

# Genotoksikološki utjecaj kemikalija na kromosomske aberacije

---

Vrbančić, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:674621>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Kristina Vrbančić**

**GENOTOKSIKOLOŠKI UTJECAJ  
KEMIČALIJA NA KROMOSOMSKE  
ABERACIJE**

**Završni rad**

**Osijek, 2015.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Kristina Vrbančić**

**GENOTOKSIKOLOŠKI UTJECAJ  
KEMIKALIJA NA KROMOSOMSKE  
ABERACIJE**

**Završni rad**

**Osijek, 2015.**

Rad je napravljen na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku u Laboratoriju za medicinsku genetiku na Katedri za medicinsku biologiju i genetiku.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Jasenka Wagner

Rad ima 33 lista, dvije tablice i 9 slika.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Jasenki Wagner na stručnoj i moralnoj podršci te pomoći tijekom istraživanja i izrade završnog rada. Zahvaljujem se Ivani Škrlec i Saneli Štibi na prijateljstvu, trudu, strpljenju i korisnim savjetima tijekom istraživanja i izrade završnog rada.

Velika hvala mojoj obitelji i prijateljima Moniki, Mateju, Vedrani i Mii na razumijevanju, pomoći i velikoj potpori.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. IONIZIRAJUĆE ZRAČENJE .....	3
1.2. KARCINOGENOST I MUTAGENEZA .....	4
1.2.1. METANOL .....	5
1.2.2. OCTENA KISELINA .....	5
1.2.3. KSILOL .....	5
2. HIPOTEZA .....	7
3. CILJEVI .....	8
4. ISPITANICI I METODE .....	9
4.1. Ustroj studije .....	9
4.2. Ispitanici .....	9
4.3. Materijali i metode .....	9
4.3.1. Materijali .....	9
4.3.1.1. KSILOL .....	12
4.3.1.2. OCTENA KISELINA .....	13
4.3.1.3. METANOL .....	14
4.3.2. Kultivacija .....	15
4.3.3. Izrada .....	15
4.3.4. Priprema preparata .....	16
4.3.5. Bojanje preparata .....	16
4.4. ANALIZA PREPARATA, BILJEŽENJE I ČUVANJE PODATAKA .....	16
4.5. STATISTIČKE METODE .....	16
5. REZULTATI .....	17
5.1. Broj i vrsta kromosomskih aberacija .....	17
5.2. Mitotički indeks ispitivanih kemikalija .....	22
6. RASPRAVA .....	25
7. ZAKLJUČAK .....	27
8. SAŽETAK .....	28
9. SUMMARY .....	29
10. LITERATURA .....	30
11. ŽIVOTOPIS .....	32
12. PRILOZI .....	33

## I. POPIS SLIKA I TABLICA

Slika 1. Sterilni kabinet s vertikalnim strujanjem zraka (Uniflow aura-VF72 laminar)

Slika 2. Centrifuga (Eppendorf 5804)

Slika 3. Raspršivač metafaza (OptiChrome Euroclone)

Slika 4. Srednja vrijednost broja kromosomskih aberacija (KA) sa standardnom greškom pri različitim koncentracijama kemikalija. Studentov t-test  $*P = 0,013$  i  $**P = 0,007$ .

Slika 5. Primjer metafaze bez prisutnih kromosomskih aberacija, preparat iz stanične kulture kontrola, ispitanik broj 1.

Slika 6. Kromosomski lom, preparat iz stanične kulture s octenom kiselinom koncentracije  $10,6578 \mu\text{M}$ , ispitanik broj 3.

Slika 7. Kromatidni lom, preparat iz stanične kulture s octenom kiselinom koncentracije  $0,5328 \mu\text{M}$ , ispitanik 1.

Slika 8. Posljedica velike koncentracije kemikalije, preparat iz stanične kulture metanola s koncentracijom  $267,166 \mu\text{M}$ , ispitanik 2.

Slika 9. Srednja vrijednost mitotičkog indeksa (MI) sa standardnom greškom pri različitim koncentracijama kemikalija. Studentov t-test  $*P = 0,047$ ;  $**P < 0,001$ .

Tablica 1. Kromosomske aberacije različitih koncentracija metanola, ksilola i octene kiseline (t-test).

Tablica 2. Mitotički indeks različitih koncentracija metanola, ksilola i octene kiseline u tri ispitanika.

## 1. UVOD

Oduvijek se smatralo da različite kemikalije nepovoljno utječu na svakodnevni život. Znanstvenici su zbog toga napravili smjernice za testiranje kemikalija koje su prvi puta usvojene 1983. godine. U svjetlu napredovanja znanosti 1997. godine izdane su promijenjene i poboljšane smjernice testa na kemikalije (1). Test na kromosomske aberacije je jedan od tih testova. Svrha *in vitro* testa kromosomskih aberacija je identificirati strukturalna kromosomska oštećenja u uzgojenim stanicama. 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. Kromatidne aberacije (lomovi i izmjene dijelova među kromatidima različitih i/ili istih kromosoma) nastaju kao posljedica oštećenja DNA u G2-fazi staničnog ciklusa, nakon sinteze i udvostručenja DNA. Kromosomske aberacije (kromosomski lomovi, acentrični fragmenti, bicentrični i policentrični te prstenasti kromosom) nastaju kao posljedica oštećenja DNA izazvanog u G1-fazi staničnog ciklusa, odnosno prije udvostručenja. 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. Nestabilne aberacije su bicentrični i prstenasti kromosomi, acentrični fragmenti te druge asimetrične preraspodjele 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. Stabilne su aberacije uravnotežene translokacije, inverzije i druge simetrične preraspodjele koje se diobom mogu prenijeti u stanice kćeri. Mogu se detektirati samo posebnim tehnikama bojenja kromosoma (metode pruganja kromosoma, fluorescentna *in situ* hibridizacija). Agense koji uzrokuju oštećenja strukture kromosoma nazivamo klastogenima. Njihovo djelovanje može biti neovisno o S-fazi staničnog ciklusa (odnosno sintezi DNA) pa u tom slučaju izazivaju lomove u molekuli DNA koji će se detektirati tek u prvoj metafazi nakon izloženosti kao kromosomske aberacije ako je stanica u trenutku izloženosti bila u G0-fazi, odnosno kromatidne aberacije ako je stanica bila u S/G2-fazi ciklusa. Pojavnost strukturnih kromosomskih aberacija u kromosomima limfocita ovisi o razini, trajanju i učestalosti izloženosti te mehanizmima klastogeneze uključenim u nastanak oštećenja (1). Limfociti periferne krvi idealne su stanice na kojima se provode testovi genotoksičnosti. Limfociti nastaju od pluripotentne hematopoetske matične stanice u koštanoj srži (limfociti B)



i timusu (limfociti T), odakle migriraju u periferne limfoidne organe. U perifernoj krvi nalazi se 2 % ili  $500 \cdot 10^9$  limfocita (2) gdje neki trajno cirkuliraju između limfoidnog tkiva i krvi. Cirkulacija limfocita između limfoidnih organa i krvi važna je u analiziranju kromosomskih oštećenja u krvi nakon *in vivo* izlaganja sredstvima koja oštećuju DNA, zato što se limfociti pojavljuju na mjestu oštećenja bilo gdje u tijelu i onda se mogu analizirati nakon *in vitro* uzgoja. Humani se limfociti dodatkom mitogena u medij kao što je fitohemaglutinin (PHA, eng. *phytohaemagglutinin*), potaknu na diobu u *in vitro* uvjetima (2). Provođenje testa u *in vitro* uvjetima općenito zahtjeva upotrebu egzogenih izvora metaboličke aktivnosti osim ako su stanice metabolički kompetentne u odnosu na testiranu tvar. Egzogeni metabolički aktivacijski sustav ne može u potpunosti oponašati *in vivo* uvjete. U obzir također treba uzeti izbjegavanje uvjeta koji mogu voditi do lažno pozitivnih rezultata (kromosomska oštećenja koja nisu direktno izazvana interakcijom između testirane tvari i kromosoma, takvo stanje uključuje promjenu pH i osmolalnosti, interakciju sa sastavnim tvarima medija ili pretjeranu razinu citotoksičnosti). Test je korišten u detekciji kromosomskih aberacija koje su možda rezultat klastogenih događanja. Analizu kromosomskih aberacija treba napraviti dok su stanice u metafazi. Stanične kulture humanog ili drugog podrijetla izložene su ispitivanoj kemikaliji s i bez egzogenog izvora metaboličke aktivacije osim ako su stanice same sposobne metabolizirati. U određenim intervalima nakon izlaganja stanične kulture ispitivanom kemikalijom ona je tretirana s kolcemidom koji zaustavlja diobu stanice u metafazi. Nakon čega se pristupa izradi mikroskopskih preparata koji se pregledavaju pod svjetlosnim mikroskopom. Obično se analizira 100 metafaza prve diobe *in vitro* te utvrđuje ukupan broj i vrste oštećenja na kromosomima (1). Izloženost bilo kakvom obliku ionizirajućih zračenja ili genotoksičnim agensima općenito se dovodi u vezu s porastom učestalosti kromosomskih aberacija, zbog čega se ova metoda gotovo ekskluzivno rabi u svrhu procjene takve izloženosti. Također, dokazana je prediktivnost metode i uzročno-posljedična veza između povišene razine kromosomskih aberacija i povišenog rizika od pojave raka. 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 (3).

