-91A8-976A9650C6B8/30156/Amsacrinemonograph_1Sept08.pdf).
  34. Yarbro JW. Mechanism of action of hydroxyurea. *Semin Oncol* 1992;19(Suppl 9):1-10.
  35. Donehower RC. An overview of the clinical experience with hydroxyurea. *Semin Oncol* 1992;19(Suppl 9):11-9.
  36. British Columbia Cancer Agency (BCCA). BC Cancer Agency Cancer Drug Manual<sup>®</sup> Estramustine [pristup 20. siječnja 2010.]. Dostupno na [http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/93C68101-0CC1-43AA-BD89-DEB4E83F62FE/34099/Estramustinemonograph\\_1May09.pdf](http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/93C68101-0CC1-43AA-BD89-DEB4E83F62FE/34099/Estramustinemonograph_1May09.pdf).
  37. Migliore L, Cocchi R, Scarpato R, Sbrana I. Induction of aneuploidy by the antineoplastic drug estramustine in human lymphocytes. *Mutat Res* 1998;412:33-40.
  38. Connor TH, McDiarmid MA. Preventing occupational exposures to antineoplastic drugs in health care settings. *CA Cancer J Clin* 2006;56:354-65.



39. Occupational Safety and Health Administration (OSHA). Office of Occupational Medicine Work Practice Guidelines for Personnel Dealing with Cytotoxic (Antineoplastic) Drugs. Occupational Safety and Health Administration Instruction publication. Washington (DC): US Dept of Labor; 1986.
40. American Society of Health-System Pharmacists. ASHP guidelines on handling hazardous drugs. *Am J Health-Syst Pharm* 2006;63:1172-93.
41. QuapoS 4: Quality Standard for the Oncology Pharmacy Service With Commentary. 4. izd. Oldenburg: Onkopress; 2009.
42. Turci R, Sottani C, Spagnoli G, Minoia C. Biological and environmental monitoring of hospital personnel exposed to antineoplastic agent: a review of analytical methods. *J Chrom B* 2003;789:169-209.
43. World Health Organization (WHO). Biomarkers In Risk Assessment: Validity And Validation. *Environmental Health Criteria* 222, 2001 [pristup 20. siječnja 2010.]. Dostupno na <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>.
44. Norppa H, Sorsa M, Vainio H, Grohn P, Heinonen E, Holsti L, Nordman E. Increased sister chromatid exchange frequencies in lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs. *Scand J Work Environ Health* 1980;6:299-301.
45. Waksvik H, Klepp O, Brøgger A. Chromosome analyses of nurses handling cytostatic agents. *Cancer Treat Rep* 1981;65:607-10.
46. Kolmodin-Hedman B, Hartvig P, Sorsa M, Falck K. Occupational handling of cytostatic drugs. *Arch Toxicol* 1983;54:25-33.
47. Stiller A, Obe G, Boll I, Pribilla W. No elevation of the frequencies of chromosomal alterations as a consequence of handling cytostatic drugs: Analyses with peripheral blood and urine of hospital personnel. *Mutat Res* 1983;121:253-9.
48. Barale R, Sozzi G, Toniolo P, Borghi O, Reali D, Loprieno N, Della Porta G. Sister-chromatid exchanges in lymphocytes and mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. *Mutat Res* 1985;157:235-40.
49. Jordan DK, Patil SR, Jochimsen PR, Lachenbruch PA, Corder MP. Sister chromatid exchange analysis in nurses handling antineoplastic drugs. *Cancer Invest* 1986;4:101-7.
50. Pohlová H, Černá M, Rössner P. Chromosomal aberrations, SCE and urine mutagenicity in workers occupationally exposed to cytostatic drugs. *Mutat Res* 1986;174:213-7.
51. Stücker I, Hirsch A, Doloy T, Bastie-Sigeac I, Hémon D. Urine mutagenicity, chromosomal abnormalities and sister chromatid exchanges in lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs. *Int Arch Occup Environ Health* 1986;57:195-205.
52. Benhamou S, Pot-Deprun J, Sancho-Garnier H, Chouroulinkov I. Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in lymphocytes of nurses handling cytostatic agents. *Int J Cancer* 1988;41:350-3.
53. Sorsa M, Pyy L, Salomaa S, Nyland L, Yager JW. Biological and environmental monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide in industry and hospitals. *Mutat Res* 1988;204:465-79.
54. Krepinsky A, Bryant DW, Davison L, Heddle J, McCalla DR, Douglas G, Michalko K. Comparison of three assays for genetic effects of antineoplastic drugs on cancer patients and their nurses. *Environ Mol Mutagen* 1990;15:83-92.
55. Oestreich 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;242:271-7.
56. Sarto F, Trevisan A, Tomanin R, Canova A, Fiorentino M. Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and urinary thioethers in nurses handling antineoplastic drugs. *Am J Ind Med* 1990;18:689-95.
