

# In vitro mikronukleus test u procjeni genotoksičnosti ksilena, metanola i ledene octene kiseline

---

**Feketija, Vedrana**

**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:152:780176>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Vedrana Feketija**

***IN VITRO* MIKRONUKLEUS TEST U  
PROCJENI GENOTOKSIČNOSTI  
KSILOLA, METANOLA I LEDENE  
OCTENE KISELINE**

**Završni rad**

**Osijek, 2015.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Vedrana Feketija**

***IN VITRO* MIKRONUKLEUS TEST U  
PROCJENI GENOTOKSIČNOSTI  
KSILOLA, METANOLA I LEDENE  
OCTENE KISELINE**

**Završni rad**

**Osijek, 2015.**

Rad je napravljen u Laboratoriju za medicinsku genetiku pri Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentorica rada: doc.dr.sc. Jasenka Wagner

Rad ima 34 lista, 2 tablice i 13 slika.

Zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Jasenki Wagner na pomoći i sugestijama tijekom istraživanja i izrade završnog rada te Ivani Škrlec i Saneli Štibi na iskazanoj potpori, strpljenju i korisnim savjetima tijekom istraživanja i izrade završnog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji, posebno roditeljima na potpori, odricanju i razumijevanju tijekom studiranja.

# SADRŽAJ

<b>1.UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1.KEMIKALIJE .....	1
1.2.MIKRONUKLEUS TEST .....	2
1.2.1.Vrste mikronukleus testa .....	3
1.2.2 Mikronukleusi .....	4
1.2.3 Nastanak mikronukleusa .....	4
1.2.4. Normalne i granične vrijednosti mikronukleus testa.....	5
1.2.5. Primjena mikronukleus testa u biološkom nadzoru .....	5
<b>2.HIPOTEZA.....</b>	<b>7</b>
<b>3.CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>8</b>
<b>4.ISPITANICI I METODE .....</b>	<b>9</b>
4.1.USTROJ STUDIJE .....	9
4.2.ISPITANICI .....	9
4.3. METODE .....	9
4.3.1. Priprema kemikalija .....	10
4.3.1.1. Ksilol .....	10
4.3.1.2. Metanol.....	12
4.3.1.3. Ledena octena kiselina .....	13
4.3.2. Kultivacija .....	14
4.3.3. Izrada.....	14
4.3.4. Priprema preparata .....	14
4.3.5 Analiza preparata.....	14
4.4.STATISTIČKE METODE .....	16
<b>5.REZULTATI .....</b>	<b>17</b>
5.1. BROJ MIKRONUKLEUSA, NUKLEOPLAZMATSKIH MOSTOVA I NUKLEARNIH PUPOVA ISPITIVANIH KEMIKALIJA .....	17
5.2. PROLIFERACIJA STANICA .....	21
<b>6.RASPRAVA .....</b>	<b>26</b>
<b>7.ZAKLJUČCI .....</b>	<b>28</b>
<b>8.SAŽETAK.....</b>	<b>29</b>
<b>9.SUMMARY.....</b>	<b>30</b>
<b>10.LITERATURA .....</b>	<b>31</b>
<b>11.ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>33</b>
<b>12.PRILOZI.....</b>	<b>34</b>

## **POPIS KRATICA**

CPBI indeks proliferacije stanice (eng. *cytokinesis-block proliferation index*)

DNA deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

HBSS puferaska otopina (eng. *Hank's buffered salt solution*)

MN mikronukleus

Nbud nuklearni pup u binuklearnoj stanici (eng. *nuclear budding*)

NPB nukleoplazmatski most u binuklearnoj stanici (eng. *nucleoplasmic bridge*)

PHA fitohemaglutinin (eng. *phytohaemagglutinin*)

RI indeks replikacije (eng. *replication index*)

RICC relativan porast broja stanica (eng. *relative increase in cell count*)

RPD relativno udvostručavanje stanica (eng. *relative population doubling*)



## POPIS SLIKA I TABLICA

Slika 1. Binuklearna stanica s mikronukleusom. Stranica broj 4

Slika 2. Binuklearna stanica s nukleoplazmatskim mostom (NPB). Stranica broj 6

Slika 3. Binuklearna stanica s nukleoplazmatskim pupom (Nbud). Stranica broj 6

Slika 4. Svjetlosni mikroskop Axioskop 2 MOT Zeiss i računalo s DP Controllerprogramom za slikanje. Stranica broj 16

Slika 5. Binuklearna stanica s 4 mikronukleusa. Preparat iz stanične kulture s metanolom koncentracije  $13.34\mu\text{M}$ , ispitanik 2. Stranica broj 18

Slika 6. Binuklearna stanica s nukleoplazmatskim pupom i mikronukleusom. Preparat iz kulture s ksilolom koncentracije  $4.69\text{nM}$ , ispitanik 2. Stranica broj 18

Slika 7. Binuklearna stanica s nukleoplazmatskim mostom. Preparat iz kulture s ksilolom koncentracije  $93.8\text{nM}$ , ispitanik 3. Stranica broj 19

Slika 8. Binuklearna stanica s mikronukleusom. Preparat iz kulture s ksilolom koncentracije  $93.8\text{nM}$ , ispitanik 3. Stranica broj 19

Slika 9. Srednja vrijednost broja mikronukleusa sa standardnom greškom pri različitim koncentracijama kemikalija. Statistički značajne razlike između kontrole i određene koncentracije kemikalije  $*P<0,05$ ; studentov t-test. Stranica broj 20

Slika 10. Multinuklearni limfocit. Preparat iz kulture s octenom kiselinom koncentracije  $5.33\mu\text{M}$ , ispitanik 1. Stranica broj 22

Slika 11. Binuklearni limfociti. Preparat iz kulture s metanolom koncentracije  $13.36\mu\text{M}$ , ispitanik 3. Stranica broj 22

Slika 12. Srednja vrijednost indeksa replikacije stanica (RI) sa standardnom greškom pri različitim koncentracijama kemikalija. Statistički značajne razlike između kontrole i određene koncentracije kemikalije, Studentov t-test  $*P<0,01$ ;  $**P=0,05$ . Stranica broj 23

Slika 13. Utjecaj različitih koncentracija kemikalija na citostazu stanica. Prikazan je medijan i 95% raspon pouzdanosti. Statistički značajne razlike između kontrole i određene koncentracije kemikalije, Studentov t-test  $*P<0,01$ ;  $**P=0,05$ . Stranica broj 24

Tablica 1. Rezultati MN testa na ukupnom broju mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova i nuklearnih pupova u različitim koncentracijama metanola, ksilola i octene kiseline. Stranica broj 17

Tablica 2. Rezultati proliferacije stanica s zaustavljanjem citokineze (CBPI) pri različitim koncentracijama metanola, ksilola i octene kiseline. Stranica broj 21

## 1. UVOD

Procjena genotoksičnih učinaka kemikalija provodi se na ljudskim limfocitima periferne krvi primjenom različitih genetičkih markera koji omogućuju detekciju ranih bioloških učinaka. Jedan od genetičkih markera je i broj mikronukleusa u binuklearnim stanicama (1). 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 (2). Osim broja mikronukleusa u binuklearnim stanicama, broj nukleoplazmatskih mostova koji ukazuju na prisutnost dicentrika i broj nuklearnih pupova koji predstavljaju amplifikaciju gena, upućuju na biološke učinke koji prethode pojavi tumora, raka i različitih bolesti. U ovom istraživanju kemikalije čiji se genotoksični učinak procjenjuje su metanol, ksilol i ledena octena kiselina.

### 1.1. Kemikalije

Primjenom mikronukleus testa određuje se štetan utjecaj metanola, ledene octene kiseline i ksilola. Navedene kemikalije su nadražujuće, zapaljive i otrovne te imaju vrlo široku upotrebu u različitim industrijama i laboratorijima. Zbog široke upotrebe, veliki broj ljudi je profesionalno izložen njihovom djelovanju.

#### 1.1.1. Metanol

Metanol ( $\text{CH}_4\text{O}$ ) je najjednostavniji alkohol, na sobnoj temperaturi bezbojna, zapaljiva i vrlo otrovna tekućina karakterističnog mirisa. Djeluje na očni živac, izaziva sljepilo, a u većim količinama je smrtonosan. Koristi se kao sastavni dio pogonskih goriva, proizvodnju antifrizi, plastike i često se može naći u alkoholnim pićima kao zamjena za alkohol etanol. U laboratorijima je najčešće korišten kao mobilna faza tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kao fiksativ u izradi mikroskopskih preparata.

### 1.1.2. Ksilol

Ksilol ili dimetilbenzen ( $C_8H_{10}$ ) je aromatski ugljikovodik građen od benzenskog prstena i dvije metilne skupine. S obzirom na položaj metilne skupine postoje tri konstitucijska izomera: orto, meta i para ksilol. Ksilol je zapaljiva tekućina, slabo topljiva u vodi, ima štetan utjecaj na dišni i živčani sustav te nagrizajuće svojstvo. Uglavnom se koristi kao otapalo, u stvaranju histoloških preparata, industriji plastike te naftnoj industriji kao sastavnica benzina.

### 1.1.3. Ledena octena kiselina

Za razliku od octene kiseline koja je vodena otopina, ledena octena kiselina ( $CH_3COOH$ ) je čisti spoj. Bezbojna tekućina karakterističnog oštrog mirisa, na  $16,6^{\circ}C$  očvrstne u kristalnu masu sličnu ledu odakle i naziv ledena octena kiselina. Njezina razrijeđena otopina dobiva se vrenjem iz alkoholnih otopina te je poznata kao sastojak vinskog octa. Najveće količine ledene octene kiseline koriste se za proizvodnju anhidrida i estera koji služe kao otapala za proizvodnju polimernih vlakana. Osim toga, rabi se za proizvodnju lijekova, insekticida i u tekstilnoj industriji. U laboratoriju se koristi kao fiksativ za izradu mikroskopskih preparata kako bi se izbjegla enzimska ili bakterijska razgradnja tkiva. Ova srednje jaka kiselina ima vrlo svestranu primjenu.