## 1.1. IONIZIRAJUĆE ZRAČENJE

U biološkim sustavima zračenje ovisi o količini apsorbirane energije i o njenoj prostornoj raspodjeli. Osjetljivost pojedine vrste tkiva ovisi o diobi stanica u tom tkivu. Stanice koje grade mišićna, živčana i koštana tkiva vrlo se rijetko, gotovo nikad ne dijele te su stoga slabo osjetljive na izloženost zračenju. Nasuprot njima, na ionizirajuće zračenje su osjetljivije nediferencirane stanice, odnosno matične stanice koje susrećemo u krvotvornom tkivu i spolnim žlijezdama, odnosno stanice kože i sluznica koje se neprekidno dijele. Jezgra je vrlo osjetljiva na zračenje zbog DNA molekule koja je najosjetljivija makromolekula. Ionizirajuće zračenje može DNA molekulu oštetiti na dva načina: izravnom interakcijom ili neizravno, putem slobodnih radikala. Prolaskom kroz materiju zračenje gubi energiju. Gubitak energije u blizini dvostruke DNA zavojnice najčešće uzrokuje oštećenje samo jednog od lanaca (jednolančani lom). Postoji vjerojatnost da takav događaj ili više istodobnih događaja u blizini DNA molekule uzrokuje podudarna oštećenja na oba lanca pa nastaje dvolančani lom. Zračenje također usporava i inhibira diobu. Ako se stanice koje se dijele ozrače, ovisno o dozi zračenja, tipu stanica i stadiju ciklusa, može doći do trenutne smrti (smrt za vrijeme ozračivanja), stanice umiru nakon nekog vremena nakon ozračivanja (interfazna smrt), stanica preživi, ali ima mutaciju. Cilj zaštite od ionizirajućeg zračenja je spriječiti nastanak determinističkih učinaka koji su posljedica izlaganja zračenju i ograničiti pojavu stohastičkih učinaka na najmanju moguću mjeru te osigurati da pri obavljanju djelatnosti kod kojih dolazi do izlaganja ionizirajućem zračenju to izlaganje bude opravdano, odnosno da korist od tog izlaganja uvijek bude veća od štete. Međunarodna komisija za radiološku zaštitu (ICRP, eng. *International Commission on Radiological Protection*) preporuča da se uporaba zračenja, odnosno sustav radiološke zaštite zasniva na tri načela: opravdanost, optimalizacija i ograničenje. Opravdanost - ni jedna djelatnost s izvorima ionizirajućeg zračenja ne smije započeti ako nismo sigurni da ćemo polučiti veću korist za izložene pojedince ili društvo od štete koju izloženost može prouzročiti. Optimalizacija - doza koju primi pojedinac iz bilo kojeg izvora, broj izloženih osoba odnosno vjerojatnost izlaganja ionizirajućem zračenju, mora se održavati toliko nisko koliko je razumno moguće, a u skladu s gospodarskim i socijalnim čimbenicima koji se moraju uzeti u obzir. Ograničenje - odnosi se na ograničenje ozračenja pojedinca s tim da izlaganje pojedinca mora biti niže od zakonom utvrđenih granica. Određene su granice doze za djelatnike u zoni ionizirajućeg zračenja. Efektivna doza je ograničena na 100 mSv u pet uzastopnih godina, s time da u ni jednoj godini primljena doza ne smije prekoračiti 50 mSv (7).

## 1.2. KARCINOGENOST I MUTAGENEZA

Mnogi fizički, kemijski i biološki faktori koji se nalaze u životnom i radnom okolišu imaju karcinogene i mutagene učinke, a genetska predispozicija, životne navike i prisutnost takvih tvari u radnom okolišu mogu uvelike pridonijeti pokretanju štetnih procesa u ljudskom tijelu poput inicijacije, promocije i progresije koje dovode do nastanka neoplastičnih bolesti s ozbiljnim posljedicama na ljudsko zdravlje. Mutageneza i karcinogeneza najčešće se razmatraju zajedno kao potencijalni rizici za ljudsko zdravlje. Za otkrivanje ranih učinaka karcinogena na profesionalno izloženim osobama rabe se citogenetičke metode biomonitoringa, koje uključuju utvrđivanje mikroskopski vidljivih oštećenja kromosoma u somatskim stanicama u uvjetima *in vitro*. Povećani broj kromosomskih oštećenja može služiti kao indikator izloženosti genotoksičnim agensima i upućivati na potencijalni rizik od pojave raka na razini pojedine izložene skupine. Brojna istraživanja dokazala su da se kromosomske nepravilnosti mogu dovesti u vezu s pojavom i razvojem raka. Poznato je da su displazije i premaligna stanja često praćena kromosomskom nestabilnosti i da su specifične kromosomske aberacije povezane s pojedinim tipovima raka. Kromosomske aberacije u limfocitima periferne krvi najosjetljiviji su biomarker za procjenu rizika od pojave raka, s obzirom na to da odražavaju rane biološke učinke genotoksičnih karcinogena na nasljedni materijal te individualnu osjetljivost prema nastanku raka. Kako bi spriječili štetne učinke karcinogenih i mutagenih tvari na ljudsko zdravlje, potrebno je utvrditi njihovu prisutnost na radnom mjestu i poduzeti odgovarajuće mjere zaštite. Prevencija i rano otkrivanje tih tvari najvažniji su faktori u smanjivanju učestalosti i posljedica njihovih učinaka. Djelovanja vanjskih faktora koja uzrokuju promjenu u genomu nazivaju se mutagenost i genotoksičnost. Mutagenost je sposobnost izazivanja mutacija u stanici, dok je genotoksičnost više općeniti pojam koji se odnosi na sve promjene genoma *in vitro* uzrokovane vanjskim faktorima. Karcinogen je tvar koja uzrokuje ili se smatra da uzrokuje rak kod čovjeka ili životinja, a karcinogeneza je proces u kojem dolazi do nastanka raka. Karcinogenost je svojstvo neke tvari da izazove nekontroliranu proliferaciju i metastaziranje. Mutagen je tvar koja može uzrokovati promjenu u genetičkom materijalu stanice (mutaciju). Mutageneza je proces nastajanja mutacije djelovanjem mutagene tvari, dok je mutagenost sposobnost neke tvari da u stanicama živog organizma izazove stalne promjene strukture genetičkog materijala (mutaciju). Mutacije su promjene u molekuli DNA koje nastaju u samoj stanici djelovanjem određenih kemijskih, fizikalnih i bioloških agenasa. To su trajne (ireverzibilne) promjene kao iznenadne nasljedne promjene u genetičkom materijalu (4).

### 1.2.1. METANOL

Toksična, čista, bezbojna tekućina, mirisa po alkoholu, zapaljiv i topljiv u vodi. Reagira s metalima i oksidansima. Koristi se u proizvodnji kemikalija, boja, otapala, lakova, boji za zidove, sastavni je dio antifrizna, formaldehida i octene kiseline, sredstava za čišćenje stakla, u laboratorijima se koristi kod različitih tipova kromatografije i pripreme fiksativa. Metanol se prirodno nalazi u niskim količinama u voću i povrću te u ljudskom tijelu. Izlaganje može prouzročiti glavobolje, zbunjenost, ataksiju, vrtoglavicu, pospanost, mučninu i povraćanje. Pijenje može izazvati smrt. Djeca su osjetljivija zbog manjeg volumena tijela. U slučaju kontakta s metanolom treba ukloniti kontaminiranu odjeću, izapirati područje mlakom vodom sa sapunom 15 minuta i potražiti medicinsku pomoć.

### 1.2.2. OCTENA KISELINA

Opasna, korozivna, zapaljiva bezbojna tekućina, topljiva u vodi i mirisa nalik octu. Reagira s oksidima i burno s amonijevim nitratom. Koristi se u proizvodnji tekstila, kod razvijanja fotografije, pesticida, plastike, gume, u laboratoriju tijekom *in situ* hibridizacije, tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti i kod pripreme fiksativa. U okoliš ulazi s ispušnim motornim plinovima i iz tvornica sagorjevanjem plastike. U octu koji svakodnevno koristimo u kućanstvu ima ga jako malo i bezopasan je za ljude. Izlaganje može prouzročiti glavobolju, stezanje u prsima, iritaciju očiju, kontakt s kožom izaziva opekotine, ako se probavi gorenje usta i grla, bol u stomaku i dijareju. U slučaju kontakta s octenom kiselinom potrebno je ukloniti kontaminiranu odjeću, izapirati područje mlakom vodom sa sapunom 15 minuta i potražiti medicinsku pomoć.

### 1.2.3. KSILOL

Toksična, bezbojna, zapaljiva tekućina, slatkastog mirisa. Reagira s jakim kiselinama kao što su octena i dušična kiselina te burno reagira s oksidansima kao što su brom, klor i fluor. Koristi se kao otapalo u bojama i tintama, kemijski je posrednik u proizvodnji drugih industrijskih kemikalija, guma, plastike i kože, u laboratoriju se koristi za čišćenje preparata.

Prirodno se nalazi u sirovoj nafti. Komercijalni ksilol dobivamo iz nafte. U okoliš dospijeva s ispušnim motornim plinovima, izlivanjem nafte i benzina te iz cigaretnog dima. Izlaganje može prouzročiti iritaciju nosa, grla i pluća, vrtoglavicu, glavobolju, kod većih doza probleme sa srcem, jetrom, bubrezima i na kraju komu. U slučaju kontakta sa ksilolom ukloniti kontaminiranu odjeću, izapirati područje mlakom vodom sa sapunom 15 minuta i potražiti medicinsku pomoć.