57. Guinee EP, Beuman GH, Hageman G, Welle IJ, Kleinjans JC. Evaluation of genotoxic risk of handling cytostatic drugs in clinical pharmacy practice. *Pharm Weekblad* 1991;13:78-82.
58. Milković-Kraus S, Horvat Đ. Chromosomal abnormalities among nurses occupationally exposed to antineoplastic drugs. *Am J Ind Med* 1991;19:771-4.
59. Thiringer G, Granung G, Holmén A, Hogstedt B, Jarvhom B, Jonsson D, Persson L, Wahlstrom J, Westin J. Comparison of methods for the biomonitoring of nurses handling antitumor drugs. *Scand J Work Environ Health* 1991;17:133-8.
60. Şardaş S, Gök, S, Karakaya AE. Sister chromatid exchanges in lymphocytes of nurses handling antineoplastic drugs. *Toxicol Lett* 1991;55:311-5.
61. Goloni-Bertollo EM, Tajara EH, Manzato AJ, Varella-Garcia M. Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in lymphocytes of nurses handling antineoplastic drugs. *Int J Cancer* 1992;50:341-4.
62. McDiarmid MA, Kolodner K, Humphrey F, Putman D, Jacobson-Kram D. Baseline and phosphoramidate mustard-induced sister-chromatid exchanges in pharmacists handling anti-cancer drugs. *Mutat Res* 1992;279:199-204.
63. Gorecka D, Gorski T. The influence of cigarette smoking on sister chromatid exchange frequencies in peripheral lymphocytes among nurses handling cytostatic drugs. *Pol J Occup Med Environ Health* 1993;6:143-8.
64. Roth S, Norppa H, Järventaus H, Kyyrönen P, Ahonen M, Lehtomäki J, Sainio H, Sorsa M. Analysis of chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of pharmacists before and after working with cytostatic drugs. *Mutat Res* 1994;325:157-62.
65. Peschke M, Nagel S, Haamann F, Melzer S, Meier K. Cytogenetic monitoring of pharmaceutical staff working with cytostatic drug preparations: A 5-year follow-up. *J Oncol Pharm Pract* 1995;1:33-9.
66. Thulin H, Sundberg E, Hansson K, Cole J, Hartley-Asp B. Occupational exposure to nor-nitrogen mustard: Chemical and biological monitoring. *Toxicol Ind Health* 1995;11:89-97.
67. Brumen V, Horvat Đ. Work environment influence on cytostatics-induced genotoxicity in oncologic nurses. *Am J Ind Med* 1996;30:67-71.
68. Ensslin AS, Huber R, Pethran A, Rommelt H, Schierl R, Kulka U, Fruhmann G. Biological monitoring of hospital pharmacy personnel occupationally exposed to cytostatic drugs: urinary excretion and cytogenetic studies. *Int Arch Occup Environ Health* 1997;70:205-8.
69. Fučić A, Jazbec A, Mijić A, Šešo-Šimić Đ, Tomek R. Cytogenetic consequences after occupational exposure to antineoplastic drugs. *Mutat Res* 1998;416:59-66.
70. Kevekordes S, Gebel TW, Hellwig M, Dames W, Dunkelberg H. Human effect monitoring in cases of occupational exposure to antineoplastic drugs: A method comparison. *Occup Environ Med* 1998;55:145-9.
71. Mahrous HS, Ismail SR, Hashishe MM, Kohail HM. Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in



- lymphocytes of medical personnel handling cytostatic drugs. *J Egypt Public Health Assoc* 1998;73:297-323.
72. Kašuba V, Rozgaj R, Garaj-Vrhovac V. Analysis of sister chromatid exchange and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs. *J Appl Toxicol* 1999;19:401-4.
  73. Lanza A, Robustelli della Cuna FS, Zibera C, Pedrazzoli P, Robustelli della Cuna G. Somatic mutations at the T-cell antigen receptor in antineoplastic drug-exposed populations: comparison with sister chromatid exchange frequency. *Int Arch Environ Health* 1999;72:315-22.
  74. Pilger A, Kohler I, Stettner H, Mader RM, Rizovski B, Terkola R, Diem E, Franz-Hainzl E, Konnaris C, Valic E, Rudiger HV. Long-term monitoring of sister chromatid exchanges and micronucleus formation in pharmacy personnel occupationally exposed to cytostatic drugs. *Int Arch Occup Environ Health* 2000;73:442-8.
  75. Jakab MG, Major J, Tompa A. Follow-up genotoxicological monitoring of nurses handling antineoplastic drugs. *J Tox Environ Health* 2001;62:307-18.
  76. Tompa A, Jakab M, Biro A, Magyar B, Fodor Z, Klupp T, Major J. Chemical Safety and Health Conditions among Hungarian Hospital Nurses. *Ann NY Acad Sci* 2006;1076:635-48.
