

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

Mia Galić

**ISPITIVANJE GENETIČKE
NESTABILNOSTI PRIMJENOM *IN*
VITRO ANALIZE IZMJENE
SESTRINSKIH KROMATIDA**

Završni rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

Mia Galić

**ISPITIVANJE GENETIČKE
NESTABILNOSTI PRIMJENOM *IN*
VITRO ANALIZE IZMJENE
SESTRINSKIH KROMATIDA**

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 38 listova, 2 tablice i 10 slika.

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

Velika hvala mojoj obitelji i prijateljicama Magdaleni i Mariji Magdaleni na potpori, strpljenju i razumijevanju tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Izmjena sestrinskih kromatida.....	1
1.2. Kemikalije	4
1.2.1. Ksilol	4
1.2.2. Metanol.....	6
1.2.3. Octena kiselina	7
2. HIPOTEZA	8
3. CILJEVI	9
4. ISPITANICI I METODE	10
4.1. Ustroj studije	10
4.2 Ispitanici	10
4.3. Materijali i metode	10
4.3.1. Materijali	10
4.3.1. Priprema kemikalija	12
4.3.2.Kultivacija stanica	16
4.3.3. Izrada.....	17
4.3.4. Priprema preparata	18
4.4. Analiza preparata.....	19
4.5. Statističke metode	21
5. REZULTATI	22
5.1. Broj izmjena sestrinskih kromatida.....	22
5.2. Mitotički indeks ispitivanih kemikalija.....	25
6. RASPRAVA	27
7. ZAKLJUČCI	31
8. SAŽETAK	32
9. SUMMARY	33
10. LITERATURA	35
11. ŽIVOTOPIS	37
12. PRILOZI	38

POPIS KRATICA

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

SCE –izmjena sestrinskih kromatida (engl. *Sister Chromatid Exchanges*)

Bsyn – Bloomov sindrom (engl. *Bloom's syndrome*)

HPL – ljudski limfociti iz periferne krvi (engl. *human peripheral lymphocytes*)

PHA – fitohemaglutinin (engl. *phytohaemagglutinin*)

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

BrdU – 5-bromodeoksiuridin

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*)

CNS – središnji živčani sustav (engl. *central nervous system*)

MI – mitotički indeks

KCl – kalijev klorid

SSC – otopina soli natrij-citrata (engl. *saline-sodium citrate*)

HBSS – Hankova izbalansirana otopina (engl. *Hank's buffered salt solution*)

FAS – fetalni alkoholni sindrom

XP – *Xeroderma pigmentosum*

FA – Fanconijeva anemija

POPIS SLIKA

Slika 1. Normalan kromosom i kromosom sa SCE.....	2
Slika 2. A - Shematski prikaz diobe kromatida s BrdU; B - Prikaz izmjene sestrinskih kromatida koje nastaju kao posljedica rekombinantnog popravka	4
Slika 3. Strukturna formula ksilola	5
Slika 4. Strukturna formula metanola	6
Slika 5. Strukturna formula octene kiseline	7
Slika 6. Raspršivač metafaza OptiChrome Euroclone	18
Slika 7. Shematski prikaz mikroskopa Zeiss Axioskop2 MOT	20
Slika 8. Srednja vrijednost broja izmjena sestrinskih kromatida (SCE) sa standardnom greškom pri različitim koncentracijama kemikalija	23
Slika 9. Izmjene sestrinskih kromatida nastale kao posljedica rekombinantnog popravka. A - Kontrola; B - 20% metanol; C - 20% Octena kiselina; D - 1% octena kiselina; E - 0,1% ksilol; F - 1% ksilol	24
Slika 10. Srednja vrijednost mitotičkog indeksa (MI) sa standardnom greškom pri različitim koncentracijama kemikalija.....	26

POPIS TABLICA

Tablica 1. Broj izmjena sestrinskih kromatida različitih koncentracija metanola, ksilola i octene kiseline u tri ispitanika.....	22
Tablica 2. Mitotički indeks različitih koncentracija metanola, ksilola i octene kiseline u tri ispitanika.	25

1. UVOD

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, kao što su: 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 (1,2). 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. 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 (3).

Testovi za procjenu karcinogenog i mutagenog potencijala određene tvari temelje se na spoznajama da je DNA (deoksiribonukleinska kiselina, engl. *deoxyribonucleic acid*) ciljna molekula za sve mutagene, a vjerojatno i većinu karcinogenih tvari. DNA je nasljedni materijal svih staničnih organizama te svaka tvar koja promijeni DNA bilo kojeg višestaničnog organizma predstavlja potencijalnu opasnost za čovjeka.

Procjena karcinogenog i mutagenog potencijala određene tvari temelji se na četiri razine složenosti:

1. *in vitro* testovi mutagenosti i genotoksičnosti
2. istraživanja na životinjama
3. epidemiološke studije na ljudima
4. analiza strukturalne sličnosti tvari s već poznatim karcinogenom.

1.1. Izmjena sestrinskih kromatida

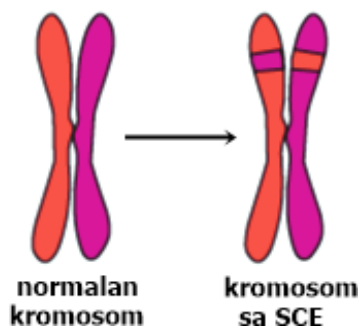
In vitro analiza izmjene sestrinskih kromatida (SCE, eng. *Sister Chromatid Exchanges*) važna je i vrlo osjetljiva citogenetička metoda koja se primjenjuje u nadzoru

profesionalno izloženih populacija mutagenim ili kancerogenim kemikalijama (4). Indirektan je pokazatelj razine oštećenja prisutnih u DNA prije njenog udvostručavanja. Najviše se koristi za procjenu oštećenja DNA koje izazivaju alkilirajući citostatici, lijekovi koji se koriste za liječenje zloćudnih novotvorina.

Analiza izmjene sestrinskih kromatida se koristi za dijagnostiku Bloomovog sindroma (Bsyn, engl. *Bloom's syndrome*) kod kojeg je broj izmjena jako visok (5).

Kada se kromosomi tretiraju tako da se sestrinske kromatide mogu razlikovati jedna od druge, izmjena sestrinskih kromatida se može vidjeti. Taylor je 1958. godine prvi otkrio ovaj fenomen u biljnim stanicama (6).

Učestalost izmjene sestrinskih kromatida u stanicama značajno raste nakon izlaganja genotoksičnim spojevima koji stvaraju kovalentne veze s DNA. Izmjene sestrinskih kromatida rezultat su rekombinacije između homolognih područja na sestrinskim kromatidama kao i jedna od metoda popravaka u stanicama. Kada neki kemijski agens interferira s DNA, dolazi do pogrešaka u replikaciji te kao rezultat nastaju praznine u novosintetiziranom lancu DNA. Te regije se nadopunjuju rekombinacijskim popravkom u kojem se koristi homologna regija na sestrinskom kromosomu (1-4).



Slika 1. Normalan kromosom i kromosom sa SCE

Analiza SCE većinom se radi na limfocitima periferne krvi. Periferna (venska) krv je suspenzija plazme, eritrocita, trombocita i leukocita koji jedini imaju jezgru te se zbog toga najčešće koriste kao materijal za analizu u citogenetici. Humani limfociti periferne krvi (HPL, engl. *human peripheral lymphocytes*) su idealni za analize kromosomskih oštećenja. HPL potječu od pluripotentne matične stanice i dozrijevaju u T-limfocite i B-limfocite u koštanoj

srži i timusu odakle migriraju u periferna limfna tkiva. Iako se u cirkulaciji nalazi tek 2% limfocita, oni neprestano cirkuliraju između limfnog tkiva i krvi te imaju duži životni vijek, posebno T limfociti. HPLse normalno ne dijele, nalaze se u G0 fazi staničnog ciklusa. Dodatkom mitogena u medij, kao što je fitohemaglutinin (PHA, eng. *phytohaemagglutinin*), oni se stimuliraju na diobu u *in vitro* uvjetima (1).

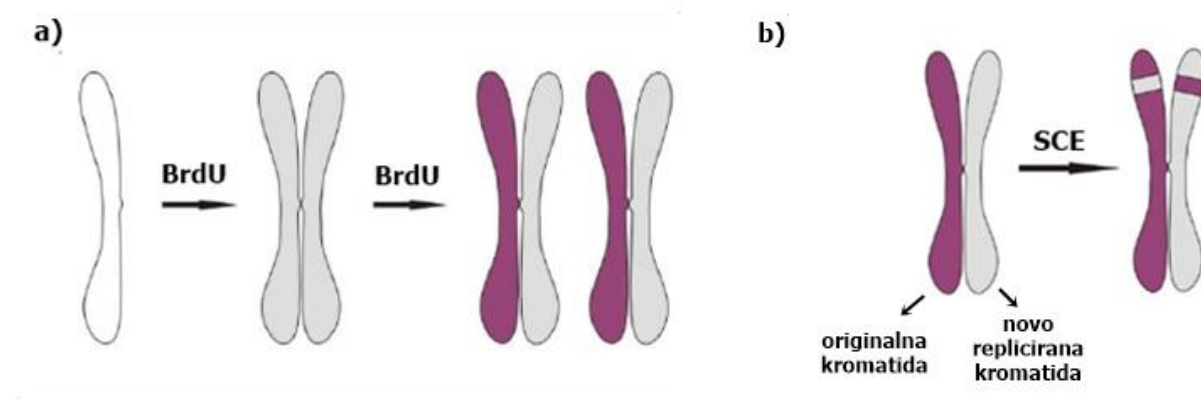
Do oštećenja njihove DNA može doći u bilo kojem tkivu ili organu (1,2). Izmjene sestrinskih kromatida rezultat su rekombinacije između homolognih područja na sestrinskim kromatidama kao i jedna od metoda popravaka DNA u stanicama. *In vitro* analiza izmjene sestrinskih kromatida omogućuje detekciju učinka mutagenih ili kancerogenih tvari na genetički materijal koji se ne mogu detektirati analizom kromosomskih aberacija koja se standardno koristi. Za razliku od limfocita s težim oblicima kromosomskih aberacija, postoje dokazi da limfociti s visokom učestalošću izmjena sestrinskih kromatida mogu ostati u krvnom optoku i nekoliko godina.