## **2. HIPOTEZA**

Pretpostavka ovog istraživanja je da kemikalije (poput metanola, ksilola i ledene octene kiseline) imaju velik genotoksikološki učinak na kromosomske aberacije.

### 3. CILJEVI

Ciljevi ovoga istraživanja su:

- ispitati koliki je genotoksikološki učinak metanola na nastanak *in vitro* kromosomskih aberacija u limfocitima periferne krvi,
- ispitati koliki je genotoksikološki učinak ksilola na nastanak *in vitro* kromosomskih aberacija u limfocitima periferne krvi,
- ispitati koliki je genotoksikološki učinak ledene octene kiseline na nastanak *in vitro* kromosomskih aberacija u limfocitima periferne krvi,
- odrediti u limfocitima periferne krvi citotoksičan učinak različitih koncentracija metanola,
- odrediti u limfocitima periferne krvi citotoksičan učinak različitih koncentracija ksilola,
- odrediti u limfocitima periferne krvi citotoksičan učinak različitih koncentracija ledene octene kiseline.

## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Kohortna studija. Utvrđuje se izloženost mogućem uzroku pojave (da: ispitna skupina, ne: kontrolna skupina) i skupine se prate kroz neko vrijeme, određuje se incidencija nastanka kromosomskih aberacija u skupinama.

### 4.2. Ispitanici

Ispitanice su bile osobe mlađe od 40 godina, studentice treće godine studija Medicinsko laboratorijske dijagnostike pri Medicinskom fakultetu u Osijeku. Kriteriji za uključivanje ispitanika: osobe mlađe od 40 godina, neizloženost kemikalijama, neizloženost ionizirajućem zračenju. Kriteriji za isključivanje: stariji od 40 godina, izloženost zračenju tijekom posljednjih 6 mjeseci, korištenje antibiotika unazad mjesec dana. U istraživanju su sudjelovala tri ispitanika. Svaki je ispitanik sam sebi služio kao kontrola. Kod svakog ispitanika su testirane tri kemikalije u tri različite koncentracije.

### 4.3. Materijali i metode

#### 4.3.1. Materijali

- sterilni kabinet s vertikalnim strujanjem zraka (Uniflow aura-VF72 laminar)
- Eppendorf pipete od 200  $\mu$ l i 1000  $\mu$ l
- sterilni filter nastavci za pipete od 200  $\mu$ l i 1000  $\mu$ l
- inkubator s CO<sub>2</sub> (Heraeus)
- centrifuga (Eppendorf 5804)
- vaga (Mettler Toledo)
- digestor
- vakuum sisaljka
- vorteks (Vortex Genie 2)
- Pasteur plastične pipete od 3 ml
- predmetna stakla



- fazno kontrastni mikroskop (Olympus CX41)
- Raspršivač metafaza (OptiChrome Euroclone)
- Svjetlosno-fluorescentni mikroskop s kamerom (Zeiss Axioskop2 MOT)
- DPC Controller 1.2.1.108 (Olympus Optical) program za slikanje



Slika 1. Sterilni kabinet s vertikalnim strujanjem zraka (Uniflow aura-VF72 laminar)



Slika 2. Centrifuga (Eppendorf 5804)



Slika 3. Raspršivač metafaza (OptiChrome Euroclone)

#### 4.3.1.1. KSILOL

Korištene su tri koncentracije ksilola 0,1 %, 1 % i 2 %. Za svaku koncentraciju pripremljeno je 1000  $\mu$ l radne otopine.

$$M_r(\text{ksilol}) = 106.6 \text{ g/mol} = 106600 \text{ mg/mmol}$$

Radne otopine

$$C_0 = 0 \% \rightarrow 1000 \mu\text{l HBSS (kontrola)}$$

$$CP1 = 0.1 \% = 0.001 \text{ g/ml} \rightarrow 999 \mu\text{l HBSS} + 1 \mu\text{l ksilena}$$

$$CP2 = 1 \% = 0.01 \text{ g/ml} \rightarrow 990 \mu\text{l HBSS} + 10 \mu\text{l ksilena}$$

$$CP3 = 2 \% = 0.02 \text{ g/ml} \rightarrow 980 \mu\text{l HBSS} + 20 \mu\text{l ksilena}$$

$$V_{\text{konačni}} = 5 \text{ ml}$$

$$V_{\text{početni}} = 2.5 \mu\text{l}$$

$$C_p \times V_p = C_k \times V_k \rightarrow C_k = \frac{C_p \times V_p}{V_k}$$

$$C_{K1} = \frac{C_{P1} \times V_P}{V_K} = \frac{0.001 \frac{g}{ml} \times 2.5 \times 10^{-3}}{5ml} = 0.0000005 \frac{g}{ml} = 0.0005 \frac{mg}{ml}$$

$$C_{K1} = \frac{0.0005 mg/ml}{106600 mg/mmol} = 0.00469 \times 10^{-6} \frac{mmol}{ml} = 0.00469 \mu M = 4.69 nM$$

$$C_{K2} = \frac{C_{P2} \times V_P}{V_K} = \frac{0.01 \frac{g}{ml} \times 2.5 \times 10^{-3}}{5ml} = 0.000005 \frac{g}{ml} = 0.005 \frac{mg}{ml}$$

$$C_{K2} = \frac{0.005 \frac{mg}{ml}}{106600 \frac{mg}{mmol}} = 0.0469 \times 10^{-6} \frac{mmol}{ml} = 0.0469 \mu M = 46.9 nM$$

$$C_{K3} = \frac{C_{P3} \times V_P}{V_K} = \frac{0.02 \frac{g}{ml} \times 2.5 \times 10^{-3}}{5ml} = 0.00001 \frac{g}{ml} = 0.01 \frac{mg}{ml}$$

$$C_{K3} = \frac{0.01 \frac{mg}{ml}}{106600 \frac{mg}{mmol}} = 0.0938 \times 10^{-6} \frac{mmol}{ml} = 0.0938 \mu M = 93.8 nM$$

#### 4.3.1.2. OCTENA KISELINA

Korištene su tri koncentracije ledene octene kiseline, 1 %, 10 % i 20 %. Za svaku koncentraciju pripremljeno je 1000  $\mu$ l radne otopine.

Mr (octena kiselina) = 60.05 g/mol = 60050 mg/mmol

Radne otopine

C<sub>0</sub> = 0% → 1000  $\mu$ l HBSS (kontrola)

CP1 = 1% = 0.01 g/ml → 990  $\mu$ l HBSS + 10  $\mu$ l octene kiseline

CP2 = 10% = 0.1 g/ml → 900  $\mu$ l HBSS + 100  $\mu$ l octene kiseline

CP3 = 20% = 0.2 g/ml → 800  $\mu$ l HBSS + 200  $\mu$ l octene kiseline

V<sub>konačni</sub> = 5 ml

V<sub>početni</sub> = 16  $\mu$ l

$$C_p \times V_p = C_k \times V_k \rightarrow C_k = \frac{C_p \times V_p}{V_k}$$

$$C_{K1} = \frac{C_{P1} \times V_P}{V_K} = \frac{0.01 \frac{g}{ml} \times 16 \times 10^{-3} ml}{5 ml} = 0.000032 \frac{g}{ml} = 0.032 \frac{mg}{ml}$$

$$C_{K1} = \frac{0.032 \frac{mg}{ml}}{60050 \frac{mg}{mmol}} = 5.328 \times 10^{-6} \frac{mmol}{ml} = 5.328 \mu M$$

$$C_{K2} = \frac{C_{P2} \times V_P}{V_K} = \frac{0.1 \frac{g}{ml} \times 16 \times 10^{-3} ml}{5 ml} = 0.00032 \frac{g}{ml} = 0.32 \frac{mg}{ml}$$

$$C_{K2} = \frac{0.32 \frac{mg}{ml}}{60050 \frac{mg}{mmol}} = 5.3288 \times 10^{-6} \frac{mmol}{ml} = 5.3288 \mu M$$

$$C_{K3} = \frac{C_{P2} \times V_P}{V_K} = \frac{0.2 \frac{g}{ml} \times 16 \times 10^{-3} ml}{5 ml} = 0.00064 \frac{g}{ml} = 0.64 \frac{mg}{ml}$$

$$C_{K3} = \frac{0.64 \frac{mg}{ml}}{60050 \frac{mg}{mmol}} = 10.6578 \times 10^{-6} \frac{mmol}{ml} = 10.6578 \mu M$$

#### 4.3.1.3. METANOL

Korištene su tri koncentracije metanola, 1 %, 10 % i 20 %. Za svaku koncentraciju pripremljeno je 1000  $\mu$ l radne otopine.