  77. Ikeda K, Yagi Y, Tkegami M, Lu Y, Morimoto K, Kurokawa N. Efforts to ensure safety of hospital pharmacy personnel occupationally exposed to antineoplastic drugs during a preparation task. *Hosp Pharm* 2007;42:209-18.
  78. Kopjar N, Kašuba V, Rozgaj R, Želježić D, Milić M, Ramić S, Pavlica V, Milković-Kraus S. The genotoxic risk in health care workers occupationally exposed to cytotoxic drugs - A comprehensive evaluation by the SCE assay. *J Environ Sci Health A* 2009;44:462-79.
  79. Kopjar N, Garaj-Vrhovac V, Kašuba V, Rozgaj R, Ramić S, Pavlica V, Želježić D. Assessment of genotoxic risks in Croatian health care workers occupationally exposed to cytotoxic drugs: A multi-biomarker approach. *Int J Hyg Environ Health* 2009;212:414-31.
  80. Nikula E, Kiviniitty K, Leisti J, Taskinen PJ. Chromosome aberrations in lymphocytes of nurses handling cytostatic agents. *Scand J Work Environ Health* 1984;10:71-4.
  81. Rössner P, Černá M, Pokorána D, Hájek V, Petr J. Effect of ascorbic acid prophylaxis on the frequency of chromosome aberrations, urine mutagenicity and nucleolus test in workers occupationally exposed to cytostatic drugs. *Mutat Res* 1988;208:149-53.
  82. Medkova J. Cytogenetic analysis of peripheral lymphocytes in occupationally exposed health personnel. *Acta Univ Palack Olomuc Facult Med* 1990;126:93-106.
  83. Cooke J, Williams J, Morgan RJ, Cooke P, Calvert RT. Use of cytogenetic methods to determine mutagenic changes in the blood of pharmacy personnel and nurses who handle cytotoxic agents. *Am J Hosp Pharm* 1991;48:1199-205.
  84. Milković-Kraus S, Kraus O, Kršnjić H, Kubelka D. Environmental effects on chromosomes in oncology and radiology department personnel. *Prev Med* 1992;21:498-502.
  85. Grummt T, Grummt H-J, Schott G. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of nurses and physicians handling antineoplastic drugs. *Mutat Res* 1993;302:19-24.
  86. Anwar WA, Salama SI, Serafy MM, Hermida S, Hafez AS. Chromosomal aberrations and micronucleus frequency in nurses occupationally exposed to cytotoxic drugs. *Mutagenesis* 1994;9:315-7.
  87. Sessink PJM, Černá M, Rössner P, Pastorkova A, Bavarova H, Frankova K, Anzion RB, Bos RP. Urinary cyclophosphamide excretion and chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes after occupational exposure to antineoplastic agents. *Mutat Res* 1994;309:193-9.
  88. Rubeš J, Kucharová S, Vozdová M, Musilová P, Zudová Z. Cytogenetic analysis of peripheral lymphocytes in medical personnel by means of FISH. *Mutat Res* 1998;412:293-8.
  89. Ansari-Lari M, Saadat M, Shahryari M, Farhud DD. Sister Chromatid Exchanges and Micronuclei in Lymphocyte of Nurses Handling Antineoplastic Drug. *Iranian J Publ Health* 2001;30:37-40.
  90. Burgaz S, Karahalil B, Canhi Z, Terzioglu F, Ancel G, Anzion RB, Bos RP, Huttner E. Assessment of genotoxic damage in nurses occupationally exposed to antineoplastics by the analysis of chromosomal aberrations. *Hum Exp Toxicol* 2002;21:129-35.
  91. Xu SJ, Wang JX, Yang DP. [An investigation on the chromosomal damage in nurses occupationally exposed to antineoplastic drugs, in Chinese]. *Chin J Prev Med* 2003;37:119-20.
  92. Domínguez Odio A, Batista Duharte A, Carnesoltas D, Romero García LI, Lórieaga Loaces E, Cuello Almarales D, Landrove Mora Y, García Cabrera L. Efectos citogenéticos por exposición ocupacional a citostáticos [Cytogenetic effects after occupational exposure to cytostatics, in Spanish]. *Rev Med IMSS* 2004;42:487-92.
  93. Cavallo D, Ursini CL, Perniconi B, Di Francesco A, Giglio M, Rubino FM, Marinaccio A, Iavicoli S. Evaluation of genotoxic effects induced by exposure to antineoplastic drugs in lymphocytes and exfoliated buccal cells of oncology nurses and pharmacy employees. *Mutat Res* 2005;587:45-51.
  94. Testa A, Giachelia M, Palma S, Appolloni M, Padua L, Tranfo G, Spagnoli M, Trindelli D, Cozzi R. Occupational exposure to antineoplastic agents induces a high level of chromosome damage. Lack of an effect of GST polymorphisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;223:46-55.