## 1.2. Mikronukleus test

Mikronukleus (MN) test na limfocitima periferne krvi jedna je od najvažnijih metoda koja se primjenjuje u biološkom nadzoru. Usavršavanjem i razvitkom MN testa porasla je i količina znanja o prednostima i osjetljivosti te metode, što potpuno opravdava njezino uvođenje u standardnu primjenu za biološki nadzor izloženih populacija (1). Posljednjih je godina u okviru međunarodnog projekta HUMN (eng. *Human MicroNucleus*) provedena standardizacija MN testa te su prepoznati čimbenici koji mogu utjecati na njegove rezultate. MN test je jednostavniji i brži od analize kromosomskih aberacija, a pregledavanjem velikog broja stanica (najmanje 1000 stanica po ispitaniku) postiže se i veća statistička značajnost. Osim navedenog, u ovome se testu može istodobno utvrditi ukupni broj MN, ukupni broj stanica s MN, raspodjela MN u stanicama, broj nukleoplazmatskih mostova (NPB) i nuklearnih pupova (Nbud) u uvjetima *in vitro* što ga trenutačno čini jednim od najsvestranijih citogenetičkih testova (1,3). Za određivanje citotoksičnosti računa se indeks proliferacije stanica (CPBI), citostaza i/ili indeks replikacije (RI) na 500 stanica.

CPBI je broj koji prikazuje diobu stanica u tretiranoj kulturi u odnosu na netretiranu kontrolu. Računa se prema sljedećoj formuli:

$$CBPI = \frac{\text{br.mononuk. stan.} + (2 \times \text{br.binuk. stan.}) + (3 \times \text{br.trinuk. stan.}) + (4 \times \text{br.multinuk. stan.})}{\text{ukupan broj stanica}}$$

Citostaza je postotak koji predstavlja inhibiciju rasta stanice, a RI udio dioba stanica završen u tretiranoj kulturi u odnosu na kontrolu za vrijeme izlaganja ispitivanoj kemikaliji i oporavka.

Računaju se prema sljedećim formulama:

$$\% \text{ citostasa} = 100 - RI$$

$$RI = \frac{\frac{\text{br.binuklearnih.stan.} + (2 \times \text{br.multinuklearnih.stan.})}{\text{ukupan broj tretiranih stanica}}}{\frac{\text{br.binuklearnih stan.} + (2 \times \text{br.multinuklearnih stan.})}{\text{ukupan broj kontroliranih stanica}}} \times 100$$

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 (4), imunofluorescencijske tehnike s antikinetohornim protutijelima te FISH s probama koje specifično detektiraju centromerna ili telomerna područja kromosoma. Općenito se smatra da mikronukleusi nastali od zaostalih kromosoma imaju kinetohore, dok oni koji ne sadržavaju kinetohoru ili centromernu DNA obično sadržavaju acentrične fragmente (5).

### 1.2.1. Vrste mikronukleus testa

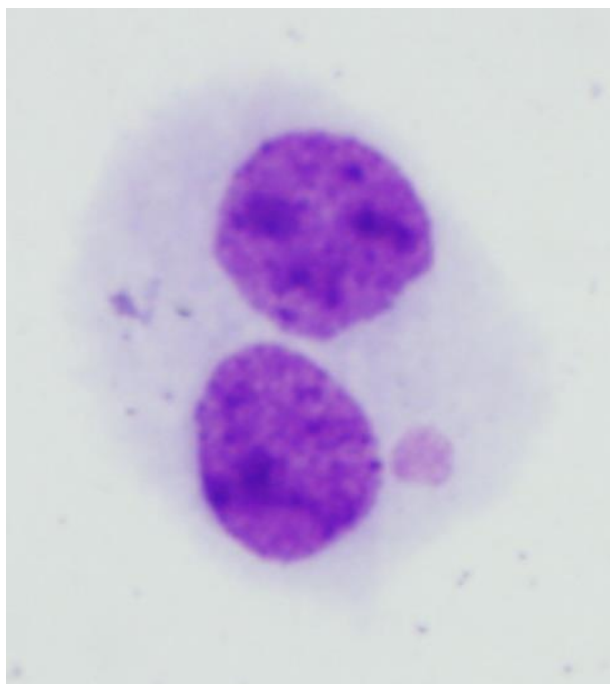
Najvažnija stavka u izvođenju MN testa je završena mitozu tijekom ili poslije inkubacije stanica te stoga postoje dvije mogućnosti izvođenja MN testa, uz prisutnost citohalazina B i bez njega. Nakon diobe stanične jezgre, u uvjetima *in vitro* radi sprječavanja diobe citoplazme dodaje se citohalazin B. Citohalazin B je inhibitor koji blokira citokinezu (diobu citoplazme) prije nego li se roditeljska stanica podijeli u dvije stanice kćeri, na način da sprječava polimerizaciju aktina u mikrofilamente. MN test sa citohalazinom B pruža točnije i pouzdanije određivanje citotoksičnosti i proliferacije stanica. CPBI i RI su preporučene vrijednosti za usporedbu citotoksičnosti tretirane kulture u odnosu na kontrolu. U slučaju kada se citohalazin B ne dodaje u ispitivanu kulturu, računa se RPD (relativno udvostručavanje stanica) i RICC (relativan porast broja stanica). Za vrijeme izvođenja MN testa bez citohalazina B važno je napomenuti da su se stanice podijelile tijekom ili nakon tretiranja ispitivanom tvari. U suprotnom može doći do lažno negativnih rezultata (6).

### 1.2.2 Mikronukleusi

Mikronukleusi su samostalne kromatinske strukture koje su potpuno odvojene od jezgre (Slika 1). Izgledaju poput dodatne samostalne jezgre smještene unutar citoplazme, ali znatno manje veličine koja mora biti između  $1/6$  i  $1/3$  promjera jezgre te istog obojenja kao i jezgra (7). Nastaju kondenzacijom acentričnih kromosomskih fragmenata ili čitavih kromosoma zaostalih u anafazi koji se nisu ugradili u jezgre stanica kćeri.

### 1.2.3 Nastanak mikronukleusa

Prisutnost mikronukleusa pokazatelj je postojanja aberacija u prethodnoj diobi stanice (8). Nastanak mikronukleusa mogu potaknuti genotoksične tvari u stanicama izloženog organizma na dva načina: Prvi je aneugeni učinak – nakon što stanica uđe u diobu zbog oštećenja i nefunkcionalnosti mikrotubula diobenog vretena, onemogućeno je putovanje jednog ili više kromosoma na pol stanice. Nakon citokineze zaostali će kromosomi u citoplazmi stanice kćeri kondenzacijom formirati mikronukleuse (9). Drugi je klastogeni učinak – mikronukleus nastaje od acentričnih ulomaka kromosoma (ulomci kromatida i kromosoma) nastalih uslijed loma kromosoma. Spontanom nastanku mikronukleusa doprinose mutacije kinetohornih proteina, centromera i diobenog vretena koje mogu izazvati nejednaku raspodjelu kromosoma ili gubitak čitavih kromosoma tijekom anafaze i nepopravljene kromosomske lomove koji dovode do stvaranja acentričnih ulomaka, a nastaju djelovanjem endogenih čimbenika ili pod vanjskim utjecajem (10). Istraživanja podrijetla mikronukleusa, koji spontano nastaju u humanim limfocitima, pokazala su da ih 50% potječe od čitavih kromosoma zaostalih u anafazi mitoze (9). Međutim, kvantifikacija mikronukleusa ne govori o mehanizmima koji su doveli do njihova nastanka te su potrebna daljnja ispitivanja koja određuju sadržaj mikronukleusa (npr. metoda C- pruganja).



Slika 1. Binuklearna stanica s mikronukleusom

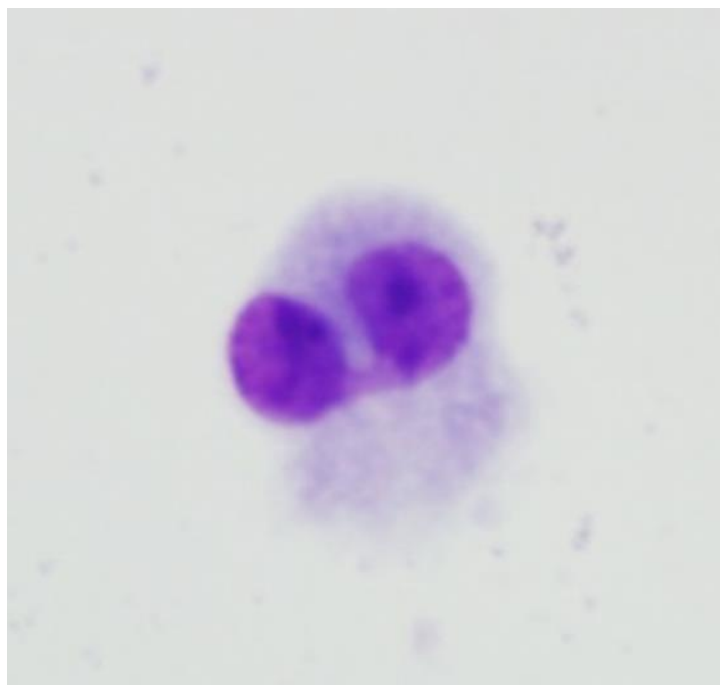
#### 1.2.4. Normalne i granične vrijednosti mikronukleus testa

Povećani broj mikronukleusa u pojedinca može značiti njegovu povećanu osjetljivost na karcinogene tvari, rezultat izloženosti genotoksičnim tvarima tijekom razdoblja razvoja stanica u ispitivanom tkivu, no može upućivati i na pojačanu tjelesnu aktivnost, učinke prehrane i drugo (11,12). Istraživanjem provedenim u općoj populaciji Hrvatske utvrđeno je prosječno 7 MN dok je raspon pojedinačnih vrijednosti iznosio od 0 do 18 MN u 1000 binuklearnih stanica. Gornja granična vrijednost dobivena istraživanjem iznosi 12,5 MN na 1000 limfocita (3).