Mnoga istraživanja, kao i meta-analize, pokazala su povezanost veće učestalosti izmjena sestrinskih kromatida s povećanim rizikom za mnoge karcinome (1,2).

Budući da se za analizu koriste somatske stanice, a ne spolne, svaki nalaz rekombinacije između kromosoma smatra se pokušajem popravka, a ne normalnim procesom u diferencijaciji stanice.

Na samom početku kultivacije u medij je potrebno dodati 5-bromo-deoksiuridin (BrdU) koji je analog timidina. On se ugrađuje u molekulu DNA prilikom replikacije. Njime se označi ona nit DNA koja je nastala replikacijom. Nakon što se preparati izrade, ostavljaju se mirovati tjedan dana (sušenje na zraku), zatim se boje fluorescentnom bojom Hoechst 33258 koja emitira plavo svjetlo. Iako će se ova boja jednako vezati na oba lanca DNA, lanac u koji je ugrađen BrdU bit će svjetlije boje jer ovaj utišava fluorescenciju (7,8).

Konačno preparati se oboje Giemsom – plavom bojom koja nam omogućava da se preparati gledaju pod svjetlosnim mikroskopom. Nakon završenog postupka dvije kromatide istog kromosoma obojene su različitim nijansama plave boje što se vidi kao jedna tamna i jedna svijetla kromatida čije se izmjene onda broje u 50 mitoza. Različita obojenost kromatida, odnosno dijelova kromosoma, posljedica je rekombinacijskog popravka.



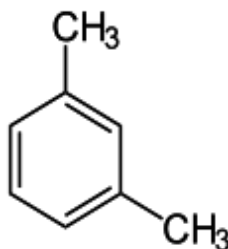
Slika 2. A - Shematski prikaz diobe kromatida s BrdU; B - Prikaz izmjene sestrinskih kromatida koje nastaju kao posljedica rekombinantnog popravka

1.2. Kemikalije

Kemikalije kojima procjenjujemo učinak na genetičku nestabilnost su nadražujuće, zapaljive i otrovne te imaju široku upotrebu u različitim industrijama. Postoji veliki broj ljudi koji su profesionalno izloženi njihovom djelovanju. Dugotrajno izlaganje malim dozama ili koncentracijama ovih kemikalija ima velike posljedice na genetički materijal stanica.

1.2.1. Ksilol

Ksilol (C_8H_{10}) je zapaljiva tekućina i para. Uklopljen je u benzin i koristi se kao otapalo u proizvodima kao što su boje. Također se koristi u proizvodnji drugih industrijskih kemikalija, guma, plastike i kože. Ksilol se, uglavnom, ispušta u okoliš u industrijskim područjima i iz motornih vozila. Izlaganje opće populacije utjecajima ksilola mogu nastati iz dima cigareta i ispušnih emisija vozila. Ljudi, također, mogu udisati ksilol u malim količinama kada se koriste proizvodi koji sadrže ksilol, primjerice, boje i ljepilo. U laboratorijima se koristi za čišćenje preparata od umerzijskog ulja, u histološkim laboratorijima za obradu tkiva i bojanje. Ksilol se u stomatologiji koristi kao otapalo.



Slika 3. Strukturna formula ksilola

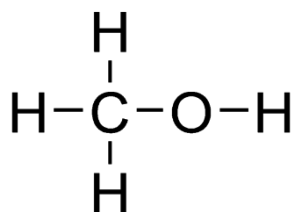
Ako se ksilol koristi dugotrajno u laboratoriju bez odgovarajućih uvjeta za rad, bez digestora ili sigurnosnog ormara za njegovo skladištenje, može izazvati razne probleme. Tako udisanje para ksilola uzrokuje nadraženost nosa, grla i respiratornog trakta. Gutanje može izazvati iritacije ždrijela i ozbiljne želučane iritacije s osjećajem pečenja u grlu, mučninom i povraćanjem. Plućna aspiracija može izazvati pneumonitis i akutne plućne ozljede. Sistemske pojave uključuju mučninu, povraćanje, vrtoglavicu, glavobolju, anoreksiju, zbunjenost, pospanost, ataksiju, respiratorne depresije i komu, plućni edem, metaboličku acidozu i hipokalijemiju, konvulzije. Srčane poteškoće uključuju kardiomiopatije, ventrikularnu aritmiju, ventrikularnu fibrilaciju, srčani zastoj i infarkt miokarda. Ksilol može uzrokovati blaga, reverzibilna povećanja aktivnosti aminotransferaza i akutno zatajenje bubrega. Na koži će izazvati iritaciju i eritem s nekrozom ako je kontakt produljen. Nakon dodira s očima, može izazvati iritaciju, konjuktivitis i prolazna površna oštećenja rožnice (9).

Ksilol se metabolizira, uglavnom, oksidacijom u metilbenzil alkohol, a zatim daljnjom oksidacijom u odgovarajuće metilbenzojeve kiseline. Ti spojevi mogu biti konjugirani s glicinom kako bi se dobilo metil hipurat ili s UDP-glukuronatom i tada tvore acil-glukuronide. Prethodne citogenetičke studije pokazale su da kulture humanih limfocita periferne krvi imaju vlastite metaboličke sposobnosti za pretvaranje aromatskih ugljikovodika u aktivni oblik. U dobrovoljaca izloženih udisanju ksilola, zadržavanje meta-ksilola u plućima je oko 60%. Više od 70% apsorbiranog meta-ksilola izlučuje se kao metabolit putem urina. Eliminacija je brza, s biološkim poluvremenom od jednog sata. Uklanjanje ksilola iz potkožnog masnog tkiva je sporo, s poluvremenom 25 – 128 sati (10).

1.2.2. Metanol

Metanol (CH₃OH) je alkohol s jednim ugljikovim atomom, lako je zapaljiv, miješa se s vodom i vrlo je neugodna mirisa.

Koristi se u proizvodnji kemikalija, boja, otapala, lakova, razrjeđivača boja, određenih sredstava za čišćenje, "antifrizi". Metanol se, također, koristi u proizvodnji goriva, gdje se miješa s benzinom. Male količine ovog spoja se mogu dodati u otpadne vode, za blokiranje denitrificirajućih bakterija (bakterije koje prevode nitrata za dušik). U laboratoriju, metanol se može koristiti kao denaturirajuće sredstvo za gel elektroforezu, u spektroskopiji, HPLC-u (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, engl. *High performance liquid chromatography*) i kao otapalo.



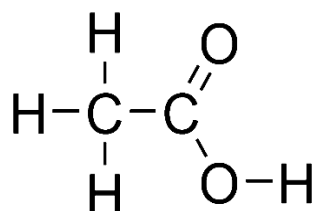
Slika 4. Strukturna formula metanola

Dugotrajno korištenje i izlaganje metanolu u laboratoriju bez odgovarajućih uvjeta za rad, bez digestora ili sigurnosnog ormara za njegovo skladištenje, može izazvati razne probleme. Može biti toksičan nakon udisanja, oralnog unosa ili kožne izloženosti. Otrovan je ako se udiše, u dodiru s kožom i ako se proguta. Akutna toksičnost iz metanola manifestira se kao depresija CNS-a (središnji živčani sustav, engl. *central nervous sistem*), nakon čega slijedi latentni period trajanja 8-36 h, a ponekad i do 48 sati. Nakon toga, razvija se metabolička acidoza, glavobolja, mučnina i problemi s vidom. Može se pojaviti fotofobija ili zamagljen vid, znatno smanjena vizualna oštrina i potpuna sljepoća. Samo 4-10 mL metanola u odraslih može izazvati trajno oštećenje. Koma i smrt se mogu pojaviti nakon značajne izloženosti. Smatra se da je minimalna smrtonosna doza u području od 300 do 1000 mg kg⁻¹. Teška opijenost, ako se preživi, može uzrokovati trajno oštećenje središnjeg živčanog sustava

i trajnu sljepoću. Kronična izloženost inhalacijama niskih koncentracija metanola može rezultirati glavoboljama i iritacijama očiju.

1.2.3. Octena kiselina

Octena kiselina (CH_3COOH) je bezbojna, zapaljiva tekućina oštra mirisa koja se miješa s vodom. Velike količine octene kiseline koriste se u proizvodnji tinte, boja, pesticida, lijekova, konzervansa, gume i plastike. U laboratorijima se koristi kao otapalo.