Mr (metanol) = 32,04 g/mol = 32040 mg/mmol

Radne otopine

C<sub>0</sub> = 0 % → 1000  $\mu$ l HBSS (kontrola)

CP1 = 1 % = 0.01 g/ml → 990  $\mu$ l HBSS + 10  $\mu$ l metanola

CP2 = 10 % = 0.1 g/ml → 900  $\mu$ l HBSS + 100  $\mu$ l metanola

CP3 = 20 % = 0.2 g/ml → 800  $\mu$ l HBSS + 200  $\mu$ l metanola

$V_{\text{konačni}} = 5 \text{ ml}$

$V_{\text{početni}} = 214 \mu\text{l}$

$$C_P \times V_P = C_K \times V_K \rightarrow C_K = \frac{C_P \times V_P}{V_K}$$

$$C_{K1} = \frac{C_{P1} \times V_P}{V_K} = \frac{0.01 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 0.214 \text{ml}}{5 \text{ml}} = 0.000428 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 0.428 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$C_{K1} = \frac{0.428 \text{mg/ml}}{32040 \text{mg/mmol}} = 13.3583 \times 10^{-6} \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} = 13.3583 \mu\text{M}$$

$$C_{K2} = \frac{C_{P2} \times V_P}{V_K} = \frac{0.1 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 214 \text{ml}}{5 \text{ml}} = 0.00428 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 4.28 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$C_{K2} = \frac{4.28 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}}{32040 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}}} = 133.583 \times 10^{-6} \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} = 133.583 \mu\text{M}$$

$$C_{K3} = \frac{C_{P2} \times V_P}{V_K} = \frac{0.2 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 0.214 \text{ml}}{5 \text{ml}} = 0.00856 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 8.56 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$C_{K3} = \frac{8.56 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}}{32040 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}}} = 267.166 \times 10^{-6} \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} = 267.166 \mu\text{M}$$

#### 4.3.2. Kultivacija

Sterilno se u 5 ml medija sobne temperature dodaje 30  $\mu\text{l}$  fitohemaglutinina (PHA) i 60  $\mu\text{l}$  L-glutamina. Zatim se sterilno doda 500  $\mu\text{l}$  krvi (izvađene u epruvetu s Na-heparinom) i inkubira na 37°C u inkubatoru 45 h. Ostatak krvi u epruveti s Na-heparinom odlaže se u kante za infektivni otpad. Nakon 45 h dodaje se kolcemid (10  $\mu\text{g/ml}$ ) i ostavi još 3 h u inkubatoru.

#### 4.3.3. Izrada

Epruvete se izvade iz inkubatora i centrifugiraju 4 minute na 720 g. Odstrani se supernatant i ostavi oko 0,5 ml taloga te vortexira. Dodaje se 5 ml 0,075 M KCl i ostavlja 5 -

10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim se centrifugira 4 minute na 720 g, odbaci supernatant. Dodaje se 5 ml svježe pripremljenog 'fiksativa' (metanol : octena kiselina = 3 : 1), centrifugira 4 minute na 720 g, odbacuje se supernatant. Suspenzija se ispiri fiksativom nekoliko puta sve do dobivanja prozirne otopine.

#### 4.3.4. Priprema preparata

Predmetno se staklo izvadi iz vode i malo ocijedi te na njega baci Pasteurovom pipetom 2 kapi stanične suspenzije. Napravi se minimalno 2 preparata iz svake epruvete. Preparati se suše u OptiChromu na 26°C i 48 % vlažnosti.

#### 4.3.5. Bojanje preparata

Preparati se isperu u fosfatnom puferu (15 sekundi). Zatim se uranjaju u 2 % otopinu Giemse u fosfatnom puferu i bojaju 5 minuta pa isperu u destiliranoj vodi (15 sekundi). Ostavljaju se na zraku u vertikalnom položaju dok se ne osuše.

### 4.4. ANALIZA PREPARATA, BILJEŽENJE I ČUVANJE PODATAKA

Analizira se 100 metafaza svake koncentracije kemikalije kod svakog ispitanika pod najvećim povećanjem mikroskopa (1000 x). Kod svake metafaze s pronađenim kromosomskim aberacijama zapisuju se koordinate i slika se *DPC Controller* programom.

### 4.5. STATISTIČKE METODE

Dobiveni rezultati obrađeni su primjenom deskriptivne statistike i studentovim t-testom. Numerički podatci dani su kao srednja vrijednost i standardna devijacija te medijan s 95 % rasponom pouzdanosti. Sve su *P* vrijednosti dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha < 0,05$ . Statistička obrada podataka napravljena je u programskom paketu Statistica 12,0 (StatSoft Inc. TULSA, OK, USA).

## 5. REZULTATI

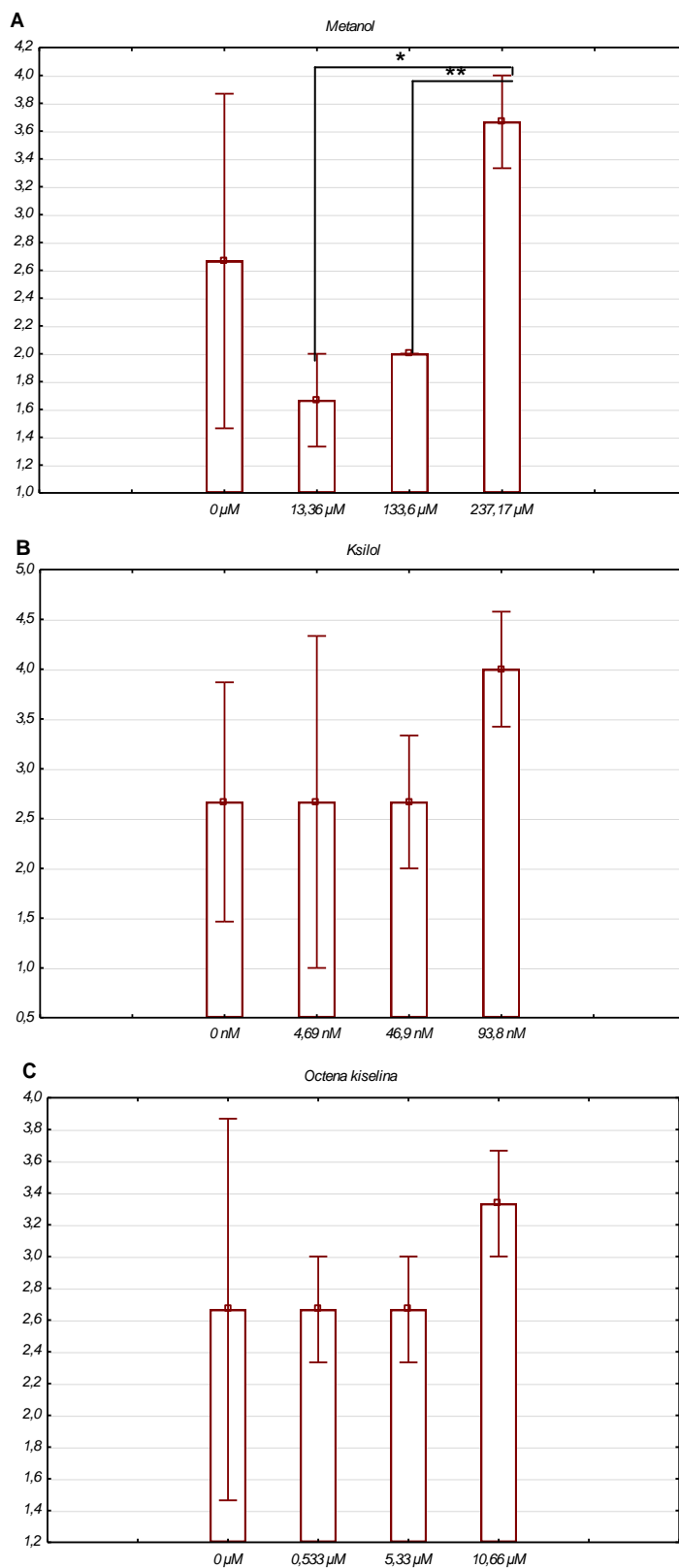
### 5.1. Broj i vrsta kromosomskih aberacija

Rezultati istraživanja provedenog na tri ispitanika s tri kemikalije u različitim koncentracijama prikazani su u Tablici 1. Statistička značajnost izračunata je za svaku koncentraciju u odnosu na kontrolu.

Tablica 1. Kromosomske aberacije različitih koncentracija metanola, ksilola i octene kiseline (t-test).