  95. Mušák L, Poláková V, Halašová E, Osina O, Vodičková L, Buchancová J, Hudečková H, Vodička P. Effect of occupational exposure to cytostatics and nucleotide excision repair polymorphism on chromosomal aberrations frequency. *Interdisc Toxicol* 2009;2:13-7.
  96. Yager JW, Sorsa M, Selvin S. Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes as an index of occupational exposure to alkylating cytostatic drugs. *IARC Sci Publ* 1988;89:213-6.
  97. Machado-Santelli GM, Cerqueira EM, Oliveira CT, de Braganca Peira CAA. Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. *Mutat Res* 1994;332:203-8.
  98. Garaj-Vrhovac V, Kopjar N. Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes as an index of occupational exposure to antineoplastic drugs. *Radiol Oncol* 1998;32:385-92.
  99. Burgaz S, Karahalil B, Bayrak P, Taşkin L, Yavuzaslan F, Bökesoy I, Anzion RBM, Bos RP, Platin N. Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics. *Mutat Res* 1999;439:97-104.
  100. Maluf SW, Erdtmann B. Evaluation of occupational genotoxic risk in a Brazilian hospital. *Genetics Mol Biol* 2000;23:485-8.

101. 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;471:21-7.
102. Hessel H, Radon K, Pethran A, Maisch B, Grobmair S, Sautter I, Fruhmarm G. The genotoxic risk of hospital, pharmacy and medical personnel occupationally exposed to cytostatic drugs-evaluation by the micronucleus assay. *Mutat Res* 2001;497:101-9.
103. Deng H, Zhang M, He J, Wu W, Jin L, Zheng W, Lou J, Wang B. Investigating genetic damage in workers occupationally exposed to methotrexate using three genetic end-points. *Mutagenesis* 2005;20:351-7.
104. Deng H, Lou J, Zhang M, Wu W, Jin L, Chen S, Zheng W, Wang B, He J. Detecting the cytogenetic effects in workers occupationally exposed to vincristine with four genetic tests. *Mutat Res* 2006;599:152-9.
105. Laffon B, Teixeira JP, Silva S, Loureiro J, Torres J, Pásaro E, Méndez J, Mayan O. Genotoxic effects in a population of nurses handling antineoplastic drugs, and relationship with genetic polymorphisms in DNA repair enzymes. *Am J Ind Med* 2006;48:128-36.
106. Cavallo D, Ursini CL, Omodeo-Sale E, Iavicoli S. Micronucleus induction and FISH analysis in buccal cells and lymphocytes of nurses handling antineoplastic drugs. *Mutat Res* 2007;628:11-8.
107. Rekhadevi PV, Sailaja N, Chandrasekhar M, Mahboob M, Rahman MF, Grover P. Genotoxicity assessment in oncology nurses handling anti-neoplastic drugs. *Mutagenesis* 2007;22:395-401.
108. Cornetta T, Padua L, Testa A, Ievoli E, Festa F, Tranfo G, Baccelliere L, Cozzi R. Molecular biomonitoring of a population of nurses handling antineoplastic drugs. *Mutat Res* 2008;638:75-82.
109. Rombaldi F, Cassini C, Salvador M, Saffi J, Erdtmann B. Occupational risk assessment of genotoxicity and oxidative stress in workers handling anti-neoplastic drugs during a working week. *Mutagenesis* 2009;24:143-8.
110. Ündeger Ü, Basaran N, Kars A, Guc D. Assessment of DNA damage in nurses handling antineoplastic drugs by the alkaline COMET assay. *Mutat Res* 1999;439:277-85.
111. Kopjar N, Garaj-Vrhovac V. Application of the alkaline comet assay in human biomonitoring for genotoxicity: A study on Croatian medical personnel handling antineoplastic drugs. *Mutagenesis* 2001;16:71-8.
112. Yang D, Xu S, Wang J. [The study of DNA damage of peripheral lymphocytes in the nurses occupationally exposed to anticancer drugs, in Chinese]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 2002;20:197-9.
113. Ursini CL, Cavallo D, Colombi A, Giglio M, Marinaccio A, Iavicoli S. Evaluation of early DNA damage in healthcare workers handling antineoplastic drugs. *Int Arch Occup Environ Health* 2006;80:134-40.
114. Yoshida J, Kosaka H, Tomioka K, Kumagai S. Genotoxic risks to nurses from contamination of the work environment with antineoplastic drugs in Japan. *J Occup Health* 2006;48:517-22.
115. Sasaki M, Dakeishi M, Hoshi S, Ishii N, Murata K. Assessment of DNA damage in Japanese nurses handling antineoplastic drugs by the comet assay. *J Occup Health* 2008;50:7-12.
116. Izdes S, Sardas S, Kadioglu E, Kaymak C, Ozcagli E. Assessment of Genotoxic damage in nurses occupationally exposed to anaesthetic gases or antineoplastic drugs by the comet assay. *J Occup Health* 2009;51:283-6.