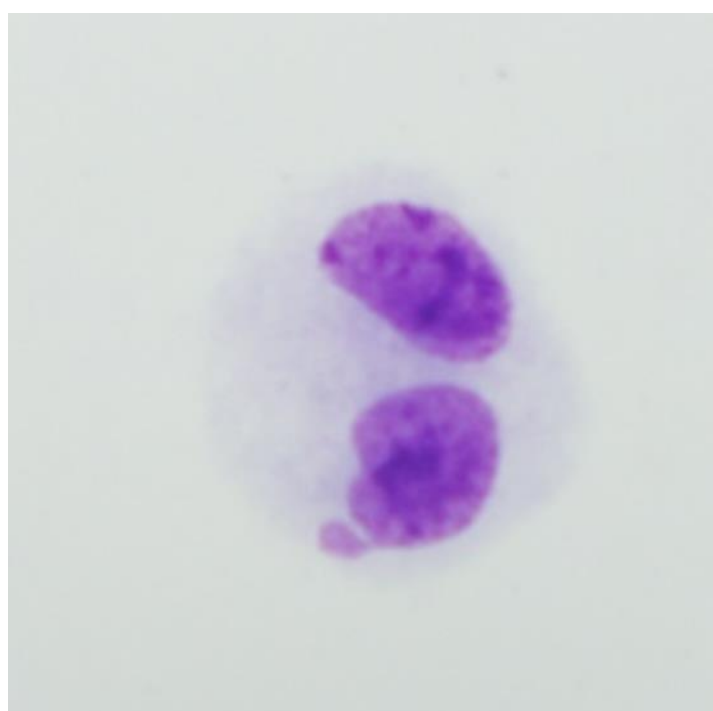
#### 1.2.5. Primjena mikronukleus testa u biološkom nadzoru

Mikronukleus test je vrlo koristan jer predstavlja rane pokazatelje potencijalnog rizika izloženosti. Raznim istraživanjima je pokazano da povećani broj kromosomskih nepravilnosti u ljudskim tkivima je statistički povezan s rizikom od nastanka zloćudnog tumora (1,13). Primjenom mikronukleus testa može se utvrditi štetan utjecaj navedenih kemikalija te kako i na koji način one utječu na profesionalno izloženu populaciju. Osim broja mikronukleusa u binuklearnim stanicama, broj nukleoplazmatskih mostova (Slika 2) koji ukazuju na prisutnost dicentrika i broj nuklearnih pupova (Slika 3) koji predstavljaju amplifikaciju gena, upućuju na biološke učinke koji prethode pojavi tumora i različitih zloćudnih bolesti. Upravo iz tih razloga mikronukleus test se upotrebljava u biološkom nadzoru kao dio zdravstvenog nadzora osoba koje su profesionalno izložene različitim

fizikalnim i kemijskim mutagenima ili kancerogenima. Osobitu važnost ima u monitoringu populacija koje su profesionalno izložene pojedinim mutagenima iz radnog okoliša, čiji su mehanizmi djelovanja poznati, a dovode se u izravnu vezu s malignom transformacijom i pojavom raka (2).



Slika 2. Binuklearna stanica s nukleoplazmatskim mostom (NPB)



Slika 3. Binuklearna stanica s nukleoplazmatskim pupom (Nbud)



## **2. HIPOTEZA**

Osnovna pretpostavka ovog istraživanja je da kemikalije uzrokuju nastanak većeg broja mikronukleusa u binuklearnim stanicama.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati koliki je genotoksičan učinak metanola na nastanak mikronukleusa u binuklearnim limfocitima periferne krvi
2. Ispitati koliki je genotoksičan učinak ksilola na nastanak mikronukleusa u binuklearnim limfocitima periferne krvi.
3. Ispitati koliki je genotoksičan učinak ledene octene kiseline na nastanak mikronukleusa u binuklearnim limfocitima periferne krvi.
4. Odrediti indeks proliferacije limfocita periferne krvi zaustavljanjem citokineze pri različitim koncentracijama metanola.
5. Odrediti indeks proliferacije limfocita periferne krvi zaustavljanjem citokineze pri različitim koncentracijama ksilola.
6. Odrediti indeks proliferacije limfocita periferne krvi zaustavljanjem citokineze pri različitim koncentracijama ledene octene kiseline.

## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Kohortna studija

### 4.2. Ispitanici

U ovom istraživanju ispitanici su osobe mlađe od 40 godina, studentice treće godine studija Medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku. Svaki ispitanik je sam sebi kontrola.

Kriteriji za uključivanje ispitanika:

- osobe mlađe od 40 godina
- neizloženost kemikalijama
- neizloženost ionizirajućem zračenju.

Kriteriji za isključivanje:

- stariji od 40 godina
- izloženost ionizirajućem zračenju tijekom posljednjih 6 mjeseci
- korištenje antibiotika unazad mjesec dana.

### 4.3. Metode

Prije početka istraživanja svi ispitanici potpisuju informirani pristanak, a krv za mikronukleus test je izvađena od strane kvalificiranog medicinskog osoblja u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Osijek. Istraživanje je rađeno na limfocitima periferne krvi izvađenim u epruvete s Na-heparinom. Svaka koncentracija kemikalije kao i kontrola radila se u duplikatu. Analiza mikronukleus testa napravljena je prema internom protokolu Laboratorija za medicinsku genetiku.

Mikronukleus test zasniva se na 72-satnome uzgoju limfocita periferne krvi u hranjivom mediju F-10 Ham. Prednost limfocita periferne krvi je u tome što su to stanice koje cirkuliraju po cijelom organizmu te imaju zadovoljavajući životni vijek (posebno T limfociti). Do oštećenja njihove DNA može doći u bilo kojem tkivu ili organu. Nakon 20 sati od početka kulture dodaje se testirana kemikalija, koja se ispiru nakon tri sata inkubacije na 37°C.

#### 4.3.1. Priprema kemikalija

Testirane kemikalije dodaju se u određeno vrijeme (nakon 22 h kulture) i točno određenog volumena te ih je potrebno neposredno prije početka rada pripremiti. Svaka kemikalija se dodaje u tri koncentracije, a svaka koncentracija se nasaduje u duplikatu.

Potrebne otopine, puferi i reagensi:

- Epruveta s Na-heparinom
- Medij F-10 Ham (EuroClone, kat. br. N6908-500ML)
- Fitohemaglutinin (PHA) (Gibco, kat. br. 1057-015)
- L-glutamin (Lonza, kat. br. 17-605C)
- Citohalazin-B (Sigma, kat. br. C2743-200UL)
- Fiksativ = metanol (Sigma, kat. br. 32213): ledena octena kiselina (Sigma, kat. br. 27225)
- Gurr Buffer Tablets (Gibco, kat. br. 10582-013)
- Giemsa boja (Kemijsko tehnički laboratorij Šlaković)
- HCl (Sigma, kat.br. 30721)
- Ksilol (Einecs 215-535-7, CAS: 1330-20-7)

##### 4.3.1.1. Ksilol

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

IZRAČUN:

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

Radne otopine

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

$$C_{P1} = 0.1\% = 0.001 \text{ g/ml} \rightarrow 999 \mu\text{l HBSS} + 1 \mu\text{l ksilena}$$

$$C_{P2} = 1\% = 0.01 \text{ g/ml} \rightarrow 990 \mu\text{l HBSS} + 10 \mu\text{l ksilena}$$

$$C_{P3} = 2\% = 0.02 \text{ g/ml} \rightarrow 980 \mu\text{l HBSS} + 20 \mu\text{l ksilena}$$

$$V_{\text{konačni}} = 5 \text{ ml}$$

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

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

$$C_{k1} = \frac{C_{P1} \times V_P}{V_K} = \frac{0.001 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 2.5 \times 10^{-3} \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0.0000005 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 0.0005 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$C_{k1} = \frac{0.0005 \text{ mg/ml}}{106600 \text{ mg/mmol}} = 0.0049 \times 10^{-6} \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} = 0.00469 \mu\text{M} = 4.69 \text{ nM}$$

$$C_{k2} = \frac{C_{P2} \times V_P}{V_K} = \frac{0.01 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 2.5 \times 10^{-3} \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0.000005 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 0.005 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$C_{k2} = \frac{0.005 \text{ mg/ml}}{106600 \text{ mg/mmol}} = 0.0469 \times 10^{-6} \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} = 0.0469 \mu\text{M} = 46.9 \text{ nM}$$

$$C_{k3} = \frac{C_{P3} \times V_P}{V_K} = \frac{0.02 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 2.5 \times 10^{-3} \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0.00001 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 0.01 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$C_{k3} = \frac{0.01 \text{ mg/ml}}{106600 \text{ mg/mmol}} = 0.0938 \times 10^{-6} \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} = 0.0938 \mu\text{M} = 93.8 \text{ nM}$$