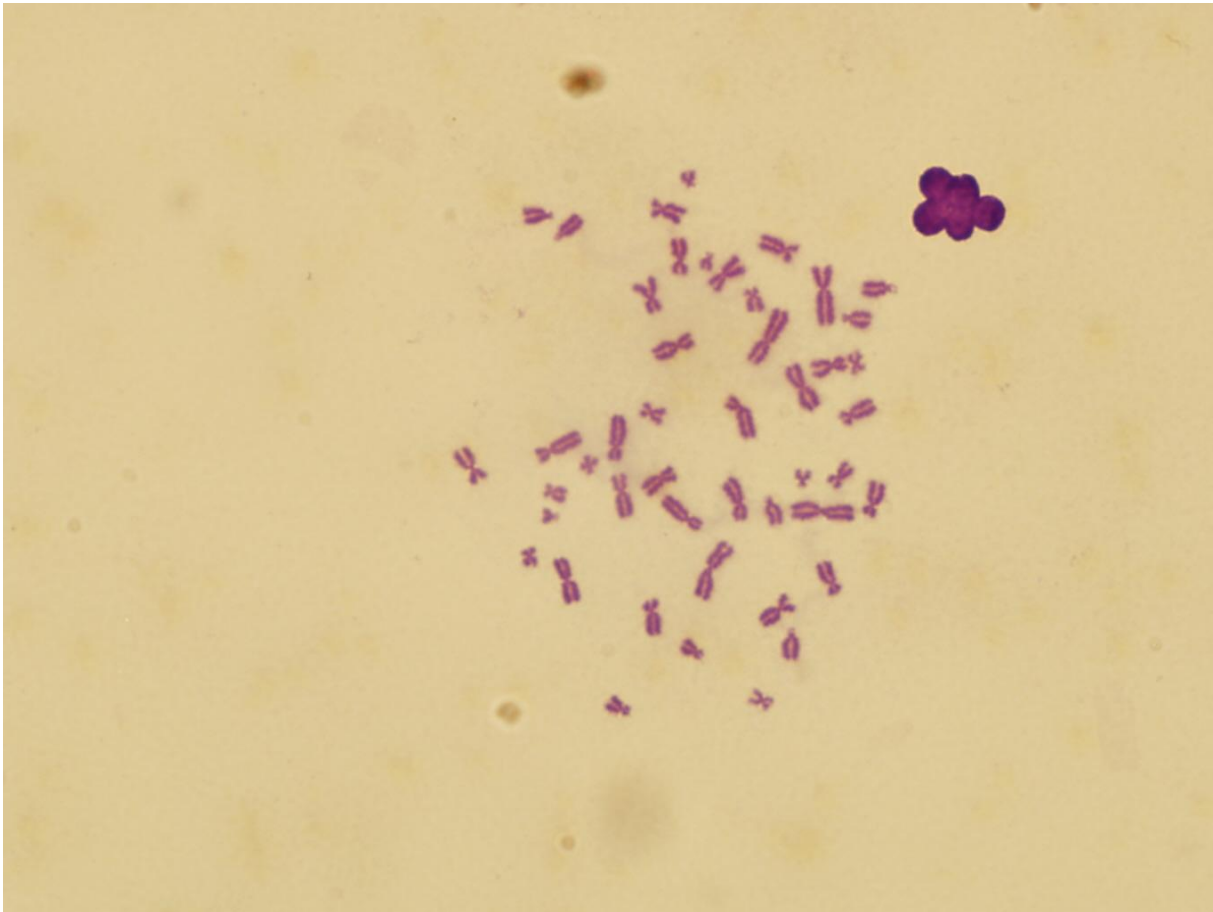
Kemikalija	Koncentracija	Srednja vrijednost $\pm$ SD	Medijan	95 % raspon	<i>P</i> vrijednost
Metanol	0 $\mu$ M	2,68 $\pm$ 2,07	2,00	1,09 - 13,07	-
	13,36 $\mu$ M	1,67 $\pm$ 0,58	2,00	0,30 - 3,63	0,468
	133,58 $\mu$ M	2,00 $\pm$ 0,00	2,00	0,00 - 0,00	0,609
	237,17 $\mu$ M	3,67 $\pm$ 0,58	4,00	0,30 - 3,63	0,468
Ksilol	0 nM	2,67 $\pm$ 2,09	2,00	1,08 - 13,08	-
	4,69 nM	2,67 $\pm$ 2,89	1,00	1,50 - 18,14	1,00
	46,9 nM	2,67 $\pm$ 1,15	2,00	0,60 - 7,26	1,00
	93,8 nM	4,00 $\pm$ 1,00	4,00	0,52 - 6,28	0,374
Octena kiselina	0 $\mu$ M	2,67 $\pm$ 2,08	2,00	1,07 - 13,09	-
	0,533 $\mu$ M	2,67 $\pm$ 0,58	3,00	0,30 - 3,63	1,00
	5,33 $\mu$ M	2,67 $\pm$ 0,58	3,00	0,30 - 3,63	1,00
	10,66 $\mu$ M	3,33 $\pm$ 0,58	3,00	0,30 - 3,63	0,621



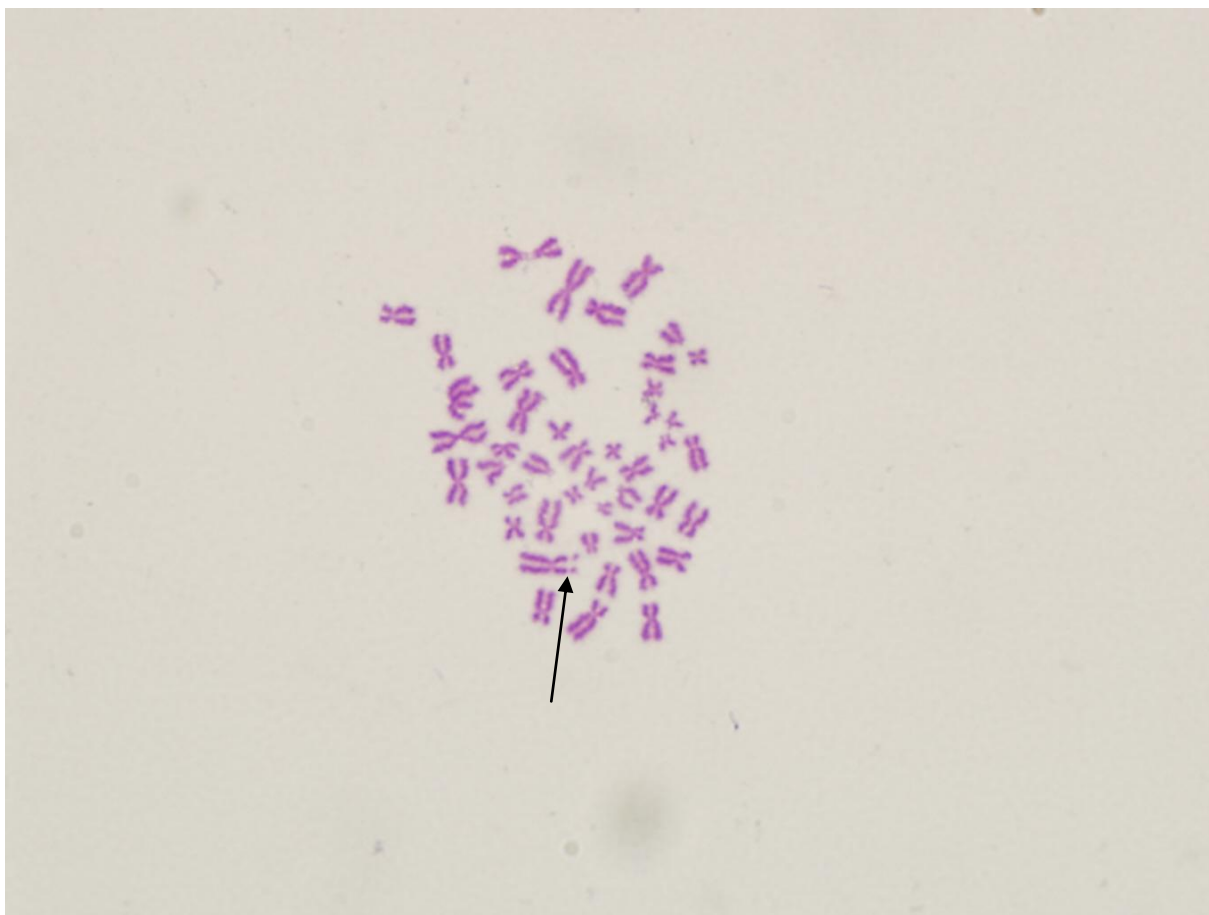


Slika 4. Srednja vrijednost broja kromosomskih aberacija (KA) sa standardnom greškom pri različitim koncentracijama kemikalija. Studentov t-test  $*P = 0,013$  i  $**P = 0,007$ .

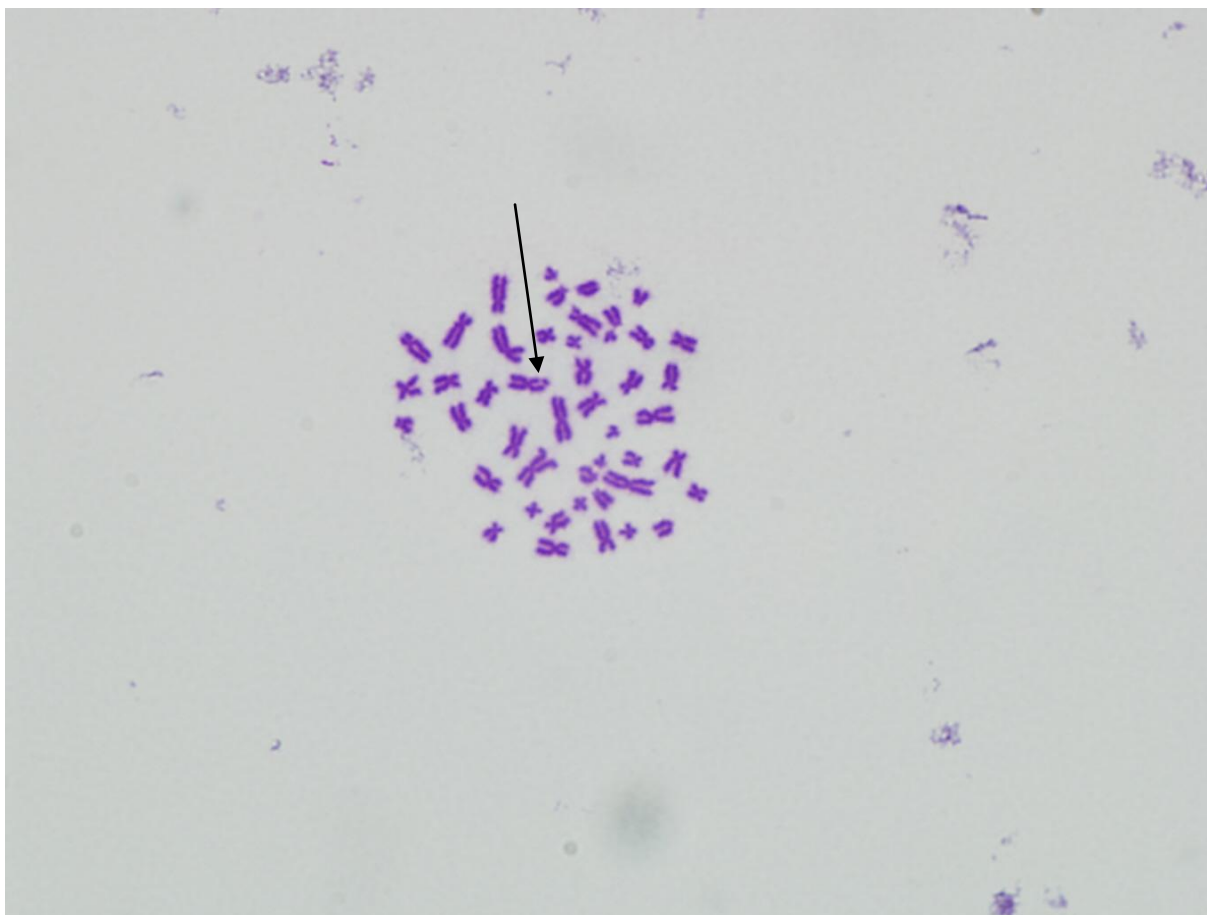
Iz slike 4 vidljivo je da broj KA raste s najvećom koncentracijom pojedine kemikalije. Tako postoji značajna statistička razlika u porastu broja KA između koncentracije metanola 13,36  $\mu\text{M}$  i 237,17  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,013$ ) (Slika 1A), kao i između koncentracija 133,6  $\mu\text{M}$  i 237,17  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,007$ ) (Slika 1A) .