Slika 5. Strukturna formula octene kiseline

Izlaganje octenoj kiselini u laboratoriju bez odgovarajućih uvjeta za rad, bez digestora ili sigurnosnog ormara za njezino skladištenje, može izazvati različite probleme. Udisanje uzrokuje nadraženost očiju i nosa s grloboljom, kašalj, stezanje u prsima, glavobolju, groznicu, teško disanje, tahikardiju i zbunjenost, kemijski pneumonitis, dispneju, plućni edem s povećanjem daha, razvijanje hipoksije i cijanoze što može potrajati do 36 sati. Gutanje malih količina će dovesti do opekline u ustima i grlu s mučninom i povraćanjem. Veće količine, također, mogu uzrokovati epigastričnu bol i proljev. Dermalno izlaganje uzrokuje opekline, uništavanje površine epitela i submukoze. Izlaganje očiju uzrokuje bol, suzenje, konjunktivitis i fotofobiju. Kisele otopine mogu izazvati opekline rožnice. Doze 20-50 g ili 60-70 ml koncentrirane octene kiseline smatraju se smrtonosnim.

2. HIPOTEZA

Pretpostavka ovog istraživanja je da kemikalije uzrokuju veću genetičku nestabilnost sestrinskih kromatida.

3. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) utvrditi učinak metanola na izmjene sestrinskih kromatida u limfocitima periferne krvi
- 2) utvrditi učinak ksilola na izmjene sestrinskih kromatida u limfocitima periferne krvi
- 3) utvrditi učinak octene kiseline na izmjene sestrinskih kromatida u limfocitima periferne krvi
- 4) odrediti mitotički indeks različitih koncentracija metanola u limfocitima periferne krvi
- 5) odrediti mitotički indeks različitih koncentracija ksilola u limfocitima periferne krvi
- 6) odrediti mitotički indeks različitih koncentracija octene kiseline u limfocitima periferne krvi.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Kohortna studija.

4.2 Ispitanici

Ispitanici su osobe mlađe od 40 godina koje na radnom mjestu nisu izložene kemikalijama i ne rade u zoni zračenja. Kriteriji za isključivanje ispitanika su da su osobe starije od 40 godina, podvrgnute zračenju zadnjih 6 mjeseci i da su koristile antibiotike unazad mjesec dana. Svaki ispitanik je služio sam sebi kao kontrola.

Prije početka istraživanja od svih ispitanika zatražen je pristanak za sudjelovanje i potpisivanje informiranog pristanka. Ispitanici su ispunili upitnike o životnim navikama i obiteljskoj anamnezi. Krv za *in vitro* analizu izmjene sestrinskih kromatida uzorkovana je od strane kvalificiranog medicinskog osoblja u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Osijek. Krv se vadila u sterilne epruvete s podtlakom i natrijevim heparinom koji sprječava koagulaciju.

4.3. Materijali i metode

4.3.1. Materijali

Potrebne otopine, puferi i reagensi:

- Epruveta s Na-heparinom
- Medij F-10 Ham (EuroClone, kat. br. N6908-500ML)
- Fitohemaglutinin (PHA) (Gibco, kat. br. 10576-015)
- L-glutamin (Lonza, kat. br. 17-605C)
- 5-bromodeoksiuridin (BrdU) (Sigma, kat. br. B5002-100MG)

- Colcemid (EuroClone S.p.A., kat.br. ECM0040N)
- 0.075 M KCl - 'hipotonija' pripremljena otapanjem KCl (Sigma, kat. br. 7447-40-7) u destiliranoj vodi
- Fiksativ = metanol (Sigma, kat.br. 32213) : ledena octena kiselina(Sigma, kat.br. 27225) = 3 : 1 (držati na +4°C)
- Gurr Buffer Tablets (Gibco, kat.br. 10582-013)
- Hoechst 33258 (Sigma, kat. br. 861405-100MG)
- 20xSSC pufer (Sigma, kat. br. F6639-1L)
- Giemsa boja (Kemijsko tehnički laboratorij Šlaković)
- HCl (Sigma, kat.br. 30721)
- Ksilol (Einecs, kat. br. 1330-20-7 L)

Potrebna oprema:

- sterilni kabinet s vertikalnim strujanjem zraka (Uniflow aura-VF72 laminar)
- Eppendorf pipete od 200 µl i 1000 µl
- sterilni filter nastavci za pipete od 200 µl i 1000 µl
- Hera cell inkubator s CO₂ (Heraeus)
- centrifuga (Eppendorf 5804)
- vaga (Mettler Toledo)
- vakuum sisaljka
- digestor
- vorteks (Vortex Genie 2)
- Pasteur plastične pipete od 3 ml
- predmetna stakla
- UV lampa (Fisher Bioblock Scientific)

- raspršivač metafaza (OptiChrome Euroclone)
- svjetlosno-fluorescentni mikroskop s kamerom (Zeiss Axioskop2 MOT)
- DPC Controller 1.2.1.108 (Olympus Optical) program za slikanje

4.3.1. Priprema kemikalija

Istraživanje je rađeno na limfocitima periferne krvi izvađene u epruvete s Na-heparinom. Svaka koncentracija kemikalije kao i kontrola napravljena je u duplikatu.

Za pripremu kemikalija je potreban HBSS (Hankova izbalansirana otopina, engl. *Hank's balanced salt solution*). HBSS je izotonična otopina koja održava stalan pH i osmotski tlak. To je važno zbog očuvanja strukture stanica jer pogrešna količina iona u otopini može dovesti do skupljanja ili pucanja stanica. Glavne komponente HBSS-a su: natrij, kalij, kalcij, magnezij i kloridi.

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

IZRAČUN:

$$M_r(\text{ksilol}) = 106,6 \text{ g/mol} = 106600 \text{ mg/mmol}$$

Radne otopine :

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

$$C_1 = 0.1\% = 0.001 \text{ g/ml} \rightarrow 999 \mu\text{l HBSS} + 1 \mu\text{l ksilola}$$

$$C_2 = 1\% = 0.01 \text{ g/ml} \rightarrow 990 \mu\text{l HBSS} + 10 \mu\text{l ksilola}$$

$$C_3 = 2\% = 0.02 \text{ g/ml} \rightarrow 980 \mu\text{l HBSS} + 20 \mu\text{l ksilola}$$

$$V_{\text{konačni}} = 5 \text{ ml}$$

$$V_{\text{početni}} = 2,5 \text{ } \mu\text{l}$$

$$C_{k1} = \frac{c_{p1} \times V_p}{V_k} = \frac{0,001 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 2,5 \times 10^{-3} \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0,0000005 \text{ g/ml} = 0,0005 \text{ mg/ml}$$

$$C_{k1} = \frac{0,0005 \text{ mg/ml}}{106600 \text{ mg/mmol}} = 0,00469 \times 10^{-6} \text{ mmol/ml} = 0,00469 \text{ } \mu\text{M} = 4,69 \text{ nM}$$

$$C_{k2} = \frac{c_{p2} \times V_p}{V_k} = \frac{0,01 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 2,5 \times 10^{-3} \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0,000005 \text{ g/ml} = 0,005 \text{ mg/ml}$$

$$C_{k2} = \frac{0,005 \text{ mg/ml}}{106600 \text{ mg/mmol}} = 0,0469 \times 10^{-6} \text{ mmol/ml} = 0,0469 \text{ } \mu\text{M} = 46,9 \text{ nM}$$

$$C_{k3} = \frac{c_{p3} \times V_p}{V_k} = \frac{0,02 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 2,5 \times 10^{-3} \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0,00001 \text{ g/ml} = 0,01 \text{ mg/ml}$$

$$C_{k3} = \frac{0,01 \text{ mg/ml}}{106600 \text{ mg/mmol}} = 0,0938 \times 10^{-6} \text{ mmol/ml} = 0,0938 \text{ } \mu\text{M} = 93,8 \text{ nM}$$

Korištene su tri koncentracije octene kiseline koncentracije 1%, 10% i 20%. Za svaku koncentraciju je pripremljeno 1000 μl radne otopine.

IZRAČUN:

$$M_r (\text{octena kiselina}) = 60,05 \text{ g/mol} = 60050 \text{ mg/mmol}$$

Radne otopine :

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

$$C_1 = 1\% = 0.01 \text{ g/ml} \rightarrow 990 \text{ } \mu\text{l HBSS} + 10 \text{ } \mu\text{l ksilola}$$

$$C_2 = 10\% = 0.1 \text{ g/ml} \rightarrow 900 \text{ } \mu\text{l HBSS} + 100 \text{ } \mu\text{l ksilola}$$

$C_3 = 20\% = 0.2 \text{ g/ml} \rightarrow 800 \text{ } \mu\text{l HBSS} + 200 \text{ } \mu\text{l ksilola}$

$V_{\text{konačni}} = 5 \text{ ml}$

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

$$C_{k1} = \frac{C_{p1} \times V_p}{V_k} = \frac{0,01 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 16 \times 10^{-3} \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0,000032 \text{ g/ml} = 0,032 \text{ mg/ml}$$

$$C_{k1} = \frac{0,032 \text{ mg/ml}}{60050 \text{ mg/mmol}} = 0,5328 \times 10^{-6} \text{ mmol/ml} = 0,5328 \text{ } \mu\text{M}$$

$$C_{k2} = \frac{C_{p2} \times V_p}{V_k} = \frac{0,1 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 16 \times 10^{-3} \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0,00032 \text{ g/ml} = 0,32 \text{ mg/ml}$$

$$C_{k2} = \frac{0,32 \text{ mg/ml}}{60050 \text{ mg/mmol}} = 5,3288 \times 10^{-6} \text{ mmol/ml} = 5,3288 \text{ } \mu\text{M}$$

$$C_{k3} = \frac{C_{p3} \times V_p}{V_k} = \frac{0,2 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 16 \times 10^{-3} \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0,00064 \text{ g/ml} = 0,64 \text{ mg/ml}$$

$$C_{k3} = \frac{0,64 \text{ mg/ml}}{60050 \text{ mg/mmol}} = 10,6578 \times 10^{-6} \text{ mmol/ml} = 10,6577 \text{ } \mu\text{M}$$