## 4.3.1.2. Metanol

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

IZRAČUN:

$$M_r(\text{metanol}) = 32.04 \text{ g/mol} = 32040 \text{ mg/mmol}$$

Radne otopine

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

$$C_{p1} = 1\% = 0.01 \text{ g/ml} \rightarrow 990 \mu\text{l HBSS} + 10 \mu\text{l metanola}$$

$$C_{p2} = 10\% = 0.1 \text{ g/ml} \rightarrow 900 \mu\text{l HBSS} + 100 \mu\text{l metanola}$$

$$C_{p3} = 20\% = 0.2 \text{ g/ml} \rightarrow 800 \mu\text{l HBSS} + 200 \mu\text{l metanola}$$

$$V_{\text{konačni}} = 5 \text{ ml}$$

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

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

$$C_{k1} = \frac{C_{p1} \times V_p}{V_k} = \frac{0.01 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 0.214 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0.000428 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 0.428 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$C_{k1} = \frac{0.428 \text{ mg/ml}}{32040 \text{ mg/mmol}} = 13.3583 \times 10^{-6} \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} = 13.3583 \mu\text{M}$$

$$C_{k2} = \frac{C_{p2} \times V_p}{V_k} = \frac{0.1 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 0.214 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0.00428 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 4.28 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$C_{k2} = \frac{4.28 \text{ mg/ml}}{32040 \text{ mg/mmol}} = 133.583 \times 10^{-6} \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} = 133.583 \mu\text{M}$$

$$C_{k3} = \frac{C_{p3} \times V_p}{V_k} = \frac{0.2 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 0.214 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0.00856 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 8.56 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$C_{k3} = \frac{8.56 \text{ mg/ml}}{32040 \text{ mg/mmol}} = 267.166 \times 10^{-6} \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} = 267.166 \mu\text{M}$$

#### 4.3.1.3. Ledena octena kiselina

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

IZRAČUN:

$$M_r (\text{ledena octena kiselina}) = 60.05 \text{ g/mol} = 60050 \text{ mg/mmol}$$

Radne otopine

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

$$C_{p1} = 1\% = 0.01 \text{ g/ml} \rightarrow 990 \mu\text{l HBSS} + 10 \mu\text{l octene kiseline}$$

$$C_{p2} = 10\% = 0.1 \text{ g/ml} \rightarrow 900 \mu\text{l HBSS} + 100 \mu\text{l octene kiseline}$$

$$C_{p3} = 20\% = 0.2 \text{ g/ml} \rightarrow 800 \mu\text{l HBSS} + 200 \mu\text{l octene kiseline}$$

$$V_{\text{konačni}} = 5 \text{ ml}$$

$$V_{\text{početni}} = 16 \mu\text{l}$$

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

$$C_{k1} = \frac{C_{p1} \times V_p}{V_k} = \frac{0.01 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 16 \times 10^{-3} \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0.000032 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 0.032 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$C_{k1} = \frac{0.032 \text{ mg/ml}}{60050 \text{ mg/mmol}} = 5.328 \times 10^{-6} \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} = 5.328 \mu\text{M}$$

$$C_{k2} = \frac{C_{p2} \times V_p}{V_k} = \frac{0.1 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 16 \times 10^{-3} \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0.00032 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 0.32 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$C_{k2} = \frac{0.32 \text{ mg/ml}}{60050 \text{ mg/mmol}} = 5.328 \times 10^{-6} \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} = 5.328 \mu\text{M}$$

$$C_{k3} = \frac{C_{p3} \times V_p}{V_k} = \frac{0.2 \frac{g}{ml} \times 16 \times 10^{-3} ml}{5 ml} = 0.00064 \frac{g}{ml} = 0.64 \frac{mg}{ml}$$

$$C_{k3} = \frac{0.64 mg / ml}{60050 mg / mmol} = 10.6578 \times 10^{-6} \frac{mmol}{ml} = 10.6578 \mu M$$

#### 4.3.2. Kultivacija

U svaku označenu epruvetu sa prethodno rastočenim medijem sobne temperature (5 ml u svakoj epruveti) dodaju se mitogeni: 30  $\mu$ l fitohemaglutinina i 60  $\mu$ l L-glutamina te oni stimuliraju diobu limfocita periferne krvi u *in vitro* uvjetima. U sterilnim uvjetima dodaje se 500  $\mu$ l krvi i inkubira u horizontalnom položaju na 37°C 22h. Nakon 22h kulture dodaju se kemikalije: metanol, ksilol i ledena octena kiselina. Kemikalije se ispiru iz medija nakon 3h, centrifugiranjem epruveta na 2000 rpm 4 minute, a supernatant se odbacuje sterilnom pipetom. U kulturu se dodaje svježi medij, PHA i L-glutamin. Nakon 44h dodaje se citohalazin-B i inkubira još 28h (do 72h).

#### 4.3.3. Izrada

Nakon 72h kultivacije, epruvete se vade iz inkubatora, promiješaju i centrifugiraju 4 minute na 2000 rpm. Supernatant se odstranjuje sterilnom pipetom i ostavlja 0.5 ml taloga koji se razbija rukom. Postupno se dodaje fiksativ (1:3 = ledena octena kiselina: metanol), a epruvete se ispiru nekoliko puta. Suspenzija se ostavlja na +4°C do drugog dana.

#### 4.3.4. Priprema preparata

Na suho predmetno staklo Pasteurovom plastičnom pipetom stavljaju se dvije kapi stanične suspenzije. Preparati se suše na sobnoj temperaturi preko noći, a zatim boje u 5% otopini Giemse u fosfatnom puferu 5 minuta nakon čega se 15 sekundi ispiru u destiliranoj vodi i suše na zraku u vertikalnom položaju.

#### 4.3.5 Analiza preparata

Mikronukleusi se mogu detektirati primjenom različitih boja koje se specifično vežu na DNA (14). Njihov broj može se utvrditi mikroskopskom analizom i pomoću protočnog citometra (15). U ovom istraživanju preparati se analiziraju svjetlosnim mikroskopom Axioskop 2 MOT Zeiss



(slika 4) i programom za slikanje DP Controller 1.2.108. Olympus Optical Co. LDT (2002). Analizira se 1000 binuklearnih stanica. Na malom povećanju nije moguće vidjeti ima li mikronukleusa u binuklearnim stanicama, ali se može odrediti ima li dovoljno binuklearnih stanica sa citoplazmom za analizu. Nakon što se pronade binuklearna stanica pogodna za analizu, stavlja se na veće povećanje koristeći imerzijsko ulje ( $400\times$  ili  $1000\times$ ). Na tom povećanju potrebno je napraviti prosudbu je li stanica pogodna za analizu: je li slika oštra, vidi li se rub citoplazme, poklapaju li se jezgre te veličina mikronukleusa koja mora biti između  $\frac{1}{6}$  i  $\frac{1}{3}$  promjera jezgre te istog obojenja kao i jezgra. Ako je binuklearna stanica dobra, zapisuje se broj mikronukleusa, koordinate stanice na predmetnom staklu u obrazac za mikroskopiranje te se slika DPC Controller programom. Istovremeno je potrebno zabilježiti ako se u kojoj binuklearnoj stanici nađe nuklearni pup ili pak nukleoplazmatski most. Nukleoplazmatski most ne smije biti veći od  $\frac{1}{4}$  jezgre, a mora biti obojen istim intenzitetom kao i jezgra te takva binuklearna stanica može, ali i ne mora sadržavati mikronukleus. Za određivanje citotoksičnosti broji se ukupno 500 stanica te se određuje koliko ima jezgara u citoplazmi (jedna = mononuklearne stanice, dvije = binuklearne stanice, tri = trinuklearne stanice te više od tri = multinuklearne stanice).



Slika 4. Svjetlosni mikroskop Axioskop 2 MOT Zeiss i računalo sa DP Controller programom za slikanje

#### 4.4. Statističke metode

Dobiveni rezultati obrađeni su primjenom deskriptivne statistike i studentovim t-testom. Numerički podaci dani su kao srednja vrijednost i standardna devijacija, medijan te 95% raspon pouzdanosti. Sve P vrijednosti su 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

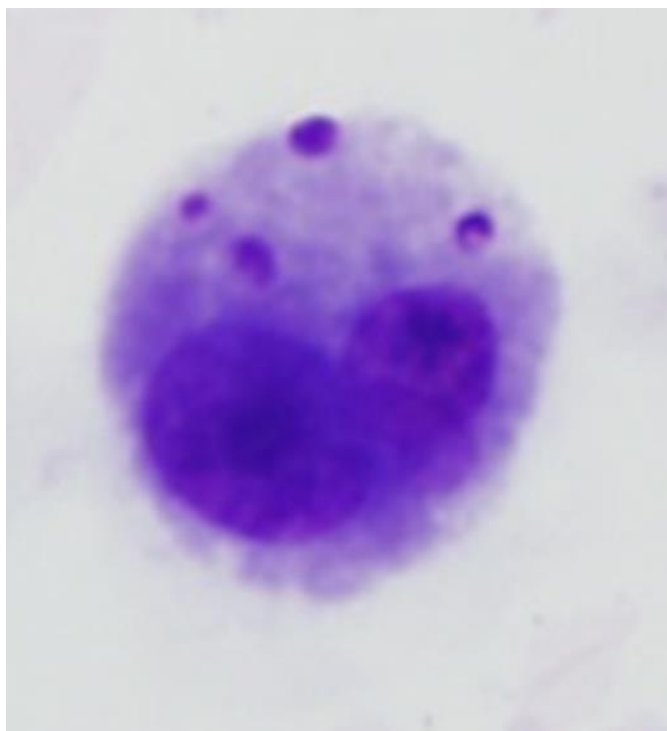
### 5.1. Broj mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova i nuklearnih pupova ispitivanih kemikalija

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 te je vidljivo da je statistički značajan porast broja mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova i nuklearnih pupova pri većim koncentracijama sve tri testirane kemikalije.