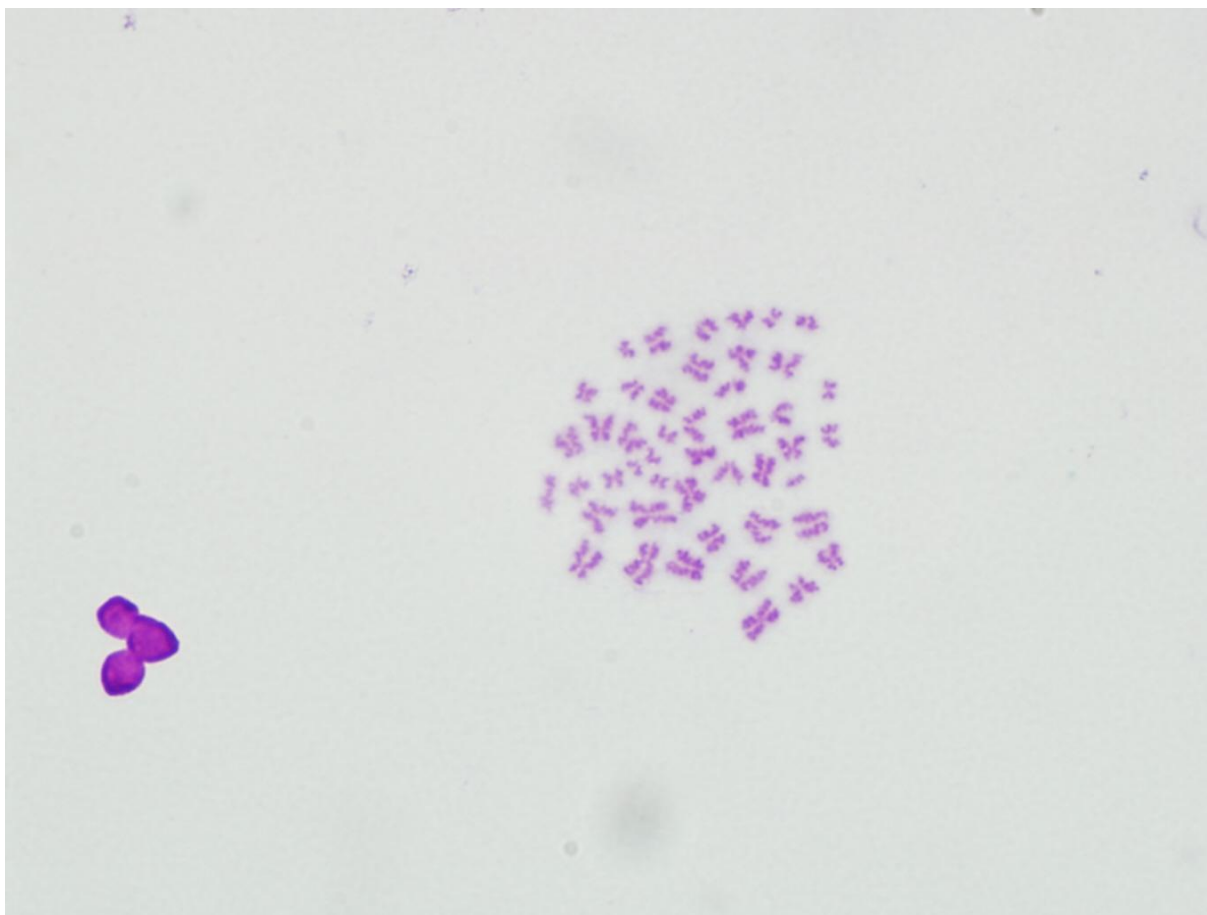
Slika 5. Primjer metafaze bez prisutnih kromosomskih aberacija, preparat iz stanične kulture kontrola, ispitanik broj 1.



Slika 6. Kromosomski lom, preparat iz stanične kulture s octenom kiselinom koncentracije 10,6578  $\mu\text{M}$ , ispitanik broj 3.



Slika 7. Kromatidni lom, preparat iz stanične kulture s octenom kiselinom koncentracije 0,5328  $\mu\text{M}$ , ispitanik 1.



Slika 8. Posljedica velike koncentracije kemikalije, preparat iz stanične kulture metanola s koncentracijom 267,166  $\mu\text{M}$ , ispitanik 2.

## 5.2. Mitotički indeks ispitivanih kemikalija

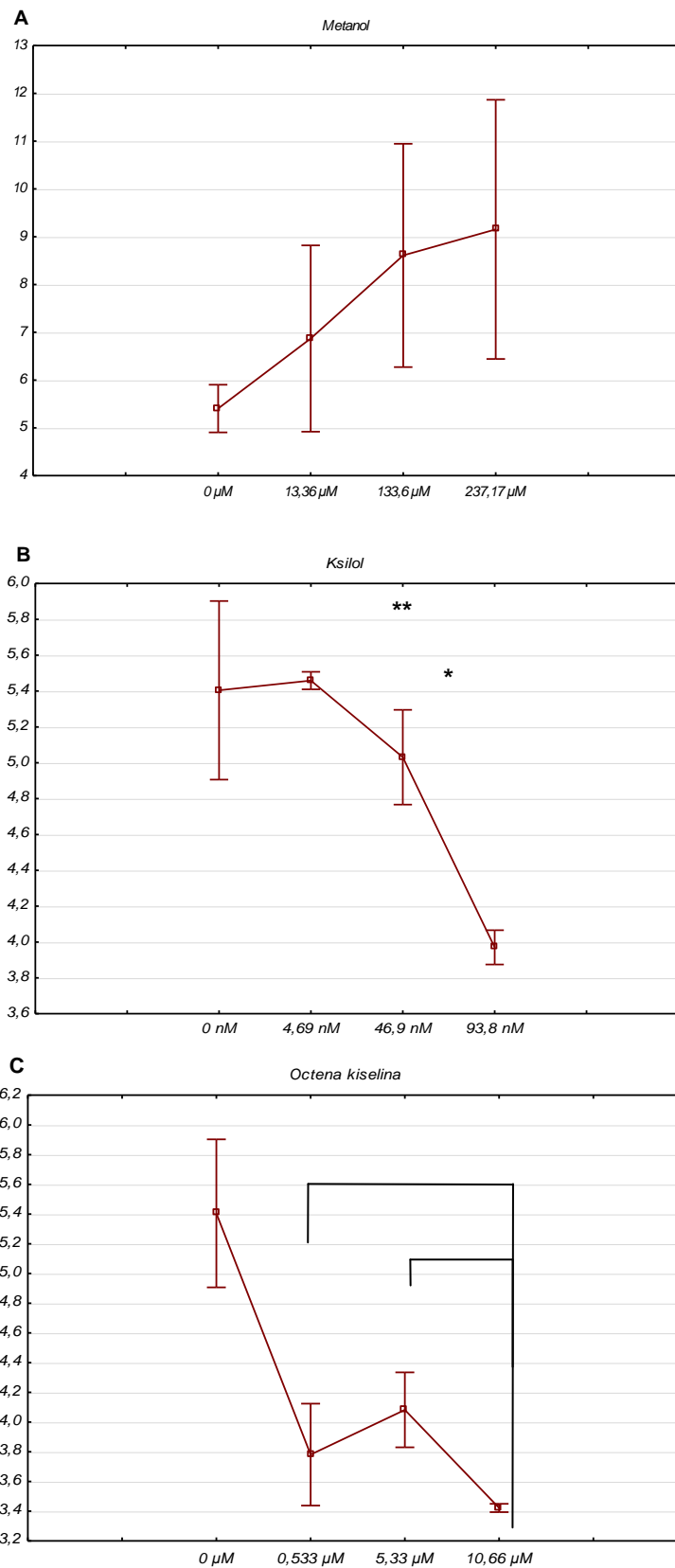
Srednje vrijednosti mitotičkih indeksa sa standardnom devijacijom kod različitih koncentracija kemikalija dane su u Tablici 2. Statistička značajnost izračunata je za svaku koncentraciju u odnosu na kontrolu.