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

IZRAČUN:

$M_r(\text{metanol}) = 32,04 \text{ g/mol} = 32040 \text{ mg/mmol}$

Radne otopine :

C0 = 0% → 1000 µl HBSS (kontrola)

C1 = 1% = 0.01 g/ml → 990 µl HBSS + 10 µl ksilola

C2 = 10% = 0.1 g/ml → 900 µl HBSS + 100 µl ksilola

C3 = 20% = 0.2 g/ml → 800 µl HBSS + 200 µl ksilola

$V_{\text{konačni}} = 5 \text{ ml}$

$V_{\text{početni}} = 214 \text{ µl}$

$$C_{k1} = \frac{C_{p1} \times V_p}{V_k} = \frac{0,01 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 0,214 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0,000428 \text{ g/ml} = 0,428 \text{ mg/ml}$$

$$C_{k1} = \frac{0,428 \text{ mg/ml}}{32040 \text{ mg/mmol}} = 13,3583 \times 10^{-6} \text{ mmol/ml} = 13,3583 \text{ µM}$$

$$C_{k2} = \frac{C_{p2} \times V_p}{V_k} = \frac{0,1 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 0,214 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0,00428 \text{ g/ml} = 4,28 \text{ mg/ml}$$

$$C_{k2} = \frac{4,28 \text{ mg/ml}}{32040 \text{ mg/mmol}} = 133,583 \times 10^{-6} \text{ mmol/ml} = 133,583 \text{ µM}$$

$$C_{k3} = \frac{C_{p3} \times V_p}{V_k} = \frac{0,2 \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times 0,214 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} = 0,00856 \text{ g/ml} = 8,56 \text{ mg/ml}$$

$$C_{k3} = \frac{8,56 \text{ mg/ml}}{32040 \text{ mg/mmol}} = 267,166 \times 10^{-6} \text{ mmol/ml} = 267,166 \text{ µM}$$

4.3.2. Kultivacija stanica

Prije početka kultivacije treba prirediti sve potrebne kemikalije i otopine koje se koriste. Koristi se medij F-10 Ham sa L-glutaminom i Na-bikarbonatom, sterilno filtriran, pogodan za stanične kulture. Medij treba rastočiti u sterilne epruvete volumena 5.5ml³ i čuvati na +4°C. Prije nasađivanja vade se epruvete na sobnu temperaturu na 15 minuta. Medij osigurava stanicama hranjive tvari, esencijalne elemente, fiziološku koncentraciju soli, osmolarnost i optimalan pH.

Korišten je fitohemaglutinin, sterilni ekstrakt iz *red kidney bean Phaseolus vulgaris*, koji je rastočen u epruvete od 1.5 ml i skladišten na -20°C. PHA je mitogen što znači da potiče limfocite na diobu. T limfociti se transformiraju u blaste, nakon čega slijedi RNA sinteza i sinteza DNA.

L-glutamin je esencijalna aminokiselina koja je potrebna stanicama koje prolaze sve faze staničnog ciklusa, posebno tijekom diobe stanica. L-glutamin je rastočen u epruvete od 1.5 ml i skladišten na -20°C.

5-bromodeoksiuridin (BrdU) je analog timidina, koji se ugrađuje u novosintetizirani lanac DNA. Korištena je radna otopina BrdU priređena otapanjem 10 mg BrdU u 10 ml fiziološke otopine i skladištena na -20°C.

Epruvete moraju biti u mraku zbog dodatka kemikalija koje su osjetljive na svjetlost, te se pod njenim utjecajem razgrađuju.

500 µl krvi izvađene u epruvetu s Na-heparinom je pomoću pipete od 1000 µl dodano u epruvetu koja sadržava 5 ml medija, 30 µl PHA (fitohemaglutinin), 60 µl glutamina i 50 µl BrdU (5-bromodeoksiuridin), te promiješano i stavljeno na inkubaciju u inkubator (Hera cell) na 37 °C. Postupak nasađivanja obavlja se u sterilnom kabinetu s vertikalnim strujanjem zraka, Uniflow aura-VF72 laminar.

Nakon 24 sata inkubacije na 37 °C, dodaje se kemikalija čiji utjecaj se ispituje, dok se u kontrolu dodaje isti volumen HBSS pufera. Epruvete se promiješaju i vrata u inkubator na 1 sat, nakon čega se kemikalija ispire. Volumen kemikalije koja se dodaje je 2,5 µl ksilola, 214 µl metanola ili 16 µl octene kiseline. Kemikalija se ispire na način da se epruvete centrifugiraju i supernatant odsisa pipetom. Na talog se dodaje svježi medij sa PHA, L-glutaminom i BrdU, dobro se promiješa i vraća u inkubator do 72 sata.

Limfociti za vrijeme rasta u kulturi prolaze sve faze staničnog ciklusa. Da bi se mogla analizirati oštećenja na kromosomima, potrebno je zaustaviti diobu u metafazi jer su tada kromosomi najbolje uočljivi. To se postiže dodavanjem citostatika kolcemida u kulture tijekom posljednja dva sata kultiviranja. Kolcemid sprječava stvaranje diobenog vretena pa metafazni kromosomi ostaju raspršeni u citoplazmi.

4.3.3. Izrada

Izrada i preparati se moraju raditi u mraku ili pod slabim svjetlom, a svi koraci dodavanja otopina u digestoru.

Epruvete se centrifugiraju 4 minute na 720 g. U centrifugirane epruvete iz kojih je uklonjen supernatant pomoću vakuum sisaljke, dodaje se hipotonična otopina KCl.

0.075 M KCl ('hipotonija') priprema se neposredno prije početka izrade otapanjem 0,56 g KCl u 100 ml destilirane vode i drži na sobnoj temperaturi. Hipotonična otopina se koristi za liziranje eritrocita i njihovo odvajanje od taloga u kojem se nalaze limfociti koji bubre, a unutar njih se kromosomi rasprše.

Dodatkom hipotonične otopine liziraju se i odvajaju eritrociti, a talog u kojem se nalaze limfociti se pročišćava kroz nekoliko uzastopnih centrifugiranja i nakon toga se fiksira dodatkom svježe pripremljenog fiksativa. Fiksacijom se uništavaju stanice, a morfologija kromosoma ostaje očuvana i sprječava se daljnje bubrenje stanice. Fiksativ se dodaje kap po kap Pastuerovom pipetom miješajući epruvetu pomoću vorteks miksera.

Nakon toga epruvete se centrifugiraju, supernatant odsisa vakuum sisaljkom i pročišćena suspenzija stanica se može koristiti za izradu preparata.

Treba pripremiti uvijek novi fiksativ od metanola i ledene octene kiseline u omjeru 3 : 1 i držati ga na +4°C.

4.3.4. Priprema preparata

Dvije kapi pročišćene suspenzije limfocita pomoću Pasteurove pipete nakapa se na prethodno oprana predmetna stakla. Predmetna stakla treba oprati u 200ml destilirane vode s 2ml HCl i dobro isprati destiliranom vodom. Predmetno staklo na koje je nakapana suspenzija limfocita stavlja se u raspršivač metafaza (OptiChrome Euroclone) na par minuta. Raspršivač metafaza služi za smanjivanje utjecaja nestabilnih parametara, temperature i vlage, čime se definiraju pogodni radni uvjeti koji imaju važan utjecaj na kvalitetu metafaza. Raspršivač metafaza ima filtere s aktivnim ugljenom koji eliminira pare fiksativa prilikom sušenja preparata te se tako smanjuje izloženost osobe koja radi takve analize štetim parama metanola i octene kiseline. OptiChrome Euroclone može eliminirati probleme kao što su zatvorene metafaze, gubitak kromosoma, prisutnost citoplazme u pozadini, loše bojanje i lomljenje kromosoma.



Slika 6. Raspršivač metafaza OptiChrome Euroclone

Nakon toga se preparat ostavi, zaštićen od svjetlosti, da se suši na zraku. Nakon dva dana, kada su se preparati osušili, prekriju se Hoeschst 33258 bojom na 15 minuta, također, u mraku. Otopina Hoeschta (bisbenzimid-trihidroklorid) priredi se otapanjem 15 mg Hoechsta izvaganog na analitičkoj vagi (Mettler Toledo) u 100 ml destilirane vode prije samog korištenja.

Preparati se isperu destiliranom vodom te urone u otopinu 2x SSC pufera (otopina soli natrij-citrata, engl. *saline-sodium citrate*) sobne temperature i ostavi ih se pod UV lampom (Fisher Bioblock Scientific) 50 minuta, nakon čega se ponovno ispiru destiliranom vodom i inkubiraju u 2xSSC puferu 50 minuta na 65°C. 2x SSC pufer se pripremi razrijeđivanjem 20x SSC pufera deset puta, odnosno miješanjem 7ml 20x SSC i 63 ml destilirane vode. SSC pufer se koristi za kontrolu kiselosti.

Nakon inkubacije preparati se ispiru destiliranom vodom i suše na sobnoj temperaturi u mraku.

Osušene preparate uronimo u 2%-tnu otopinu Giemse u fosfatnom puferu i bojimo 5 minuta, a zatim isperemo u destiliranoj vodi i ostavimo ih da se suše na zraku. 2%-tnu otopinu priredimo miješanjem 5 ml Giemsa boje i 200 ml fosfatnog pufera. Kada se preparati oboje Giemsom, ne treba više raditi u mraku.