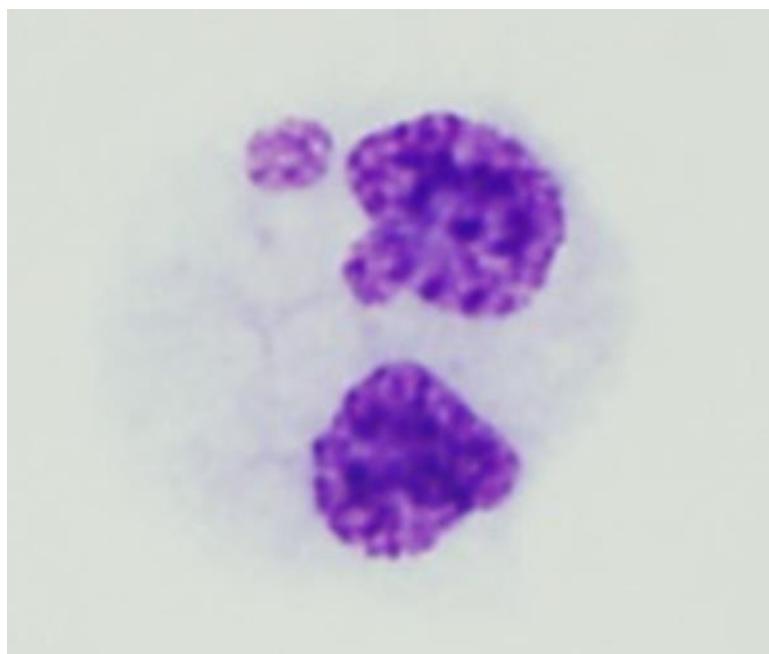
Tablica 1. Rezultati MN testa na ukupnom broju mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova i nuklearnih pupova u različitim koncentracijama metanola, ksilola i octene kiseline.

Kemikalija	Koncentracija	Srednja vrijednost $\pm$ SD	Median	95% raspon	<i>P</i> vrijednost
Metanol	0 $\mu$ M	6,33 $\pm$ 1,15	7	0,60 – 7,26	-
	13,36 $\mu$ M	10,00 $\pm$ 2,65	11	1,38 – 16,63	0,093
	133,58 $\mu$ M	8,33 $\pm$ 1,53	8	0,79 – 9,60	0,145
	237,17 $\mu$ M	10,33 $\pm$ 0,58	10	0,30 – 3,63	0,006*
Ksilol	0 nM	6,32 $\pm$ 1,16	7	0,61 – 7,25	-
	4,69 nM	7,33 $\pm$ 1,53	7	0,79 – 9,60	0,417
	46,9 nM	8,33 $\pm$ 3,21	7	1,67 – 20,20	0,368
	93,8 nM	9,00 $\pm$ 1,00	9	0,52 – 6,28	0,039**
Octena kiselina	0 $\mu$ M	6,33 $\pm$ 1,15	7	0,60 – 7,27	-
	0,533 $\mu$ M	9,67 $\pm$ 1,53	8	0,79 – 9,60	0,039**
	5,33 $\mu$ M	8,33 $\pm$ 1,55	7	0,60 – 7,26	0,051
	10,66 $\mu$ M	9,33 $\pm$ 2,52	7	1,31 – 15,82	0,134

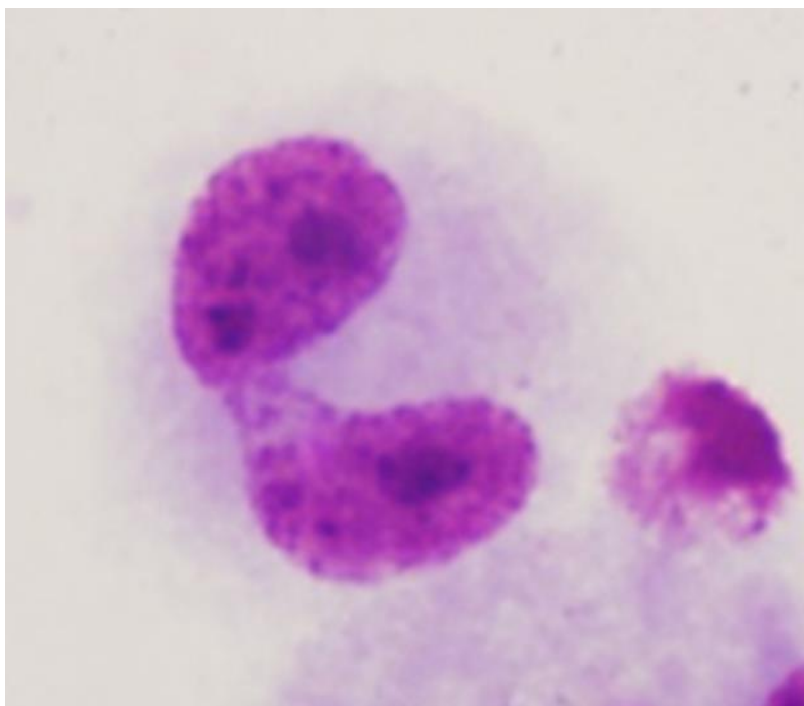
SD – standardna devijacija; t-test, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu \* $P < 0,01$ ; \*\* $P < 0,05$ .



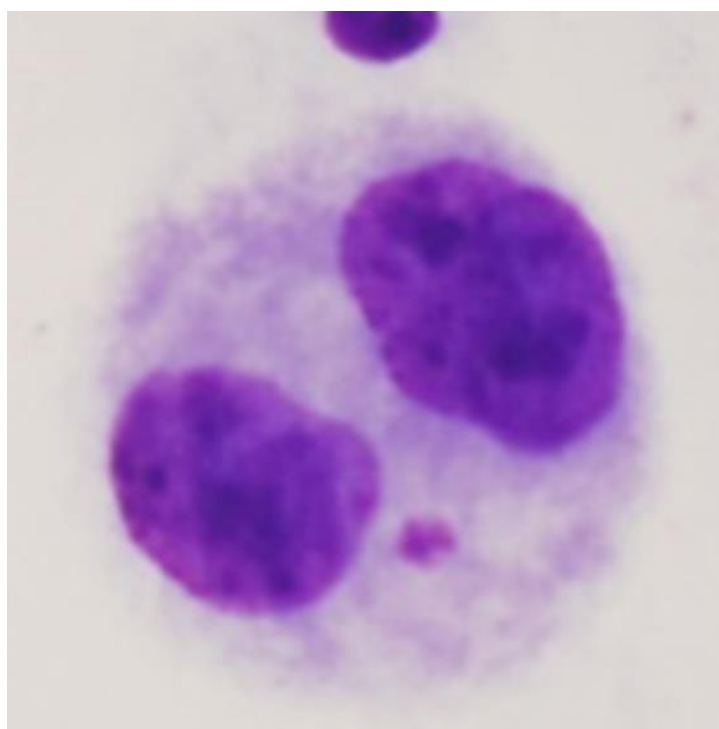
Slika 5. Binuklearna stanica s 4 mikronukleusa. Preparat iz stanične kulture sa metanolom koncentracije  $13.34\mu\text{M}$ , ispitanik 2.



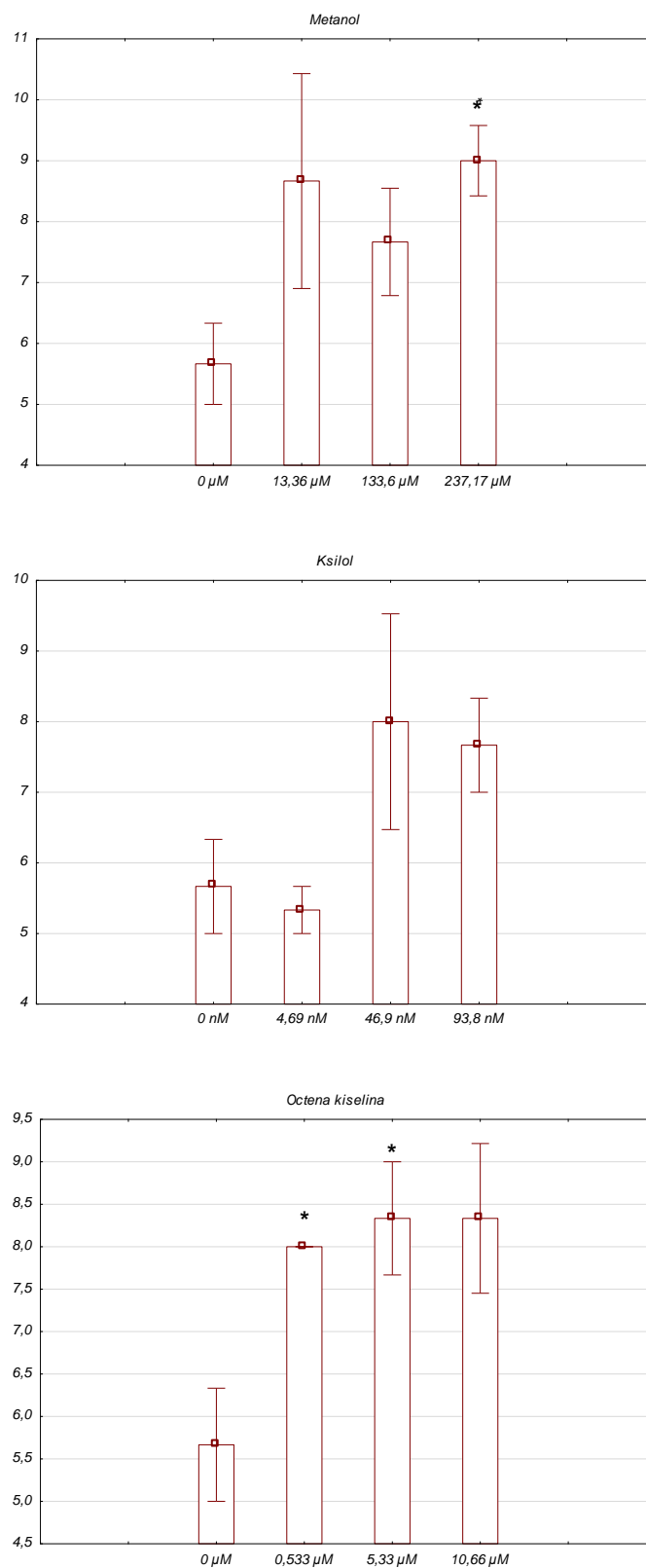
Slika 6. Binuklearna stanica s nukleoplazmatskim pupom i mikronukleusom. Preparat iz kulture s ksilolom koncentracije  $4.69\text{nM}$ , ispitanik 2.