Tablica 2. Mitotički indeks različitih koncentracija metanola, ksilola i octene kiseline u tri ispitanika.

Kemikalija	Koncentracija	Srednja vrijednost $\pm$ SD	Medijan	95 % raspon	<i>P</i> vrijednost
Metanol	0 $\mu$ M	5,41 $\pm$ 0,87	5,89	0,46 - 5,41	-
	13,36 $\mu$ M	6,87 $\pm$ 3,38	5,14	1,76 - 21,22	0,507
	133,58 $\mu$ M	8,61 $\pm$ 4,05	9,74	2,11 - 25,43	0,251
	237,17 $\mu$ M	9,15 $\pm$ 4,70	11,26	2,45 - 25,52	0,245
Ksilol	0 nM	5,40 $\pm$ 0,86	5,88	0,45 - 5,42	-
	4,69 nM	5,46 $\pm$ 0,08	5,43	0,04 - 0,53	0,919
	46,9 nM	5,03 $\pm$ 0,46	5,03	0,25 - 2,88	0,544
	93,8 nM	3,97 $\pm$ 0,17	3,94	0,09 - 1,04	0,047*
Octena kiselina	0 $\mu$ M	5,39 $\pm$ 0,85	5,89	0,44 - 5,43	-
	0,533 $\mu$ M	3,78 $\pm$ 0,59	3,63	0,31 - 3,74	0,055
	5,33 $\mu$ M	4,08 $\pm$ 0,44	3,97	0,23 - 2,74	0,077
	10,66 $\mu$ M	3,40 $\pm$ 0,05	3,40	0,03 - 0,30	0,016*

\*t-test, statistički značajna razlika  $P < 0,05$

Na slici 9 grafički je prikazan pad mitotičkog indeksa s porastom koncentracija ksilola i octene kiseline, dok mitotički indeks raste s porastom koncentracije metanola. Postoji statistički značajna razlika između pojedinih koncentracija kemikalija. Statistički značajna razlika u padu mitotičkog indeksa uočena je između koncentracije ksilola 4,69 nM i 93,8 nM ( $P < 0,001$ ) kao i pri koncentracijama od 46,9 nM i 93,8 nM ( $P = 0,019$ ).



Slika 9. Srednja vrijednost mitotičkog indeksa (MI) sa standardnom greškom pri različitim koncentracijama kemikalija. Studentov t-test \* $P = 0,047$ ; \*\* $P < 0,001$ .

## 6. RASPRAVA

U citogenetičkom nadzoru populacija izloženih genotoksičnim agensima vrlo je važno utvrđivanje učestalosti strukturnih aberacija u limfocitima periferne krvi (3,6). Tako između koncentracija metanola 13,36  $\mu\text{M}$  i 237,17  $\mu\text{M}$  uočljiv je porast broja kromosomskih aberacija  $6,87 \pm 3,8$  naprema  $9,15 \pm 4,70$  ( $P = 0,013$ ) kao i među koncentracijama metanola od 133,6  $\mu\text{M}$  i 237,17  $\mu\text{M}$  gdje je srednji broj aberacija  $8,61 \pm 4,05$  i  $9,15 \pm 4,70$  ( $P = 0,007$ ).

Mitotički indeks je važan pokazatelj oštećenja stanice jer pokazuje kakav je ciklus stanice, odnosno omjer stanica u diobi i onih koje se ne dijele. Na temelju mitotičkog indeksa vidimo da povećanjem koncentracija kemikalija on opada što je statistički značajno za najveće koncentracije ksilola i octene kiseline (Tablica 2). Mitotički indeks pokazuje utjecaj kemikalija na G2 fazu staničnog ciklusa. Iz naših rezultata možemo zaključiti da ksilol i octena kiselina imaju antiproliferativni utjecaj povezan s genotoksičnošću, dok za metanol ne možemo to zaključiti jer rezultati nisu statistički značajni. Treba imati na umu da je utjecaj kemikalija istraživan na limfocitima periferne krvi, dok utjecaj kemikalija na neku drugu vrstu stanica može biti drugačiji te mogu potaknuti njihovu diobu. Također, moguće je da je zbog prevelikog oštećenja stanica i velikog broja kromatidnih izmjena, ulazak stanica u mitozu pod utjecajem kemikalija puno sporiji te stoga imamo manji broj stanica u mitozu.

Usporedno s drugim istraživanjem u kojem su primjenjivali ekstrakt metanola na štakorima i u kojem se pokazala statistički značajna razlika mitotičkog indeksa u odnosu na kontrolu, u našem istraživanju nije došlo do statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne uzorke. Pretpostavlja se kako je glavni čimbenik statističke razlike duže izlaganje životinja ekstraktu metanola (od 45 do 75 dana), nego u našem istraživanju (3 sata) (8).

Istraživanjem provedenim na štakorima i miševima koji su nosili embrije i koji su tretirani ekstraktom metanola do devetnaestog tjedna gestacije uočena je statistički značajna razlika kod povećanja kromosomskih aberacija u odnosu na kontrolu, dok u našem istraživanju nije bilo povećanja broja kromosomskih aberacija u odnosu na kontrolu. Dobiveni rezultati nakon tri sata tretiranja metanolom nisu pokazali statistički značajnu razliku u ovom istraživanju, a može se zaključiti da nakon dužeg vremena izlaganja životinja ekstraktu metanola dolazi do statistički značajne razlike u porastu broja kromosomskih aberacija (9).



Istraživanja rađena na radnicima u rafinerijama koji su izloženi velikim količinama ksilola pokazala su statistički značajne razlike u povećanju broja kromosomskih aberacija u odnosu na kontrolu. U našem istraživanju nismo pronašli statistički značajne razlike u povećanju broja kromosomskih aberacija, vjerojatno zbog kratkotrajne izloženosti limfocita periferne krvi ksilolu u *in vitro* uvjetima (10).

Mnogobrojna istraživanja utjecaja ksilola diljem svijeta na radnicima benzinskih postaja pokazala su da ksilol uzrokuje kromosomske aberacije kao klastogen. Također se pokazalo da dobra zaštita radnika na takvim poslovima pridonosi smanjenju broja kromosomskih aberacija što ne dovodi do prevelike statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika (11).

Testom kromosomskih aberacija istraživana je klastogeni utjecaj octene kiseline u odnosu na pH medija na jajnim stanicama kineskog hrčka. Pokazano je da octena kiselina ne izaziva povećanje broja kromosomskih aberacija pri pH mediju koji je blizu neutralnog (6), dok pri nižem pH (5,7) dolazi do povećanja broja kromosomskih aberacija u *in vitro* kulturi stanica sisavaca. U ovom istraživanju korišten je F12 medij koji sadrži mnogo natrij hidrogenkarbonata koji može neutralizirati velike količine octene kiseline sve do koncentracije 25 mM. Kako su u ovom istraživanju testirane puno manje koncentracije octene kiseline (do 10,66  $\mu$ M), nisu dobiveni statistički značajni rezultati u porastu broja kromosomskih aberacija u odnosu na kontrolu ( $P = 0,621$ ). Korištenjem većih koncentracija octene kiseline može doći do povećanja kromosomskih aberacija, ali tada bi to bio lažno pozitivan rezultat jer bi došlo do narušavanja normalne fiziologije stanica u kulturi (12). Morita i suradnici (12) smatraju da kromosomske aberacije uzrokovane octenom kiselinom nastaju zbog kiselosti medija, a ne zbog klastogenog utjecaja octene kiseline.

Ovim istraživanjem smo potvrdili hipotezu jer smo pokazali da kemikalije utječu na pojavu kromosomskih aberacija i na smanjenje mitotičkog indeksa. Danas smo izloženi različitim kemikalijama u svim aspektima našeg života i vrlo je bitno znati u kojoj nam mjeri to može naškoditi, a to možemo provjeriti upravo pomoću testa na kromosomske aberacije (3,5,7).

## 7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Postoji značajna statistička razlika u porastu broja KA između koncentracije metanola 13,36  $\mu\text{M}$  i 237,17  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,013$ ).
- Vidi se porast kromosomskih aberacija između različitih koncentracija ksilola i octene kiseline, ali statistički nije značajan.
- Mitotički indeks se kod ksilola i octene kiseline smanjuje s povećanjem koncentracije, dok se kod metanola povećava.
- Iz naših rezultata možemo zaključiti da ksilol i octena kiselina imaju antiproliferativni utjecaj povezan s genotoksičnošću, dok za metanol ne možemo to zaključiti jer rezultati nisu statistički značajni.
- Statistički značajna razlika u padu mitotičkog indeksa uočena je između koncentracije ksilola 4,69 nM i 93,8 nM ( $P < 0,001$ ) kao i između koncentracije ksilola 46,9 nM i 93,8 nM ( $P = 0,019$ ).

## 8. SAŽETAK

Test na kromosomske aberacije nam pomaže identificirati strukturalna kromosomska oštećenja na uzgojenim stanicama. Identifikacijom kromosomskih oštećenja može se procijeniti štetnost kemikalije ili zračenja na ljudski organizam.