117. Perry P, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature (London)* 1974;251:156-8.
118. Latt S, Allen J, Bloom SE, Carrano A, Falke E, Kram D, Schneider E, Schreck R, Tice R, Whitfield B, Wolff S. Sister chromatid exchanges: A report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1981;87:17-62.
119. Carrano AV, Natarajan AT. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 1988;204:379-406.
120. Morimoto K. Induction of sister chromatid exchanges and cell division delays in human lymphocytes by microsomal activation of benzene. *Cancer Res* 1983;43:1330-4.
121. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DEG, Tice R, Waters MD, Aitio A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res* 2000;463:111-72.
122. Carrano AV, Moore DH. The rationale and methodology for quantifying sister chromatid exchange in humans. U: Heddle JA, urednik. *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*. New York (NY): Academic Press; 1982. str. 267-304.
123. Bonassi S, Fontana V, Ceppi M, Barale R, Bigeri A. Analysis of correlated data in human biomonitoring studies. The case of high sister chromatid exchange frequency cells. *Mutat Res* 1999;438:13-21.
124. Ponzanelli I, Landi S, Bernacchi F, Barale R. The nature of high frequency sister chromatid exchange cells (HFCs). *Mutagenesis* 1997;12:329-33.
125. Hirsch BA, Sentz KK, McGue M. Genetic and environmental influences on baseline SCE. *Environ Mol Mutagen* 1992;20:2-11.
126. Lazutka JR, Dedonyte V, Krapavickaite D. Sister-chromatid exchanges and their distribution in human lymphocytes in relation to age, sex and smoking. *Mutat Res* 1994;306:173-80.
127. Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Casalone R., Dalprà L, De Ferrari M., Degrassi F, Forni A, Lamberti L, Lando C, Migliore L, Padovani P, Pasquini R, Puntoni R, Sbrana I, Stella M, Bonassi S. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidem Biom Prev* 1997;6:249-56.
128. Bender MA, Preston J, Leonard RC, Pyatt BE, Gooch PC, Shelby MD. Chromosomal aberration and sister chromatid exchange frequencies in peripheral lymphocytes of a large human population sample. *Mutat Res* 1988;204:421-33.
129. Anderson D, Francis AJ, Godbert P, Jenkinson PC, Butterworth KR. Variability in chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, and mitogen-induced blastogenesis in peripheral lymphocytes from control individuals. *Environ Health Persp* 1993;101(Suppl 3):83-8.
130. Sharma T, Das BC. Higher incidence of spontaneous sister-chromatid exchanges (SCEs) and X-ray-induced chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes during pregnancy. *Mutat Res* 1986;174:27-33.

131. Vijayalaxmi, Evans HJ. *In vivo* and *in vitro* effects of cigarette smoke on chromosomal damage and sister chromatid exchange in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res* 1982;92:321-32.
132. Obe G, Vogt HJ, Madle S, Fahning A, Heller WD. Double-blind study on the effect of cigarette smoking on the chromosomes of human peripheral blood lymphocytes *in vivo*. *Mutat Res* 1982;92:309-19.
133. Tucker JD, Ashworth LK, Johnston GR, Allen NA, Carrano AV. Variation in human lymphocyte sister-chromatid exchange frequency: result of a long-term longitudinal study. *Mutat Res* 1988;204:435-44.
134. Reidy JA, Annett JL, Chen ATL, Welty TK. Increased sister chromatid exchange associated with smoking and coffee consumption. *Environ Mol Mutagen* 1988;12:311-8.
135. Bonassi S, Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Bigatti P, Camurri L, Dalprà L, De Ferrari M, Forni A, Lando C, Padovani P, Pasquini R, Stella M, Puntoni R. Influence of sex on cytogenetic end points - evidence from a large human sample and review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:671-9.
136. Slapšyte G, Jankauskiene A, Mieraiskiene J, Lazutka JR. Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes of children treated with nitrofurantoin for recurrent urinary tract infection. *Mutagenesis* 2002;17:31-5.
137. Gutierrez S, Carbonell E, Galofre P, Creus A, Marcos R. Low sensitivity of the sister chromatid exchange assay to detect the genotoxic effects of radioiodine therapy. *Mutagenesis* 1999;14:221-6.
138. Jacobson-Kram D. The effects of diagnostic ultrasound on sister chromatid exchange frequencies: a review of the recent literature. *J Clin Ultrasound* 1984;12:5-10.
139. Garaj-Vrhovac V, Kopjar N. Cytogenetic monitoring of cardiology unit hospital workers exposed to ultrasound. *J Appl Toxicol* 2000;20:259-64.
140. Atalay F, Baltacı V, Alpas I, Savas I, Atikcan S, Balci S. Sister chromatid exchange rate from pleural fluid cells in patient with malignant mesothelioma. *Mutat Res* 2000;465:159-63.
141. Cortes-Gutierrez EI, Cerda-Flores RM, Leal-Garza CH. Sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes from women with carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;122:121-3.