Slika7. Binuklearna stanica s nukleoplazmatskim mostom. Preparat iz kulture sa ksilolom koncentracije 93.8nM, ispitanik 3.



Slika 8. Binuklearna stanica s mikronukleusom. Preparat iz kulture s ksilolom koncentracije 93.8nM, ispitanik 3.



Slika 9. Srednja vrijednost broja mikronukleusa sa standardnom greškom pri različitim koncentracijama kemikalija. Statistički značajne razlike između kontrole i određene koncentracije kemikalije \* $P < 0,05$ ; studentov t-test.

Iz Slike 9 vidljivo je da broj MN raste s porastom koncentracije pojedine kemikalije. Tako postoji značajna statistička razlika u porastu broja MN između kontrole i 237,17  $\mu\text{M}$  koncentracije metanola ( $P=0,019$ ), kao i između kontrole i koncentracija od 0,533  $\mu\text{M}$  ( $P=0,024$ ) i 5,33  $\mu\text{M}$  octene kiseline ( $P=0,047$ ).

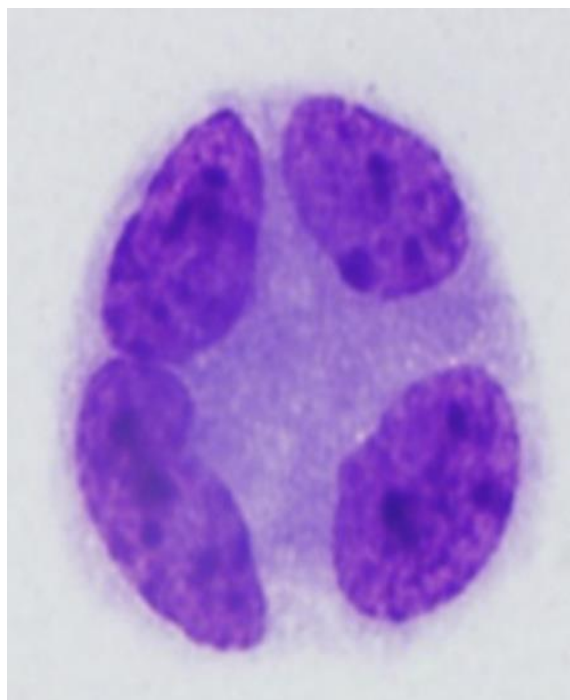
## 5.2. Proliferacija stanica

Srednje vrijednosti indeksa proliferacije stanica sa zaustavljanjem citokineze (CBPI) sa standardnom devijacijom različitih koncentracijama kemikalija dane su u Tablici 2. Statistička značajnost izračunata je za svaku koncentraciju u odnosu na kontrolu te je vidljivo da postoji statistički značajno smanjenje proliferacije stanica s porastom koncentracije kemikalija.

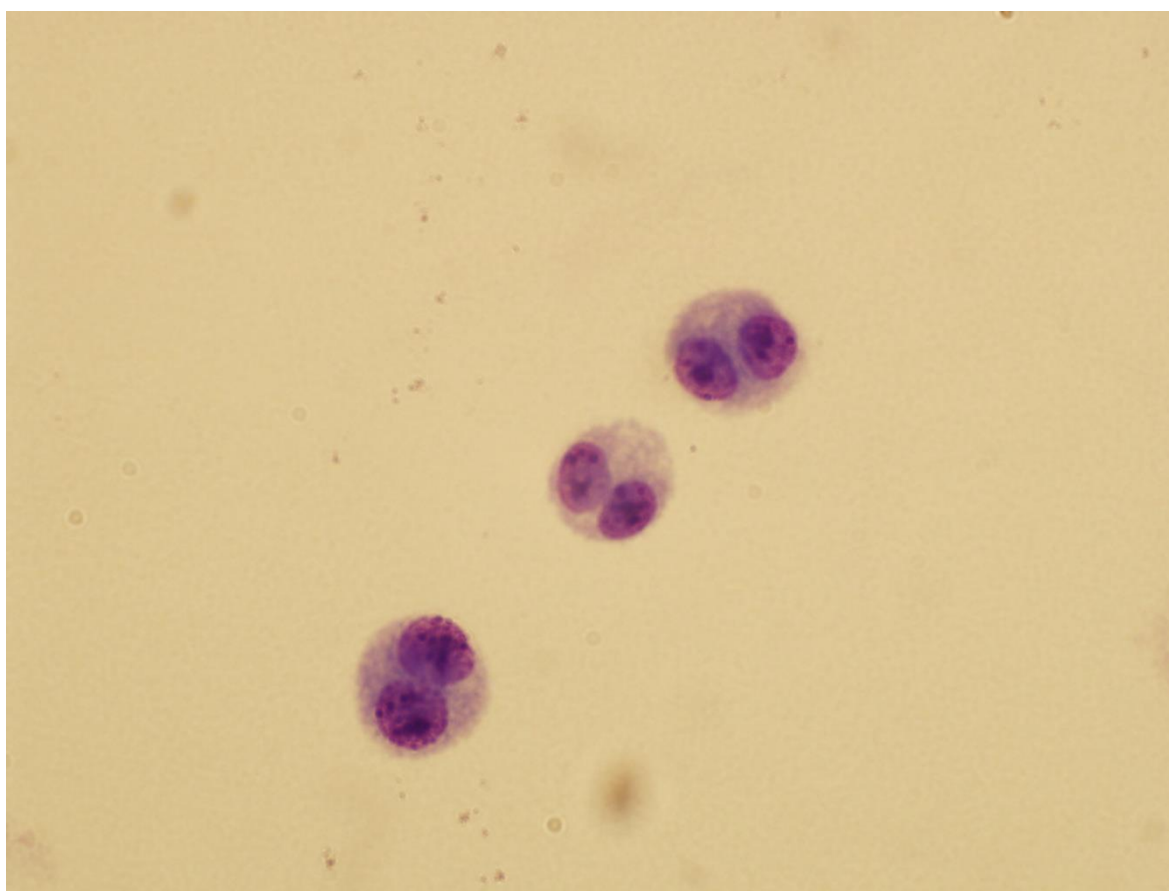
Tablica 2. Rezultati proliferacije stanica s zaustavljanjem citokineze (CBPI) pri različitim koncentracijama metanola, ksilola i octene kiseline.

Kemikalija	Koncentracija	Srednja vrijednost $\pm$ SD	Media n	95% raspon	<i>P</i> vrijednost
Metanol	0 $\mu\text{M}$	1,94 $\pm$ 0,03	1,94	0,01 – 0,16	-
	13,36 $\mu\text{M}$	1,99 $\pm$ 0,05	2,00	0,02 – 0,29	0,197
	133,58 $\mu\text{M}$	1,99 $\pm$ 0,06	2,00	0,03 – 0,35	0,202
	237,17 $\mu\text{M}$	1,99 $\pm$ 0,04	1,99	0,02 – 0,22	0,157
Ksilol	0 nM	1,93 $\pm$ 0,03	1,94	0,01 – 0,15	-
	4,69 nM	2,02 $\pm$ 0,04	2,02	0,02 – 0,22	0,033*
	46,9 nM	1,95 $\pm$ 0,09	1,96	0,04 – 0,54	0,903
	93,8 nM	1,92 $\pm$ 0,05	1,94	0,02 – 0,29	0,553
Octena kiseline	0 $\mu\text{M}$	1,94 $\pm$ 0,02	1,94	0,02 – 0,16	-
	0,533 $\mu\text{M}$	1,96 $\pm$ 0,09	1,91	0,05 – 0,56	0,816
	5,33 $\mu\text{M}$	1,98 $\pm$ 0,02	1,97	0,01 – 0,11	0,106
	10,66 $\mu\text{M}$	2,02 $\pm$ 0,05	2,02	0,02 – 0,28	0,070

SD – standardna devijacija; t-test, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu \* $P < 0,05$