Cilj istraživanja bio je ispitati genotoksikološki i citotoksični učinak metanola, ksilola i octene kiseline na nastanak *in vitro* kromosomskih aberacija u limfocitima periferne krvi.

Ispitanici su osobe mlađe od 40 godina koje ne rade s kemikalijama niti u zoni zračenja. Svaki ispitanik je sam sebi služio kao kontrola.

Metoda testa na kromosomske aberacije zasniva se na 45-satnom uzgoju limfocita iz periferne krvi u hranjivom mediju u prisutnosti fitohemaglutinina i L-glutamina i analizi metafaza svake koncentracije kemikalije kod svakog ispitanika. Testirane su tri koncentracije od svake kemikalije i kontrola.

Iz rezultata je vidljivo da broj kromosomskih aberacija raste s najvećom koncentracijom pojedine kemikalije. Statistički značajnu razliku smo dobili između koncentracija ksilola i octene kiseline ( $P < 0,05$ ).

Ovim istraživanjem možemo potvrditi hipotezu jer smo pokazali da kemikalije utječu na pojavu kromosomskih aberacija i na smanjenje mitotičkog indeksa.

## 9. SUMMARY

The chromosome aberration test method is used to identify structural damage to the chromosome or to other cultivated cells. By identifying the damage done to a chromosome one can assess the damage potential of a certain chemical substance or radiation.

The purpose of this research was to test the genotoxicological and cytotoxic effect of methanol, xylol and acetic acid on the creation of “in vitro“ chromosome aberrations in lymphocytes of peripheral blood.

Test subjects were people aged up to 40 and who do not handle chemicals nor are in contact with radiation. Each test subject served as his own test reference.

This test method is based on a 45 hour lymphocyte cultivation in a nutritious medium in the presence of phytohaemagglutinin and L-glutamine and a metaphase analysis of every chemical concentration in every test subject. Three different chemical concentrations of each chemical were tested and a control test was done.

Given the results one can conclude that the number of chromosome aberrations increases when the concentration of a certain chemical rises. Statistically, a substantial difference has been observed at different xylol and acetic acid concentration ( $P < 0,05$ ).

This research proves that the hypothesis is correct because it has shown that certain chemicals influence the creation of chromosome aberrations, as well as the decrease of the mitotic index.

## 10. LITERATURA

1. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS  
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/50108781.pdf>  
Datum pristupa: 10.8.2015.
2. Dhawn A, Bajpayee MB. Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols. New York: Humana press; 2013:165-178.
3. Garaj-Vrhovac V. Karcinogenost i mutageneza: analiza somatskih mutacija. Arh Hig Rada Toksikol 2000; 51: 115–12.
4. Parry JM, Parry EM. Genetic Toxicology: Principles and Methods. London: Humana Press; 2011:305-334.
5. Suspiro A, Prista J. Biomarkers of occupational exposure do anticancer agents: A minireview. Toxikol. Lett. 2011;207:42-52.
6. Kopjar N, Želježić D, Kašuba V, Rozgaj R. 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. Arh Hig Rada Toksikol 2010;61:121-146.
7. Lazutka JR, Lekevicius R, Dedonyte V, Maciuleviciute-Gervers L, Mierauskiene J, Rudaitiene S, Slapsyte S. Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in Lithuanian populations: effects of occupational and environmental exposures. Toxikol. Lett. 1998;445:225-239.
8. Al-Joubori MA , Zaidan HK , Al Saadi AH. Evaluation of Chromosome Aberrations and Mitotic Index in Alloxan-Induced Diabetic Male Rats Treated with the Mixture of Plants Extracts Mixture IASJ 2014;5:977-1719.
9. Abdou HS, Salah SH, El Raouf AA, Abdel-Rahim EA. Chromosomal aberrations and nucleic acids systems affected by some Egyptian medicinal plants used in treating female pregnant diabetic rats AJMB 2011;1:26-32.
10. Roma-Torres J, Teixeira JP, Silva S, Laffon B, Cunha LM, Méndez J, Mayan O. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. Mutat res. 2006;604:19-27.
11. Rekhadevi PV, Mahboob M, Rahman MF, Grover P. Determination of Genetic Damage and Urinary Metabolites in Fuel Filling Station Attendants. Environ mol mutagen. 2011;52:310-318.

12. Morita T, Takeda K, Okumura K., Evaluation of clastogenicity of formic acid, acetic acid and lactic acid on cultured mammalian cells. *Mutat Res.* 1990;240:195-202.

## 11. ŽIVOTOPIS

KRISTINA VRBANČIĆ

Datum i mjesto rođenja:

- 06.10.1992., Slavonski Brod

Obrazovanje:

- 2007.-2012. Gimnazija Matija Mesić Slavonski Brod
- 2012.-2015. Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

## **12. PRILOZI**

1. Informirani pristanak za sudjelovanje
2. Obavijest za ispitanika



## INFORMIRANI PRISTANAK ZA SUDJELOVANJE

Potvrđujem da sam dana \_\_\_\_\_, u Osijeku, pročitala ovu obavijest za gore navedeno znanstveno istraživanje te sam imala priliku postavljati pitanja. Razumijem da je moje sudjelovanje dobrovoljno te se mogu povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica po zdravstvenom ili pravnom pitanju.

Želim sudjelovati u navedenom znanstvenom istraživanju.

Ime i prezime ispitanika:

Ime i prezime (tiskanim slovima): \_\_\_\_\_

Potpis: \_\_\_\_\_

Osoba koja je vodila postupak obavijesti za ispitanika i suglasnost za sudjelovanje:

Potpis: \_\_\_\_\_

Ime i prezime (tiskanim slovima): \_\_\_\_\_

## OBAVIJEST ZA ISPITANIKU

### Ispitivanje genotoksikološkog utjecaja kemikalija na kromosomske aberacije

Znanstveno istraživanje u Laboratoriju za medicinsku genetiku  
Medicinskog fakulteta u Osijeku

Zamoljeni ste za sudjelovanje u istraživanju kojim ćemo pokušati utvrditi utjecaj metanola, ksilola i octene kiseline na kromosomske aberacije u limfocitima periferne krvi. Ova obavijest će Vam pružiti podatke čija svrha je pomoći Vam odlučiti želite li sudjelovati u ovom znanstvenom istraživanju. Prije nego što odlučite, želimo da shvatite zašto se to istraživanje provodi i što ono uključuje. Zato Vas molimo da pažljivo pročitate ovu obavijest.

Mnogi fizički, kemijski i biološki faktori koji se nalaze u životnom i radnom okolišu imaju karcinogene i mutagene učinke, ali genetska predispozicija, životne navike i prisutnost takvih tvari u radnom okolišu mogu uvelike pridonijeti pokretanju štetnih procesa u ljudskom tijelu poput inicijacije, promocije i progresije koje dovode do nastanka neoplastičnih bolesti s ozbiljnim posljedicama na ljudsko zdravlje. Izloženost karcinogenim i mutagenim tvarima može dovesti do oštećenja stanice i do procesa koji mogu rezultirati malignom transformacijom te potencijalno neoplastičnim rastom i razvojem raka. Kako bi spriječili štetne učinke karcinogenih i mutagenih tvari na ljudsko zdravlje, potrebno je utvrditi njihovu prisutnost na radnom mjestu i poduzeti odgovarajuće mjere zaštite. Prevencija i rano otkrivanje tih tvari najvažniji su faktori u smanjivanju učestalosti i posljedica njihovih učinaka.

U citogenetičkom nadzoru populacija izloženih genotoksičnim agensima vrlo je važno utvrđivanje učestalosti strukturnih aberacija u limfocitima periferne krvi. Radi se o važnoj citogenetičkoj metodi koja se primjenjuje u nadzoru profesionalno izloženih populacija mutagenim ili kancerogenim kemikalijama. Indirektan je pokazatelj razine oštećenja prisutnih u DNA prije njenog udvostručavanja. Kratkotrajno izlaganje pojedinoj kemikaliji se ne može odrediti, no dugotrajno izlaganje malim dozama ovih kemikalija ima velike posljedice na genetički materijal stanica.

Bit ćete zamoljeni za uzorke venske krvi koji će biti izvađen uz Vaše dopuštenje od strane kvalificiranog medicinskog osoblja. Na uzorku krvi neće pisati vaše ime, već šifra koja omogućava Vašu potpunu osobnu zaštitu tijekom istraživanja. Svi uključeni istraživači obvezuju se na potpunu zaštitu Vaših osobnih podataka, te se Vaši osobni podaci neće pojavljivati niti u jednom znanstveno-istraživačkom dokumentu niti na bilo koji način biti dostupni ili objavljeni pod Vašim imenom. Jedini rizik kojemu Vas izlažemo je neugodnost pri vađenju krvi.

Vaša odluka o sudjelovanju u ovom istraživanju je dobrovoljna i možete se slobodno i bez ikakvih posljedica povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga.

Ispitivanje je predloženo Etičkom povjerenstvu za istraživanja Medicinskog fakulteta Osijek koji je nakon uvida u dokumentaciju odobrilo istraživanje. Ispitivanje se provodi u skladu sa svim primjenjivim smjernicama, čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju, uključujući *Osnove dobre kliničke prakse i Helsinšku deklaraciju*.

Hvala što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili sudjelovanje u ovom znanstvenom istraživanju.