142. Cottliar A, Fundia A, Boerr L, Sambuelli A, Negreira S, Gil A, Gomez JC, Chopita N, Bernedo A, Slavutsky I. High frequencies of telomeric associations, chromosome aberrations, and sister chromatid exchanges in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2301-7.
143. Carbonell E, Demopoulos NA, Stefanou G, Psaraki K, Parry EM, Marcos R. Cytogenetic analysis in peripheral lymphocytes of cancer patients treated with cytostatic drugs: Results from an EC Collaborative Study. *Anticancer Drugs* 1996;7:514-9.
144. Kopjar N, Milas I, Garaj-Vrhovac V, Gamulin M. Cytogenetic outcomes of adjuvant chemotherapy in non-target cells of breast cancer patients. *Hum Exp Toxicol* 2007;26:391-9.
145. Norppa H, Bonassi S, Hansteen I-L, Hagmar L, Strömberg U, Rössner P, Boffeta P, Lindholm C, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Fabianoca E, Šram RJ, Knudsen LE, Barale R, Fučić A. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res* 2006;600:37-45.
146. Natarajan AT, Boei JJ, Darroudi F, Van Diemen PCM, Dulout F, Hande MP, Ramalho AT. Current cytogenetic methods for detecting exposure and effects of mutagens and carcinogens. *Environ Health Persp* 1996;104(Suppl 3):445-8.
147. Bender MA, Awa AA, Brooks AL, Evans HJ, Groer PO, Littlefield LG, Pereira C, Preston J, Wachholz BW. Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposure to radiation. *Mutat Res* 1988;196:103-59.
148. International Atomic Energy Agency (IAEA). *Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment*. Technical Report Series no. 405. Vienna: IAEA; 2001.
149. Kopjar N, Želježić D, Garaj-Vrhovac V. Evaluation of DNA damage in the white blood cells of healthy human volunteers using the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Acta Biochim Pol* 2006;53:321-36.
150. Hagmar L, Bonassi S, Strömberg U, Mikoczy Z, Lando C, Hansten I-L, Huici Montagud A, Knudsen L, Norppa H, Reuterwall C, Tinnerberg H, Brøgger A, Forni A, Högstedt B, Lambert B, Mitelman F, Nordenson I, Salomaa S, Skerfving S. Cancer predictive value of cytogenetic markers used in occupational health surveillance programs: a report from an ongoing study by the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Mutat Res* 1998;405:171-8.
151. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 2003;534:65-75.
152. Salama S, Serrana M, Au WW. Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment. *Mutat Res* 1999;436:99-112.
153. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res* 2008;659:93-108.
154. Norppa H, Luomahaara S, Heikänen H, Roth S, Sorsa M, Renzi L, Lindholm C. Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens. *Environ Health Persp* 1993;101(Suppl 3):139-43.
155. Kirsch Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Vanhumelen P. The *in vitro* micronucleus test - a multiendpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res* 1997;392:19-30.
156. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985;147:29-36.
157. Norppa H, Falck GCM. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 2003;18:221-33.
158. Schreiber GA, Beisker W, Braselmann H, Bauchinger M, Bögl KW, Nüsse M. Automated flow cytometric micronucleus assay for human lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 1992;62:695-709.
159. Verschaeve L, Vanderkerken M, Kirsch-Volders M. C-banding as a simple tool to discriminate micronuclei induced by clastogens and aneugens. *Stain Technol* 1988;63:351-4.
160. Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decodier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 2006;88:1515-31.



161. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human population. *Mutat Res* 1993;285:35-44.
162. Fenech M, Neville S, Rinaldi J. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutat Res* 1994;313:203-7.
163. Tucker JD, Nath J, Hando JC. Activation status of the X chromosome in human micronucleated lymphocytes. *Hum Genet* 1996;97:471-5.
164. Fenech M, Morley AA. Kinetochore detection in micronuclei: an alternative method for measuring chromosome loss. *Mutagenesis* 1989;4:98-104.
165. Norppa H, Luomahaara S, Heikonen H, Roth S, Sorsa M, Renzi L, Lindholm C. Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens. *Environ Health Persp* 1993;101(Suppl 3):139-43.
166. Martínez-Pérez LM, Cerda-Flores RM, Gallegos-Cabrales EC, Dávila-Rodríguez MI, Ibarra-Costilla E, Cortés-Gutiérrez EI. Frequency of micronuclei in Mexicans with type 2 diabetes mellitus. *Prague Med Rep* 2007;108:248-55.
167. Masjedi MR, Heidary A, Mohammadi F, Velayati AA, Dokouhaki P. Chromosomal aberrations and micronuclei in lymphocytes of patients before and after exposure to anti-tuberculosis drugs. *Mutagenesis* 2000;15:489-94.
168. Milošević-Đorđević O, Grujičić D, Marinković D, Arsenijević S, Banković S. Effect of various doses of gestogens on micronuclei frequency in human peripheral blood lymphocytes of pregnant women. *Hum Reprod* 2003;18:433-6.