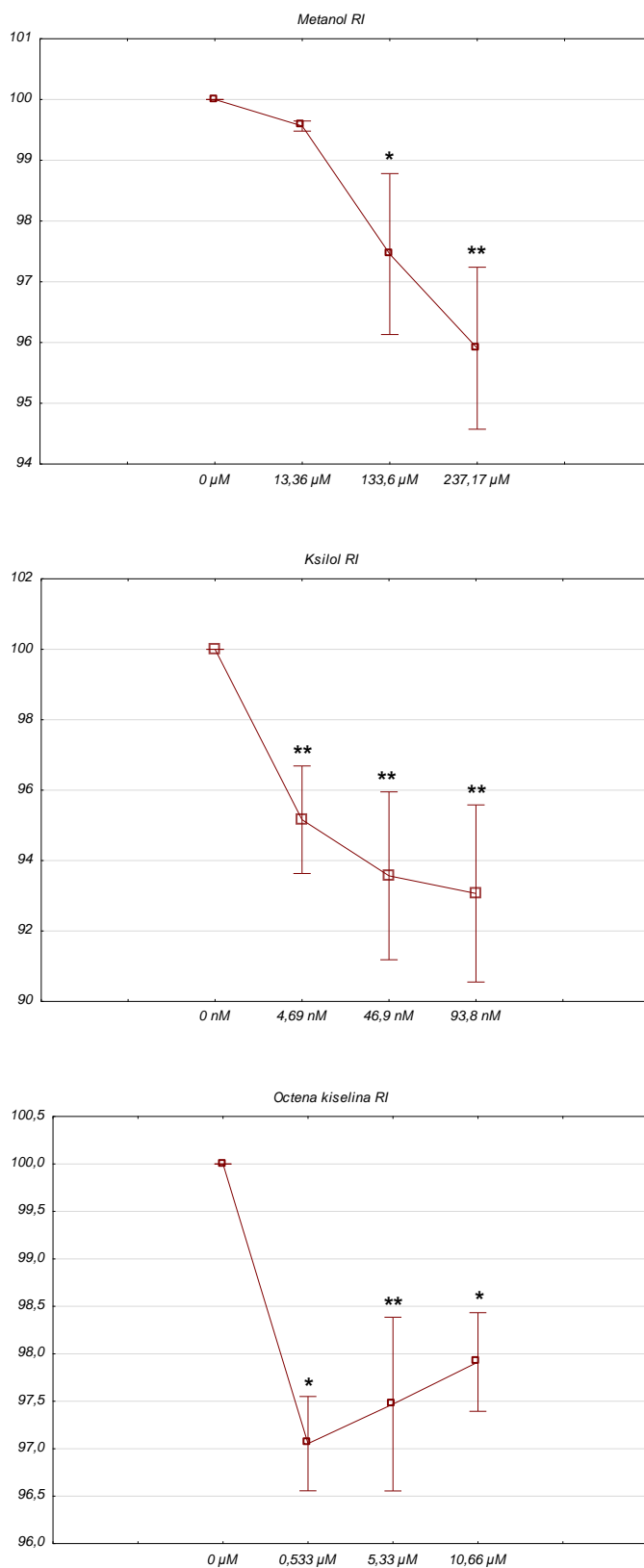


Slika 10. Multinuklearni limfocit. Preparat iz kulture s octenom kiselinom koncentracije  $5.33\mu\text{M}$ , ispitanik 1.

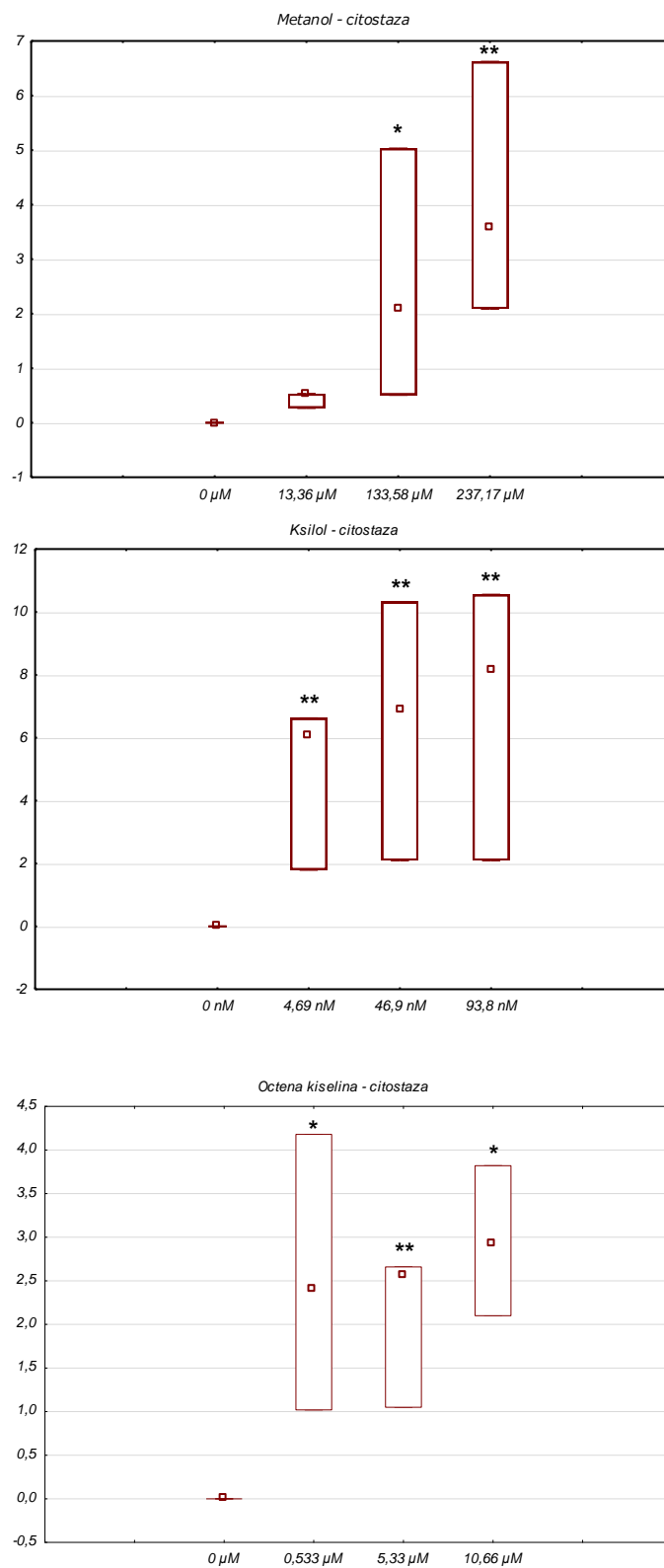


Slika 11. Binuklearni limfociti. Preparat iz kulture s metanolom koncentracije  $13.36\mu\text{M}$ , ispitanik 3.





Slika 12. Srednja vrijednost indeksa replikacije stanica (RI) sa standardnom greškom pri različitim koncentracijama kemikalija. Statistički značajne razlike između kontrole i određene koncentracije kemikalije, Studentov t-test \* $P < 0,01$ ; \*\* $P = 0,05$ .



Slika 13. Utjecaj različitih koncentracija kemikalija na citostazu stanica. Prikazan je medijan i 95% raspon pouzdanosti. Statistički značajne razlike između kontrole i određene koncentracije kemikalije, Studentov t-test \* $P < 0,01$ ; \*\* $P = 0,05$ .

Na Slici 12 grafički je prikazan pad indeksa replikacije stanica s porastom koncentracija kemikalija. Postoji statistički značajna razlika između pojedinih koncentracija kemikalija i kontrole. Statistički značajna razlika uočena je između koncentracije metanola od 133,6  $\mu\text{M}$  ( $P=0,003$ ) i 237,17  $\mu\text{M}$  ( $P=0,019$ ), kao i pri svim koncentracijama ksilola (4,69 nM  $P=0,017$ ; 46,9 nM  $P=0,027$ ; 93,8 nM  $P=0,025$ ). Kod većih koncentracija octene kiseline taj broj malo raste, ali je i dalje statistički značajno manji nego kod kontrole. Tako za koncentraciju octene kiseline od 0,533  $\mu\text{M}$   $P$  je 0,002; za 5,33  $\mu\text{M}$   $P=0,025$  te za koncentraciju od 10,6  $\mu\text{M}$  octene kiseline  $P=0,008$ .

Na Slici 13 grafički je prikazano kako raste postotak citostaze (inhibicija rasta i diobe stanice) s porastom koncentracija kemikalija. Uočene su statistički značajne razlike između kontrole i 133,6  $\mu\text{M}$  ( $P=0,003$ ) te 237,17  $\mu\text{M}$  ( $P=0,019$ ) koncentracije metanola. Također, postoji značajna razlika u citostazi svih koncentracija ksilola u odnosu na kontrolu te su  $P$  vrijednosti  $P=0,017$ ;  $P=0,027$  i  $P=0,025$ . Vrlo značajna razlika uočena je između koncentracija 0,533  $\mu\text{M}$  i 10,6  $\mu\text{M}$  octene kiseline te iznose  $P=0,002$  odnosno  $P=0,008$ .

## 6. RASPRAVA

Ovim istraživanjem potvrđena je hipoteza da ispitivane kemikalije uzrokuju povećani broj mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova i nuklearnih pupova, ali statistički značajni rezultati su dobiveni samo za najveću koncentraciju metanola (237,17  $\mu\text{M}$ ) i ksilola (93,8 nM) te za najmanju koncentraciju ledene octene kiseline (0,533  $\mu\text{M}$ ), dok druga povećanja broja mikronukleusa, nukleoplazmatskog mosta i nuklearnog pupa nisu bila statistički značajna (Tablica 1). Na temelju CBPI vidljivo je da povećanjem koncentracija kemikalija on raste, no statistički je značajan samo za najmanju koncentraciju ksilola (4,69 nM), dok za druge kemikalije nema statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (Tablica 2). CBPI pokazuje kako se smanjuje broj stanica koje prolaze kroz mitozu tijekom izloženosti stanica kemikaliji i tijekom njihova oporavka (nakon ispiranja kemikalije i dodavanja svježeg medija bez kemikalije). Na temelju rezultata može se zaključiti da sve testirane kemikalije (metanol, ksilol i octena kiselina) imaju antiproliferativni utjecaj povezan s genotoksičnošću što je vidljivo iz Slike 12 i 13. S porastom koncentracija kemikalija smanjuje se indeks replikacije (proliferacije, RI) stanica, dok raste citostaza (inhibicija rasta i dioba stanica). Treba imati na umu da je utjecaj kemikalija istraživani na limfocitima periferne krvi, dok utjecaj kemikalija na neku drugu vrstu stanica može biti drugačiji te mogu potaknuti njihovu diobu.