"Nova" kromatida u koju se ugradio 5-bromodeoksiuridin se oboji svjetlije zbog različitog afiniteta za vezanje boje pa se svjetlosnim mikroskopom mogu razlikovati mjesta na kojima je došlo do izmjene između "stare" i "nove" kromatide.

4.4. Analiza preparata

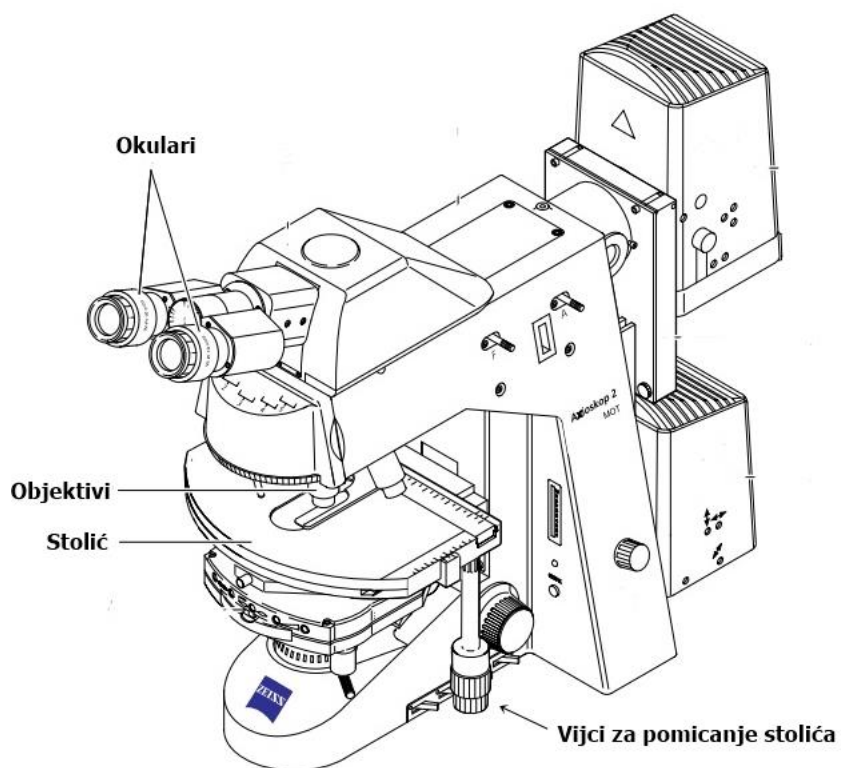
Analiza preparata napravljena je na svjetlosno-fluorescentnom mikroskopu s kamerom (Zeiss Axioskop2 MOT). Metafaze se analiziraju direktnim gledanjem kroz okulare mikroskopa. Nakon pronalaska metafaze pogodne za analizu, broj izmjena sestrinskih kromatida broji se pod najvećim povećanjem mikroskopa (1000x) uz obavezno korištenje imerzijskog ulja.

Analizira se 50 metafaza za svaku koncentraciju kemikalije i broje se sve izmjene te se taj broj zapisuje u tablicu. Također se svaka metafaza slika pomoću DPC Controller

programom. Za svaku koncentraciju kemikalije mikroskopirano je 300 stanica za određivanje mitotičkog indeksa.

Učestalost izmjena sestrinskih kromatida dobije se tako da se zbroje sve izmjene u 50 metafaza i rezultat podijeli s 50.

Raspon predstavlja najmanji broj izmjena nađenih u jednoj metafazi i najveći broj izmjena u drugoj metafazi iste koncentracije ispitivane kemikalije.



Slika 7. Shematski prikaz mikroskopa Zeiss Axioskop2 MOT

4.5. Statističke metode

Dobiveni rezultati obrađeni su primjenom deskriptivne statistike i studentovim t-testom. Numerički podaci dani su kao srednja vrijednost i standardna devijacija, te medijan i 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

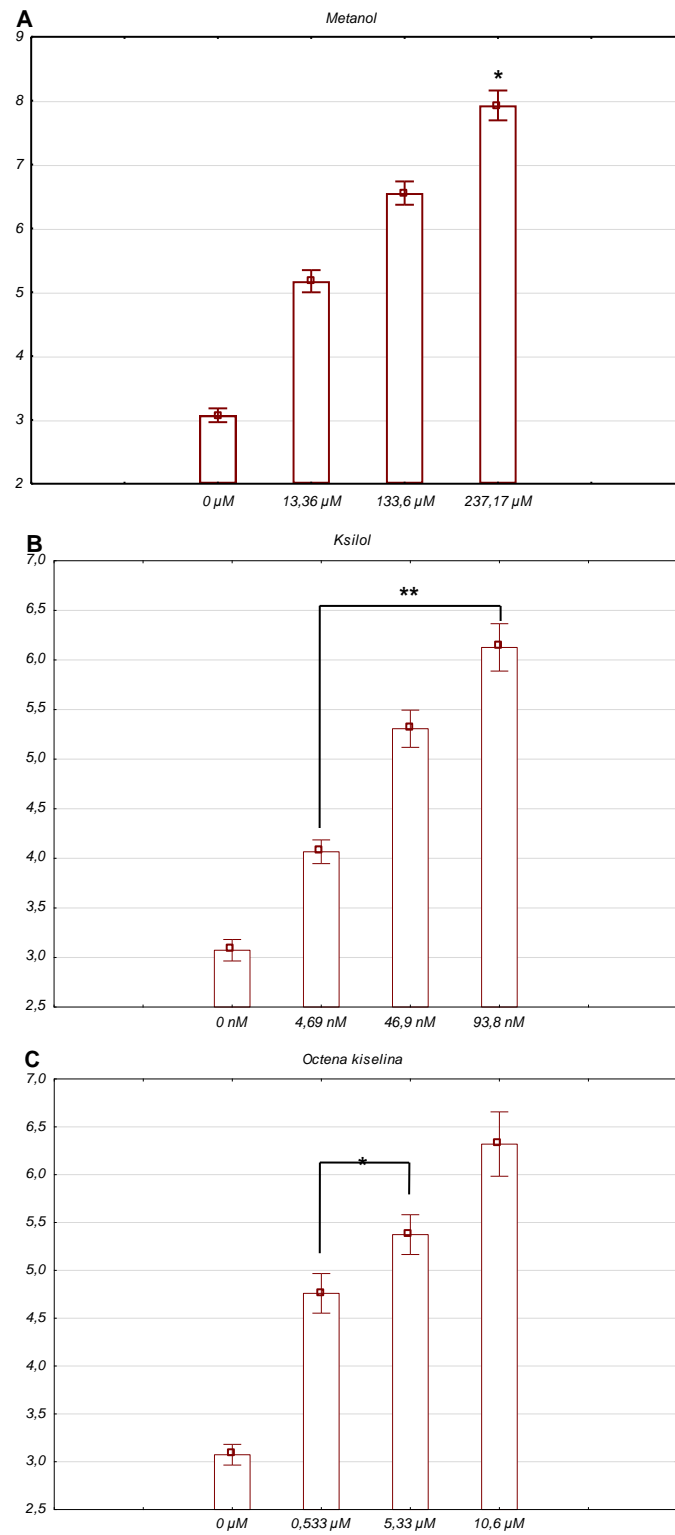
U istraživanju su sudjelovale tri ženske osobe prosječne dobi od 27 godina koje ne rade s kemikalijama niti u zoni zračenja, nisu bile podvrgnute zračenju zadnjih 6 mjeseci i nisu koristile antibiotike unazad mjesec dana. Kod svakog ispitanika je analizirano po 50 metafaza za kontrolni uzorak i za sve tri koncentracije ispitivanih kemikalija kako bi se dobila srednja vrijednost SCE. Mitotički indeks je izračunat na povećanju 200x u tri vidna polja za svaki analizirani uzorak.