169. Cochran ST, Khodadoust A, Norman A. Cytogenetic effects of contrast material in patients undergoing excretory urography. *Radiology* 1980;136:43-6.
170. Norman A, Cochran S, Bass D, Roe D. Effects of age, sex and diagnostic X-rays on chromosome damage. *Int J Radiat Biol* 1984;46:317-21.
171. Larramendy ML, Knuutila S. Increased frequency of micronuclei in B and T8 lymphocytes from smokers. *Mutat Res* 1991;259:189-95.
172. Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin Y, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Fenech M, The HUMN collaborative group. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat Res* 2003;543:155-66.
173. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti P, Bolognesi C, Cebulka-Wasilewska A, Fabianova E, Fučić A, Hagmar L, Joksić G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa H, Fenech M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007;28:625-31.
174. Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chrom B* 1999;722:225-54.
175. Singh NP. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res* 2000;455:111-27.
176. Plappert U, Raddatz K, Roth S, Fliedner TM. DNA damage detection in man after radiation exposure - the comet assay - its possible application for human monitoring. *Stem Cells* 1995;13:215-22.
177. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider LL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-91.
178. Olive PL. Applications of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol* 1999;75:395-405.
179. Collins A, Dušinská M, Gedik C, Štetina R. Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable marker? *Environ Health Persp* 1996;104(Suppl 3):465-9.
180. Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet" assay. *Radiat Res* 1990;122:86-94.
181. Wojewódzka M, Grądzka I, Buraczewska I. Modified neutral comet assay for human lymphocytes. *Nukleonika* 2002;47:1-5.
182. Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G. Mechanisms of DNA double strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 2000;15:289-302.
183. Speit G, Schütz P, Bonzheim I, Trenz K, Hoffmann H. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol Lett* 2004;146:151-8.
184. Smith CC, O'Donovan MR, Martin EA. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis* 2006;21:185-90.
185. Miyamae Y, Zaizen K, Ohara K, Mine Y, Sasaki YF. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (comet) assay. 1. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. *Mutat Res* 1998;415:229-35.
186. Tice RR. The single cell gel / comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. U: Phillips DH, Vennit S, urednici. *Environmental Mutagenesis*. Oxford: Bioscientific; 1995. str. 315-39.
187. Kaminskas E, Li JC. Repair of DNA damage induced by oxygen radicals in human non-proliferating and proliferating lymphocytes. *Mutat Res* 1992;274:103-10.
188. Šalagović J, Maes A, Van Gorp U, Verschaevae L, Kalina I. The cell cycle positions influence DNA migration as measured with the alkaline comet assay in stimulated human lymphocytes. *Folia Biol (Praha)* 1997;43:79-82.
189. Villani P, Altavista PL, Castaldi L, Leter G, Cordelli E. Analysis of DNA oxidative damage related to cell proliferation. *Mutat Res* 2000;464:229-37.
190. Fortini P, Raspaglio G, Falchi M, Dogliotti E. Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay. *Mutagenesis* 1996;11:169-75.
191. Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 1994;307:323-33.
192. Wojewódzka M, Kruszewski M, Iwanenko T, Collins AR, Szumiel I. Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. I. Strand breakage. *Mutat Res* 1998;416:21-35.
193. Mendoza-Núñez VM, Sánchez-Rodríguez MA, Retana-Ugalde R, Vargas-Guadarrama LA, Altamirano-Lozano MA. Total antioxidant levels, gender, and age as risk factors for



- DNA damage in lymphocytes of the elderly. *Mech Ageing Dev* 2001;122:835-47.
194. Bajpayee M, Dhawan A, Parmar D, Kumar Pendey A, Mathur N, Seth PK. Gender-related differences in basal DNA damage in lymphocytes of a healthy Indian population using the alkaline comet assay. *Mutat Res* 2002;520:83-91.
195. Frenzilli G, Betti C, Davini T, Desideri M, Fornai E, Giannessi L, Maggiorelli F, Paoletti P, Barale R. Evaluation of DNA damage in leukocytes of ex-smokers by single cell gel electrophoresis. *Mutat Res* 1997;375:117-23.
196. Zhu CQ, Lam TH, Jiang CQ, Wei BX, Lou X, Liu WW, Lao XQ, Chen YH. Lymphocyte DNA damage in cigarette factory workers measured by the comet assay. *Mutat Res* 1999;444:1-6.
197. Singh NP, Danner DB, Tice RR, Pearson JD, Brant LJ, Morrell CH, Schneider EL. Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mutat Res* 1991;256:1-6.
198. Piperakis SM, Visvardis EE, Sagnou M, Tassiou AM. Effects of smoking and aging on oxidative DNA damage of human lymphocytes. *Carcinogenesis* 1998;19:695-8.
199. Kopjar N, Želježić D, Garaj-Vrhovac V. Evaluation of DNA damage in the white blood cells of healthy human volunteers using the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Acta Biochim Pol* 2006;53:321-36.