U usporedbi s ostalim istraživanjima i procjeni genotoksičnosti ksilola, metanola i ledene octene kiseline mikronukleus testom, također je uočeno povećanje broja mikronukleusa u staničnim kulturama tretiranim navedenim kemikalijama. Pokazano je da octena kiselina nema genotoksičan učinak na stanice koštane srži miša jer dobiveni rezultati nisu statistički značajni, ali kao i u ovom istraživanju, ovisno o koncentraciji kemikalije u usporedbi s kontrolom, broj mikronukleusa je povećan (16). Također, ranije je ispitivana genotoksičnost ksilola i metanola kod ljudi koji su radili na benzinskim crpkama jer su ksilol i metanol sastavni dio benzina. Nije dokazano da je ksilol genotoksičan. Uočen je porast broja mikronukleusa u svim koncentracijama u usporedbi sa kontrolom, ali rezultati nisu bili statistički značajni (17,18). Metanol je, također, uzrokovao povećanje broja mikronukleusa te je dokazano da povećava rizik od nastanka spontanog pobačaja kod žena koje rade na benzinskoj crpki (18). Treba imati na umu da postoji mogućnost da su na rezultate istraživanja utjecale i neke druge komponente benzina iako su rezultati u skladu s ovim istraživanjem (procjena genotoksičnosti na limfocitima periferne krvi). U procjeni genotoksičnosti nekih drugih agensa mikronukleus testom kao što je formaldehid također je uočeno povećanje broja mikronukleusa. Statistički značajni rezultati u odnosu na kontrolu dobiveni su pri većim koncentracijama formaldehida (19). Za razliku od ksilola, metanola i ledene octene kiseline,

povećanjem koncentracije formaldehida vrijednost CBPI-a je padala što upućuje na povećanu proliferaciju stanica.

Iz dobivenih rezultata i usporedbom s dosadašnjim istraživanjima procjene genotoksičnosti ksilola, metanola i ledene octene kiseline vidljivo je da navedene kemikalije uzrokuju povećanje broja mikronukleusa što je u skladu s hipotezom ovog istraživanja. Pri većim koncentracijama kemikalija rezultati su statistički značajni te se ne smije isključiti mogućnost njihovog genotoksičnog djelovanja.

## 7. ZAKLJUČCI

U današnje vrijeme životni i radni okoliš čovjeka nepredvidiva je mješavina kemijskih spojeva od kojih neki mogu djelovati mutageno ili kao aneugeni karcinogeni (11). Ksilol, metanol i ledena octena kiselina su agensi kojima je pojedinac izložen, ne samo tijekom profesionalne izloženosti na radnom mjestu, već i u svakodnevnom životu. Istraživanja, poput ovoga, rabeći suvremene citogenetičke metode, koje uključuju utvrđivanje mikroskopskih vidljivih oštećenja kromosoma somatskih stanica u uvjetima *in vitro*, omogućuju procjenu genotoksičnosti navedenih kemikalija te kako one utječu na ljudski genom.

U ovom istraživanju potvrđena je genotoksičnost metanola, ksilola i ledene octene kiseline. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da porastom koncentracije pojedine kemikalije raste i broj mikronukleusa iako broj mikronukleusa nije statistički značajan osim kod najveće koncentracije metanola (237,17  $\mu\text{M}$ ) i ledene octene kiseline koncentracije 0,533  $\mu\text{M}$  i 5,33  $\mu\text{M}$ . Porastom koncentracije kemikalija i porastom broja mikronukleusa indeks proliferacije limfocita je statistički značajno smanjen kod svake koncentracije kemikalija u odnosu na kontrolu. Iz dobivenih rezultata dolazi se do zaključka da je smanjen broj stanica koje se dijele tijekom izloženosti kemikalijama i da sve testirane kemikalije imaju antiproliferativni utjecaj, inhibiraju rast i diobu stanica što upućuje na genotoksičnost.

Mikronukleus test je vrlo dobar pokazatelj genotoksičog potencijala metanola, ksilola i ledene octene kiseline, ali na individualnoj razini. Test je izvođen *in vitro* na limfocitima periferne krvi, dok utjecaj kemikalija na neku drugu vrstu stanica može biti drugačiji.

## 8. SAŽETAK

Mikronukleus (MN) test na limfocitima periferne krvi jedna je od najvažnijih metoda koje se primjenjuju u biološkom nadzoru, a zasniva se na na 72-satnome uzgoju limfocita periferne krvi u hranjivom mediju te izradi mikroskopskih preparata koji se pregledavaju pod svjetlosnim mikroskopom.

Cilj ovog istraživanja je ispitati genotoksični učinak ksilola, metanola i ledene octene kiseline i odrediti indeks proliferacije limfocita periferne krvi zaustavljanjem citokineze pri različitim koncentracijama kemikalija mikronukleus testom.

Analizirani su limfociti triju ispitanika tretirani s tri različite koncentracije svake od navedenih kemikalija. Bilježen je ukupan broj MN, ukupni broj stanica s MN, raspodjela MN u stanicama, broj nukleoplazmatskih mostova (NPB) i nuklearnih pupova (Nbud) te indeks proliferacije stanica.

Ksilol, metanol i ledena octena kiselina uzrokuju statistički značajno povećani broj mikronukleusa i smanjenje indeksa proliferacije (t test,  $P < 0,05$ ).

Pokazano je da je mikronukleus test vrlo dobar pokazatelj genotoksičnog i citotoksičnog djelovanja ispitivanih kemikalija.

**KLJUČNE RIJEČI:** genotoksičnost, ledena octena kiselina, metanol, mikronukleus test, ksilol

## 9. SUMMARY

The micronucleus (MN) test on lymphocytes of peripheral blood is one of most important methods used in biologic monitoring. It is based on the 72-hour cultivation of lymphocytes of peripheral blood in nutrient medium and making microscopic preparations which are observed under optical microscope.

The aim of this research was to examine the genotoxic effect of xylene, methanol and glacial acetic acid, and to determine the proliferation index of peripheral blood lymphocytes by cytokinesis at different chemical concentrations in the micronucleus test.

The lymphocytes of three participants are analyzed with three different concentrations of each of the enlisted chemicals. The total number of MN, the total number cells with MN, the distribution of MN in cells, the number of nucleoplasmatic bridges (NPB) and nuclear buds (Nbud) and cell proliferation index were recorded.

Xylene, methanol and glacial acetic acid cause a significantly increased number of micronuclei and lowered proliferation index (t test,  $P < 0,05$ ).

It was proven that micronucleus test is a very good indicator of genotoxic and cytotoxic action of the tested chemicals.

**KEY WORDS:** genotoxicity, glacial acetid acid, methanol, micronucleus test, xylene



## 10. LITERATURA

1. 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 Research*. 2003;534:65–75
2. Garaj – Vrhovac V: Analysis of mutations in somatic cells. *Arh High Rada Toksikol* 2000;51:112-124
3. Kopjar N, Kašuba V, Milić M, Rozgaj R, Želježić D, Gajski G, i sur. Micronucleus assay in Croatian general population. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2010;61:219-234
4. Verschaeve L, Vanderkerken M, Kirsch-Volders M. Cbanding as a simple tool to discriminate micronuclei induced by clastogens and aneugens. *Stain Technol*. 1998;63:351-354
5. Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decodier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 2006;88:1515-1531
6. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*. 2007;2:1084-1104
7. Dhawan A, Bajpayee MB. *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols*. New York: Humana press; 2013;166-176
8. Channarayappa, Ong T, Nath J. Cytogenetic effects of vincristine sulfate and ethylene dibromide in human peripheral lymphocytes: micronucleus analysis. *Environ Mol Mutagen*. 1992;20:117-126
9. Parry JM, Parry EM. *Genetic Toxicology: Principles and Methods*. London: Humana Press; 2011;316-324
10. Natajara AT. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutate Res* 2002;504:3-16
11. Fučić A, Mijić A. In vitro i in vivo mikronukleus metode u genotoksikološkim istraživanjima. *Arh Hig Rada Toksikol*. 1999;50: 299–306
12. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Proposal for updating Test Guideline 487. *In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*. Pariz: 2012
13. Kopjar N, Kašuba V, Rozgaj R, Želježić D. Antineoplastic drugs associated with occupational risks. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2010;61:121-146
14. Norppa H, Falck GCM. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 2003;18:221-233

15. 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
16. Orhan G, Ekmekçi A, Menevşe S. The effect of the male contraceptive agent gossypol acetic acid on mouse bone marrow cells in vivo: micronuclei and mitotic index. *Contraception.* 1993;47:377-385
17. Rekhadevi P, Rahman M, Mahboob M, Grover P. Genotoxicity in Filling Station Attendants Exposed to Petroleum Hydrocarbons. *Ann. Occup. Hyg.* 2010;54:944–954
18. Torres J, Teixeira J, Silva S, Laffon B, Cunhac L, Mendez J i sur. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutation Research.* 2006; 604:19–27
19. Spej G, Kühner S, Linsenmeyer R, Schütz P. Does formaldehyde induce aneuploidy? *Mutagenesis.* 2011;26:805–811

## 11. ŽIVOTOPIS

VEDRANA FEKETIJA

Datum i mjesto rođenja:

- 15. prosinac 1993. godine, Virovitica

Obrazovanje:

- 2008.-2012. Gimnazija Petra Preradovića Virovitica
- 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

## 1. 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): \_\_\_\_\_

## 2. OBAVIJEST ZA ISPITANIKU

### ***In vitro* mikronukleus test u procjeni genotoksičnosti ksilena, metanola i ledene octene kiseline**

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 nastanak mikronukleusa 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.

*In vitro* mikronukleus test najvažnija je citogenetička metoda koja se primjenjuje u nadzoru profesionalno izloženih populacija mutagenim ili kancerogenim kemikalijama. Mikronukleusi su indikatori klastogenog efekta (strukturne promjene kromosoma) ili poremećaja diobenog vretena. Povećani broj mikronukleusa u pojedinca može značiti njegovu povećanu osjetljivost na karcinogene tvari ili može biti rezultat izloženosti genotoksičnim tvarima tijekom razdoblja razvoja stanica u ispitivanom tkivu.

Bit ćete zamoljeni za uzorak 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 predočeno 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.