5.1. Broj izmjena sestrinskih kromatida

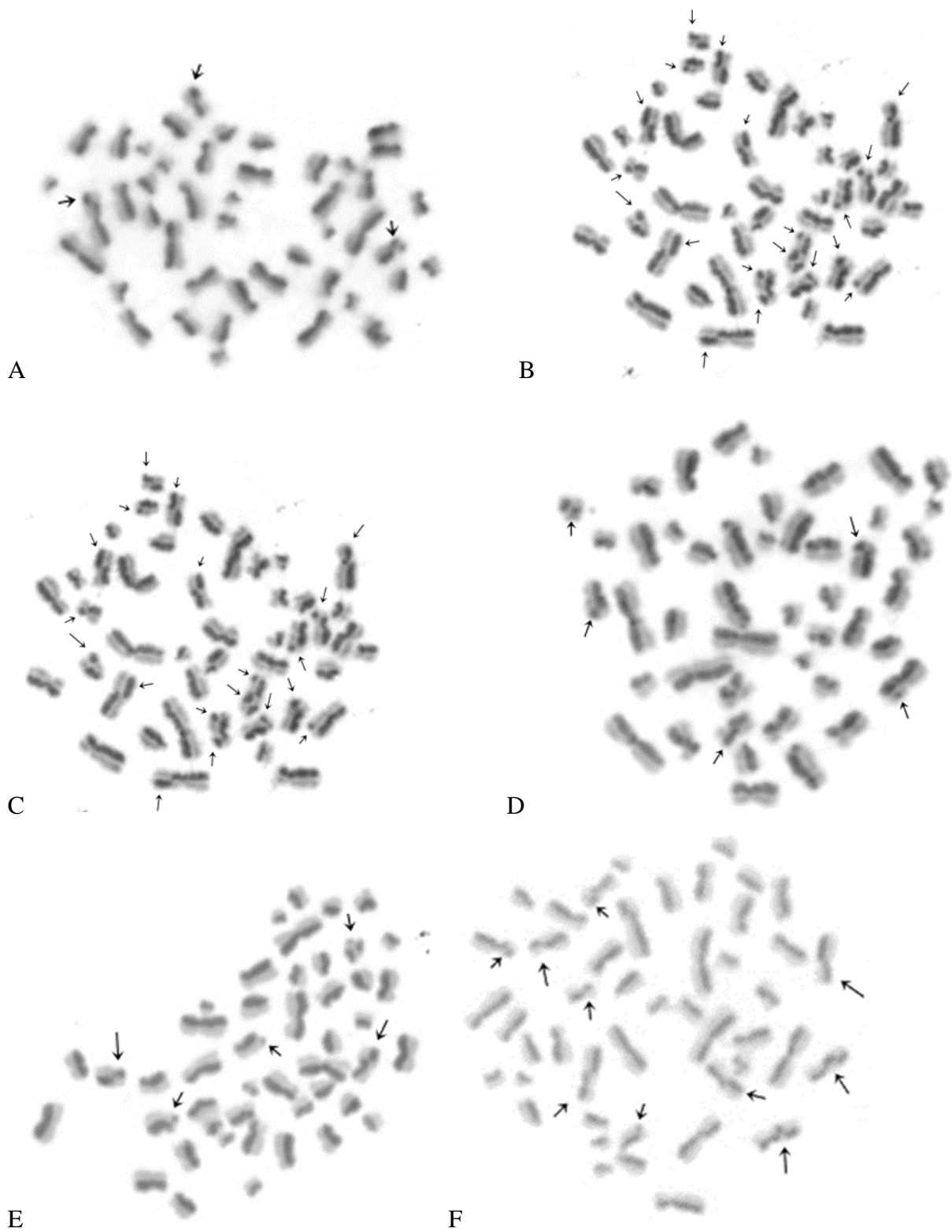
Tablica 1. Broj izmjena sestrinskih kromatida različitih koncentracija metanola, ksilola i octene kiseline u tri ispitanika

Kemikalija	Koncentracija	Srednja vrijednost \pm SD	Medijan	95% raspon	<i>P</i> vrijednost
Metanol	0 μ M	2,48 \pm 1,15	3,00	0,96 – 1,43	-
	13,36 μ M	5,17 \pm 0,32	5,00	0,16 – 1,99	0,102
	133,58 μ M	6,55 \pm 0,28	6,50	0,15 – 1,77	0,230
	237,17 μ M	7,93 \pm 0,58	7,67	0,30 – 3,64	0,025*
Ksilol	0 nM	3,44 \pm 1,55	3,00	1,29 – 1,94	-
	4,69 nM	4,07 \pm 0,22	4,00	0,11 – 1,38	0,191
	46,9 nM	5,31 \pm 0,25	5,17	0,13 – 1,59	0,645
	93,8 nM	6,13 \pm 0,16	6,00	0,08 – 0,98	0,559
Octena kiselina	0 μ M	3,30 \pm 1,29	3,00	1,08 – 1,62	-
	0,533 μ M	4,76 \pm 0,42	4,50	0,22 – 2,62	0,107
	5,33 μ M	5,37 \pm 0,51	5,33	0,26 – 3,19	0,145
	10,66 μ M	6,32 \pm 0,36	6,33	0,22 – 2,61	0,144

SD – standardna devijacija; *t-test, statistički značajna razlika $P < 0,05$



Slika 8. Srednja vrijednost broja izmjena sestrinskih kromatida (SCE) sa standardnom greškom pri različitim koncentracijama kemikalija. Studentov t-test * $P=0,034$ i ** $P=0,006$



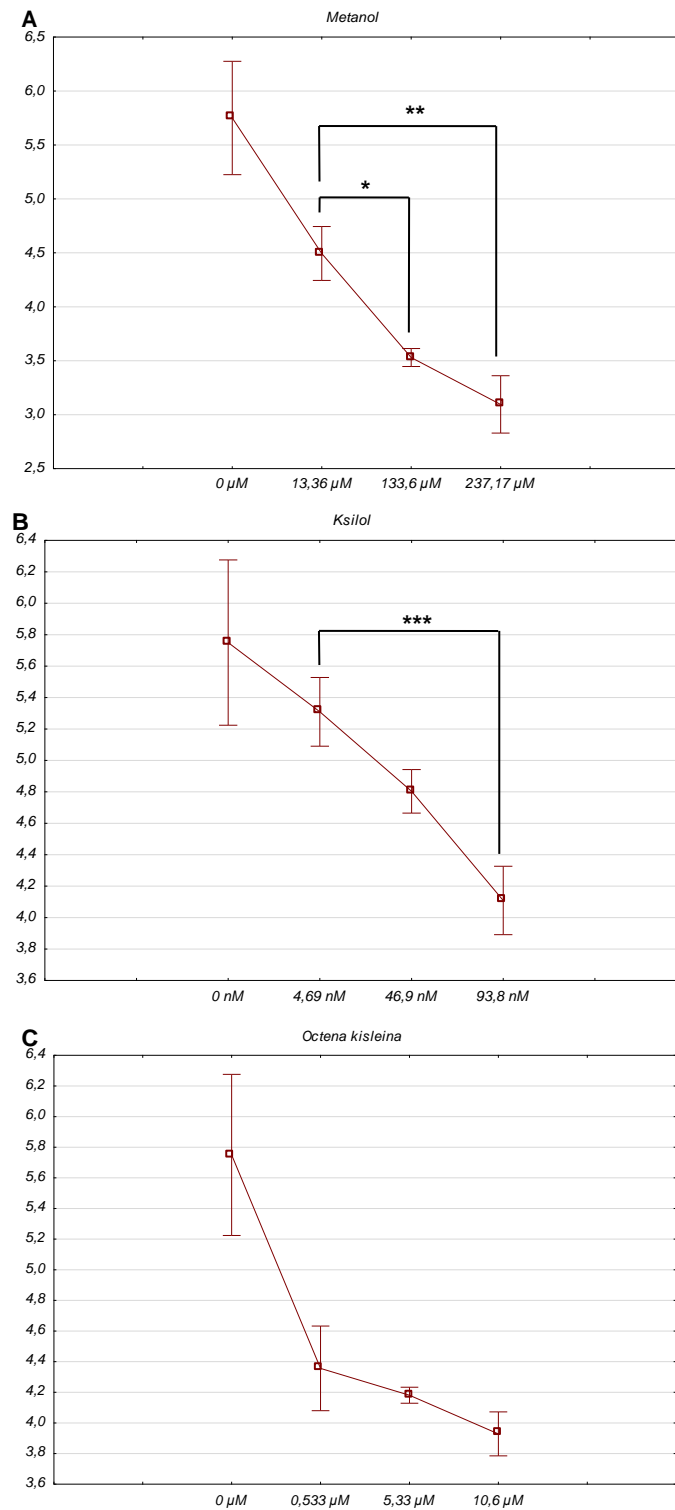
Slika 9. Izmjene sestrinskih kromatida nastale kao posljedica rekombinantnog popravka. A - Kontrola; B - 20% metanol; C - 20% octena kiselina; D - 1% octena kiselina; E - 0,1% ksilol; F - 1% ksilol

5.2. Mitotički indeks ispitivanih kemikalija

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 μ M	5,75 \pm 0,91	5,31	0,47 – 5,72	-
	13,36 μ M	4,49 \pm 0,43	4,35	0,23 – 2,72	0,097
	133,58 μ M	3,53 \pm 0,14	3,52	0,08 – 0,91	0,014*
	237,17 μ M	3,09 \pm 0,46	3,56	0,24 – 2,89	0,011*
Ksilol	0 nM	5,74 \pm 0,92	5,31	0,48 – 5,71	-
	4,69 nM	5,31 \pm 0,38	5,17	0,20 – 2,38	0,482
	46,9 nM	4,80 \pm 0,24	4,78	0,12 – 1,51	0,157
	93,8 nM	4,11 \pm 0,38	3,95	0,20 – 2,37	0,045*
Octena kiselina	0 μ M	5,76 \pm 0,90	5,31	0,47 – 5,73	-
	0,533 μ M	4,36 \pm 0,48	4,45	0,25 – 3,01	0,079
	5,33 μ M	4,18 \pm 0,09	4,20	0,05 – 0,57	0,041*
	10,66 μ M	3,93 \pm 0,25	4,05	0,13 – 1,56	0,029*

SD – standardna devijacija; *t-test, statistički značajna razlika $P < 0,05$



Slika 10. Srednja vrijednost mitotičkog indeksa (MI) sa standardnom greškom pri različitim koncentracijama kemikalija. Studentov t-test $*P=0,019$; $**P=0,021$; $***P=0,01$

6. RASPRAVA

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 izmjena sestrinskih kromatida pri koncentraciji metanola od 237,17 μM ($P=0,025$).

Potvrđena je hipoteza da kemikalije uzrokuju povećan broj SCE, ali statistički značajan rezultat dobiven je samo za najveću koncentraciju metanola (237,17 μM) dok druga povećanja broja SCE nisu bila statistički značajna (Tablica 1).

Alkohol ima mutagen, kancerogen i teratogen učinak na čovjeka. Etanol i drugi alkoholi, kao što su aldehidi, inhibiraju sintezu RNA u stanicama. Prvi metabolit metanola je formaldehid koji je vrlo toksičan. Metanol se pojavljuje u alkoholnim pićima kao nečistoća. Za njega je važan, kao i za svaki alkohol, njegov teratogeni učinak (npr. fetalni alkoholni sindrom, FAS) (11).