200. Hellman B, Friis L, Vaghef H, Edling C. Alkaline single cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a study on subjects with residential exposure to radon. *Mutat Res* 1999;442:121-32.
201. Moller P, Wallin H, Holst E, Knudsen LE. Sunlight-induced DNA damage in human mononuclear cells. *FASEB J* 2002;16:45-53.
202. Verschaeve L, Koppen G, Gorp UV, Schoeters G, Jacobs G, Zwijsen C. Seasonal variations in spontaneous levels of DNA damage; implication in the risk assessment of environmental chemicals. *J Appl Toxicol* 2007;27:612-20.
203. Gutiérrez S, Carbonell E, Galofré P, Creus A, Marcos R. The alkaline single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay applied to the analysis of radiation-induced DNA damage in thyroid cancer patients treated with <sup>131</sup>I. *Mutat Res* 1998;413:111-9.
204. Dantas FJ, de Mattos JC, Moraes MO, Boasquevisques E, Rodrigues MP, Lage CA, Cabral-Neto JB, Leitão AC, Bernardo-Filho M, Bezerra RJ, Carvalho JJ, Caldeira-de-Araujo A. DNA damage in peripheral blood nuclear cells assessed by comet assay from individuals submitted to scintigraphic examinations. *Cell Mol Biol* 2002;48:789-91.
205. Biri A, Civelek E, Karahalil B, Sardaş S. Assessment of DNA damage in women using oral contraceptives. *Mutat Res* 2002;521:113-9.
206. Milković Đ, Garaj-Vrhovac V, Ranogajec-Komor M, Miljanić S, Gajski G, Knežević Ž, Beck N. Primary DNA damage assessed with the comet assay and comparison to the absorbed dose of diagnostic X-rays in children. *Int J Toxicol* 2009;5:405-16.
207. Mastaloudis A, Yu T-W, O'Donnell RP, Frei B, Dashwood RH, Traber MG. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radical Biol Med* 2004;36:966-75.
208. Møller P, Knudsen LE, Frenz G, Dybdahl M, Wallin H, Nexø BA. Seasonal variation of DNA damage and repair in patients with non-melanoma skin cancer and referents with and without psoriasis. *Mutat Res* 1998;407:25-34.
209. Mozaffarieh M, Schoetzau A, Sauter M, Grieshaber M, Orgül S, Golubnitschaja O, Flammer J. Comet assay analysis of single-stranded DNA breaks in circulating leukocytes of glaucoma patients. *Mol Vis* 2008;14:1584-8.
210. Bilgici B, Bedir A, Şentürk N, Alvir M, Aydin F, Turanlı AY. Genotoxicity assessment using comet assay in Behcet's disease patients. *Mutat Res* 2005;578:170-4.
211. Hininger I, Chollat-Namy A, Sauvagio S, Osman M, Faure H, Cadet J, Favier A, Rousell A-M. Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers. *Mutat Res* 2004;558:75-80.
212. Rapp A, Hausmann M, Greulich KO. The comet-FISH technique: a tool for detection of specific DNA damage and repair. *Methods Mol Biol* 2005;291:107-19.

### *Summary*

#### ANTINEOPLASTIC DRUGS AS A POTENTIAL RISK FACTOR IN OCCUPATIONAL SETTINGS: MECHANISMS OF ACTION AT THE CELL LEVEL, GENOTOXIC EFFECTS, AND THEIR DETECTION USING DIFFERENT BIOMARKERS

This article brings an overview of the mechanisms of action of antineoplastic drugs used in the clinical setting. It also describes the genotoxic potentials of the most important classes of antineoplastic drugs involved in standard chemotherapy protocols. Classification of antineoplastic drugs according to the IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans is accompanied by data on their mutagenicity and the most recent updates in the Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) Classification System. We report the main findings of biomonitoring studies that were conducted in exposed healthcare workers all over the world between 1980 and 2009 using four biomarkers: sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, micronuclei, and the comet assay. The methods are briefly explained and their advantages and disadvantages discussed. Biomarkers provide important information on individual genome sensitivity, which eventually might help to improve current working practices and to manage the risks related with exposure to genotoxic agents. Taking into consideration all known advantages and drawbacks of the existing cytogenetic methods, the micronucleus assay, which is able to detect both clastogenic and aneugenic action, is the most suitable biomarker for assessing harmful effects of antineoplastic drugs currently used in health care.

**KEY WORDS:** *chromosome aberrations, comet assay, DNA, micronuclei, sister chromatid exchanges*

#### CORRESPONDING AUTHOR:

Nevenka Kopjar, Ph.D.  
Mutagenesis Unit  
Institute for Medical Research and Occupational Health  
Ksaverska c. 2, HR-10 000 Zagreb, Croatia  
[nkopjar@imi.hr](mailto:nkopjar@imi.hr)