Za razliku od naših rezultata, Obe i Ristow (11) u svom istraživanju su pokazali kako alkohol nema izravan utjecaj na prijelomnu aktivnost kromosoma kod sisavaca i ljudskih stanica *in vitro*.

Iz Slike 8 vidljivo je da broj SCE raste s porastom koncentracije pojedine kemikalije. Tako postoji značajna statistička razlika u porastu broja SCE između koncentracije ksilola 4,69 nM i 93,8 nM ($P=0,006$) (Slika 8 B), kao i između koncentracija 0,53 μM i 5,33 μM octene kiseline ($P=0,034$) (Slika 8 C).

Pap i Varga (12) su u svom istraživanju pokazali kako ksilol i njegovi metaboliti ne pokazuju nikakav genotoksičan učinak, te da koncentracija od 50 mg/m^3 nije dovoljna da se mutageni učinak manifestira. Istraživanje je provedeno na muškarcima koji su profesionalno izloženi ksilolu. Za razliku od nas, oni su analizirali samo 20 metafaza, te također, nisu pronašli statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu.

Povećanje mortaliteta stanica opaženo je nakon izlaganja ksilolu, što se može povezati sa smanjenjem mitotičkog indeksa u našem istraživanju. Istraživanje je pokazalo da nema značajnih učinaka na SCE nakon izlaganja ksilolu koncentracijama do 250 pM u usporedbi s kontrolama dok s druge strane, pri višim koncentracijama ksilol izaziva značajno povećanje SCE u usporedbi s kontrolama (13).

Mnogi faktori koji se nalaze u životnom i radnom okolišu imaju karcinogene i mutagene učinke koji mogu uvelike pridonijeti pokretanju štetnih procesa u ljudskom tijelu koji dovode do nastanka neoplastičnih bolesti s ozbiljnim posljedicama na ljudsko zdravlje. Neki od tih faktora su pušenje, zlouporaba lijekova, utjecaj kemikalija i zračenja (14).

SCE metoda je prikladna za otkrivanje oštećenja kod ispitanika koji su izloženi svim vrstama alkilirajućih lijekova, lijekovima iz drugih skupina čije se djelovanje zasniva na alkiliranju DNA i svim lijekovima koji sadržavaju platinu, prokarbazinom, dakarbazinom te estramustinom. Međutim, pri odabiru SCE kao metode treba biti oprezan te uzeti u obzir i nedostatke analize, odnosno manjak specifičnosti u odnosu na druge raspoložive citogenetičke metode. Jedan od najvećih nedostataka analize SCE jest neodgovarajuća prediktivnost metode vezano uz rizik od pojave raka. Pojavu SCE nerijetko prate i zastoji u staničnim ciklusima (15). Povećan broj SCE nosi visok rizik od karcinoma, a može biti nasljedan ili uzrokovan mutagenima (16).

Žene, općenito, imaju nešto više vrijednosti SCE od muškaraca. Pretpostavlja se da je to zbog X kromosoma koji je veći od Y kromosoma (17). Primijećeno je da učestalost SCE raste i tijekom trudnoće, što se pripisuje učinku hormona. U mnogim istraživanjima utvrđena je pozitivna korelacija između povišenog SCE i pušenja, a u pušača su utvrđena i postojana oštećenja DNA koja omogućuju kasniju pojavu SCE. Uzimanje nekih antibiotika, također, može utjecati na pojavu. Ionizirajuće zračenje, općenito, značajno ne povišuje učestalost SCE, dok su ranija istraživanja dokazala pozitivan učinak ultrazvuka. Vrijednosti SCE mogu porasti u nekim bolestima ili kao posljedica liječenja, osobito, primjenom kemoterapije (15). Visoke vrijednosti SCE imaju osobe s nekim genetičkim poremećajima, kao što su Bloomov sindrom, Xeroderma pigmentosum (XP) i Fanconijeva anemija (FA) (18). Pojava genetske nestabilnosti, posebno spontanih SCE, je snažno povezana s karcinomom (19). Značajan porast učestalosti oštećenja je utvrđen i u limfocitima periferne krvi osoba izloženih pesticidima i benzenima (20).

U istraživanju provedenom 2013. godine ispitivan je genotoksični učinak benzena i njegovih derivata na radnike benzinskih postaja. Nakon što su usporedili rezultate SCE, istraživači su uočili da nema razlika u broju izmjena kod ispitanika koji imaju karcinom u obiteljskoj anamnezi i onih koji nemaju. Istraživači su zaključili da pojavljivanje karcinoma u obitelji nema utjecaj na povećanje SCE (17).

Antifertilna svojstva octene kiseline su prvi put zabilježena u Kini 1987. godine. Octena kiselina ometa normalnu pokretljivost i proizvodnju spermija. *In vivo* istraživanja s koštanom srži miševa i spermatogonalnim stanicama pokazala su povišene vrijednosti SCE u visokim, ali ne i na nižim dozama octene kiseline. Značajna povećanja SCE nisu zabilježena iako je SCE nešto veća u stanicama koje su izložene 1000 ng/ml octene kiseline. Statistički značajan porast SCE je zabilježen u nekim kulturama humanih perifernih limfocita izloženih octenoj kiselini *in vitro* (21). Tako je ovim istraživanjem dobivena statistički značajna razlika u broju SCE između 0,533 μM i 5,33 μM koncentracije octene kiseline ($P=0,034$), dok ista nije uočena između najmanje (0,533 μM) i najveće koncentracije octene kiseline (10,6 μM).

Mitotički indeks (MI) je brojčani omjer između stanica u mitozu (onih s vidljivim kromosomima) i ostalih stanica, a pokazuje intenzitet proliferacije stanica. Računa se prema formuli: $\frac{\text{Broj stanica u mitozu (metafaze)}}{\text{ukupan broj stanica}} \times 100$ i izražava se kao postotak.

Na temelju mitotičkog indeksa vidimo da povećanjem koncentracija kemikalija on opada što je statistički značajno za sve kemikalije (Tablica 2). Mitotički indeks pokazuje utjecaj kemikalije na G2 fazu staničkog ciklusa. Iz rezultata možemo zaključiti da sve testirane kemikalije (metanol, ksilol i octena kiselina) imaju antiproliferativni utjecaj povezan s genotoksičnošću. 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. Također, moguće je da zbog prevelikog oštećenja stanica i velikog broja kromatidnih izmjena ulazak stanica u mitozu pod utjecajem kemikalija je puno sporiji te stoga imamo manji broj stanica u mitozu.

Srednje vrijednosti mitotičkih indeksa sa standardnom devijacijom različitih koncentracija 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 mitotičkog indeksa s porastom koncentracije svake pojedine kemikalije.

Na Slici 10 grafički je prikazan pad mitotičkog indeksa s porastom koncentracija kemikalija. Postoji i statistički značajna razlika između pojedinih koncentracija kemikalija. Statistički značajna razlika uočena je između koncentracije metanola 13,36 μM i 133,58 μM ($P=0,021$) kao i pri koncentracijama od 13,36 μM i 237,17 μM ($P=0,019$). Značajna razlika postoji i između 4,69 nM i 93,8 nM koncentracije ksilola ($P=0,018$).

MI je korišten od strane mnogih istraživača za procjenu kromosomskih promjena u stanicama podvrgnutih raznim kemijskim i fizikalnim utjecajima. Ti faktori mogu utjecati na vrijeme potrebno za staničnu diobu (22).

Provedeno istraživanje je pokazalo kako je analiza izmjena sestrinskih kromatida dobra metoda za biološki nadzor osoba izloženih štetnim kemikalijama. Također, dokazano je da izloženost ksilolu, metanolu i octenoj kiselini uzrokuje povećanje broja SCE i smanjenje mitotičkog indeksa. Osobe koje su u svom životnom ili radnom okolišu izložene ispitivanim kemikalijama trebale bi se zaštititi od štetnog utjecaja, pridržavati se svih mjera opreza i zaštite na radu. Biomonitoring, odnosno biološki nadzor osoba je važan dio zdravstvenog nadzora osoba profesionalno izloženih štetnim utjecajima. Zasniva se na mjerenju raznih bioloških pokazatelja koji ukazuju na rane, još popravljive biološke učinke koji prethode pojavi zloćudnih i drugih bolesti. Na taj način se može utvrditi kakve su razine izloženosti štetnim utjecajima na radnim mjestima i rezultira li ta izloženost mjerljivim promjenama, te otkriti ispitanike s većom osjetljivošću genoma koji su pod povećanim rizikom. Osobe izložene karcinogenim i mutagenim tvarima imaju veći rizik oštećenje DNA. Rutinsko provođenje analize SCE može indirektno pokazati koliko su dobre mjere zaštite na radnom mjestu (23).

7. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenog ispitivanja genetičke nestabilnosti primjenom *in vitro* analize izmjene sestrinskih kromatida možemo zaključiti slijedeće:

- 1) Ksilol, metanol i octena kiselina uzrokuju povećan broj izmjena sestrinskih kromatida.
- 2) Statistički značajna razlika izmjena sestrinskih kromatida u odnosu na kontrolu dobivena je samo za najveću koncentraciju metanola (237,17 μM) dok druga povećanja broja SCE nisu bila statistički značajna.
- 3) Broj SCE raste s porastom koncentracije pojedine kemikalije. Postoji značajna statistička razlika u porastu broja SCE između koncentracije ksilola 4,69 nM i 93,8 nM ($P=0,006$), kao i između koncentracija 0,53 μM i 5,33 μM octene kiseline ($P=0,034$).
- 4) Povećanjem koncentracija kemikalija mitotički indeks opada što je statistički značajno za sve kemikalije.
- 5) Sve testirane kemikalije imaju antiproliferativni utjecaj povezan s genotoksičnošću.
- 6) Statistički značajna razlika MI uočena je između koncentracije metanola 13,36 μM i 133,58 μM ($P=0,021$) kao i pri koncentracijama od 13,36 μM i 237,17 μM ($P=0,019$). Značajna razlika postoji i između 4,69 nM i 93,8 nM koncentracije ksilola ($P=0,018$).

8. SAŽETAK

In vitro analiza izmjene sestrinskih kromatida (SCE, eng. *Sister Chromatid Exchanges*) je citogenetička metoda koja se primjenjuje u nadzoru profesionalno izloženih populacija mutagenim ili kancerogenim kemikalijama. Indirektan je pokazatelj razine oštećenja prisutnih u DNA prije njenog udvostručavanja.

Cilj istraživanja je bio utvrditi uzrokuje li izlaganje ksilolu, metanolu i octenoj kiselini veći rizik za nastanak oštećenja DNA.

Ispitanici su osobe mlađe od 40 godina koje ne rade s kemikalijama niti u zoni zračenja.

Analiza SCE zasniva se na 72-satnome uzgoju limfocita iz periferne krvi u hranjivom mediju u prisutnosti 5-bromodeoksiuridina (BrdU) i fitohemaglutinina (PHA). Za svaku kemikaliju testirane su tri različite koncentracije te kontrola.

Rezultati su pokazali da kemikalije uzrokuju povećanje broja izmjena sestrinskih kromatida u odnosu na kontrolu. Pri svim koncentracijama kemikalija postoji statistički značajno smanjenje mitotičkog indeksa ($P < 0,05$).

Ovim istraživanjem je pokazano kako sve testirane kemikalije uzrokuju povećan broj rekombinacijskih popravaka u limfocitima periferne krvi te imaju antiproliferativni učinak povezan s genotoksičnošću.

Biomonitoring je važan dio zdravstvenog nadzora osoba profesionalno izloženih štetnim utjecajima. Zasniva se na mjerenju bioloških pokazatelja koji ukazuju na rane biološke učinke koji prethode pojavi zloćudnih i drugih bolesti. Rutinsko provođenje analize SCE može indirektno pokazati koliko su dobre mjere zaštite na radnom mjestu.

KLJUČNE RIJEČI:

genetička nestabilnost; izmjene sestrinskih kromatida (SCE); ksilol; metanol; mitotički indeks (MI); octena kiselina

9. SUMMARY

Examination of the genetic instability using *in vitro* assay sister chromatid exchange

Sister chromatid exchange from *in vitro* analysis (SCE) is a cytogenetic method used to control professionally exposed population by means of mutagenic or carcinogenic chemicals. It is the indirect indicator of the level of damage present in the DNA before duplication.

The purpose was to determine if the exposure of xylene, methanol and acetic acid poses increased risk of DNA damage.

The participants were people younger than 40 who do not work with chemicals or in a radiation zone.

The analysis of SCE is based on the 72-hour cultivation of peripheral blood lymphocytes in the nutrient medium in the presence of 5-bromodeoxyuridine (BrdU) and phytohaemagglutinin (PHA). For each chemical, three different concentrations and control are tested.

The results demonstrated that the chemicals cause an increase in the number of sister chromatid exchange in relation to the controls. There is a statistically significant reduction of mitotic index ($P < 0.05$) at all concentrations of tested chemicals.

This research demonstrates that all of tested chemicals cause an increased number of recombination repair in peripheral lymphocytes and have an antiproliferative effect associated with genotoxicity.

Biomonitoring is an important part of health checkups of people occupationally exposed to health hazards. It is based on the measurement of biological indicators which indicate early biological effects that precede the onset of malignancies and other diseases. A routine analysis of SCE may indirectly show the quality of safety measures at a workplace.

KEY WORDS:

acetic acid; genetic instability; methanol; mitotic index (MI); sister chromatid exchange (SCE); xylene

10. LITERATURA

1. Dhawn A, Bajpayee MB. Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols. C. Johannes, G. Obe. Chromosomal Aberration test in Human Lymphocytes. New York: Humana press; 2013. str. 164-178.
2. Parry JM, Parry EM. Genetic Toxicology: Principles and Methods. Mosesso P, Cinelli S, Natarajan AT, Palitti F. In Vitro Cytogenetic Assays: Chromosomal Aberrations and Micronucleus Test. London: Humana Press; 2011. str. 123-147.
3. Ergun S, Tanyeri H, Öztürk Ş, Duman N, Kamal S, Gül A i sur. Investigation of Genomic Instability in Patients with Sjögren's Syndrome by Using Sister Chromatid Exchange Analysis. Acta Stomatol Croat. 2008;42:318-325.
4. Suspiro A, Prista J. Biomarkers of occupational exposure do anticancer agents: A minireview. Toxicol Lett. 2011;207:42-52.
5. Sanz MM, German J. Bloom's Syndrome. GeneReviews. 2006. Dostupno na adresi:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1398/>. Datum pristupa: 20.7.2015.
6. Wolff S, Perry P. Chromosoma. Springer-Verlag. 1974;48:341-353.
7. Zhang Z, Che W, Liang Y, Wu M, Li N, Shu Y i sur. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity induced by the extracts of methanol and gasoline engine exhausts. Toxicol In Vitro. 2007;21:1058-1065.
8. Zeller J, Ulricha A, Muellerb JU, Riegerta C, Neussa S, Brucknerc T i sur. Is individual nasal sensitivity related to cellular metabolism of formaldehyde and susceptibility towards formaldehyde-induced genotoxicity? Mutat Res. 2011;723:11-17.
9. Kandyala R, Raghavendra SPC, Rajasekharan ST, Pathol JOM. Xylene: An overview of its health hazards and preventive measures. PMCID. 2010;15:1-5.
10. Xylene. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Re-Evaluation of some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. Lyon, France 1999;71:1189-1208.
11. Obe G, Ristow H. Mutagenic, cancerogenic and teratogenic effects of alcohol. Mutat Res. 1979;65:229-259.
12. Pap M, Varga CS, Sister-chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of workers occupationally exposed to xylenes. Mutat Res. 1987;187:223-225.

13. Richer CL, Chakrabarti S, Senecal-Quevillon M, Duhrl MA, Zhang XX, Tardif R. Cytogenetic effects of low-level exposure to toluene, xylene, and their mixture on human blood lymphocytes. In *Arch Occup Environ Health*. 1993;64:581-585.
14. Lemasters GK, Livingston GK, Lockey JE, Olsen DM, Shukla R, New G i sur. Genotoxic changes after low-level solvent and fuel exposure on aircraft maintenance personnel. *Mutagenesis*. 1997;12:237-243.
15. Kopjar N, Želježič D, Kašuba V, Rozgaj R. Antineoplastični lijekovi kao čimbenik rizika u radnom okolišu: mehanizmi djelovanja na razini stanice i pregled metoda za otkrivanje njihovih genotoksičnih učinaka. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2010; 61:121-146.
16. Turgut1 T, Yaşar M, Yaykaşlı KO, Ertaş O, Sılan F. Increased Sister Chromatid Exchanges in Patients with Gastrointestinal Cancers and in their First-Degree Relatives. *Eur J Gen Med* 2014;11: 94-98.
17. Jeyapradha D, Saraswathi TR, Ranganathan K, Kavitha W. Comparison of the frequency of sister chromatid exchange in pan chewers and oral submucous fibrosis patients. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2011;15:278–282.
18. Safinejad K, Mahdih N, Mahdipour P, Yadegar L, Atri M, Javadi G. Sister chromatid exchange in peripheral blood lymphocytes as a possible breast cancer risk biomarker: A study of Iranian patients with breast cancer. *Egypt J Med Hum Genet*. 2009;1:55-61.
19. Garaj-Vrhovac V. Karcinogenost i mutageneza: analiza somatskih mutacija. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2000;51:115-124.
20. Best RG, McKenzie WH. Variable sister-chromatid exchange response in human lymphocytes exposed in vitro to gossypol acetic acid. *Mutat Res*. 1988; 206:227-233.
21. Trevisan P, da Silva JN, da Silva AP, Rosa RFM, Paskulin GA, Thiesen FW. Evaluation of genotoxic effects of benzene and its derivatives in workers of gas stations. *Environ Monit Assess*. 2014; 186:2195–2204.
22. Al-samarrae H, Al-Bayaati AJM, Lafi SA. The study of chromosomal aberrations in mice infested with radiated and non-radiated protoscolices of *Echinococcus granulosus*. *Al Anbar J Vet Sci*. 2010;3:1-7.
23. 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. *Mutat Res*. 1998;445:225-239.

11. ŽIVOTOPIS

MIA GALIĆ

Datum i mjesto rođenja:

- 14. prosinca 1993. godine, Osijek

Adresa:

- Martina Divalta 119A, 3100 Osijek

Obrazovanje:

- 2008. – 2012. Medicinska škola Osijek – farmaceutski tehničar
- 2012. – 2015. Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

12. PRILOZI

1. Obavijest za ispitanika
2. Informirani pristanak za sudjelovanje

1. Obavijest za ispitanika

Ispitivanje genetičke nestabilnosti primjenom *in vitro* analize izmjene sestrinskih kromatida

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 izmjene sestrinskih kromatida 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 analiza izmjene sestrinskih kromatida važna je citogenetička metoda 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 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 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.

2. 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): _____