

NORMALNE I GRANIČNE VRIJEDNOSTI MIKRONUKLEUS-TESTA NA LIMFOCITIMA PERIFERNE KRVI U ISPITANIKA OPĆE POPULACIJE REPUBLIKE HRVATSKE

Nevenka KOPJAR*, Vilena KAŠUBA, Mirta MILIĆ, Ružica ROZGAJ, Davor ŽELJEŽIĆ,
Goran GAJSKI, Marin MLADINIĆ i Vera GARAJ-VRHOVAC

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska

Primljeno u veljači 2010.
Prihvaćeno u ožujku 2010.

Mikronukleus (MN) test na limfocitima periferne krvi jedna je od najvažnijih metoda koje se primjenjuju u citogenetičkom nadzoru. Osnovni preduvjet za primjenu nekog testa u svrhu nadzora profesionalno izloženih populacija jest poznavanje normalnih vrijednosti promatranoga biološkog pokazatelja (biomarkera) u kontrolnoj populaciji. Baze podataka na razini opće populacije moraju se redovito obnavljati novim podacima. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi normalne i granične vrijednosti MN-testa na limfocitima periferne krvi 200 zdravih ispitanika obaju spolova iz opće populacije Republike Hrvatske te ispitati koji čimbenici pridonose spontanom nastanku MN. Na razini istražene populacije utvrđeno je prosječno ($6,90 \pm 3,32$) MN (medijan 7 MN), dok je raspon pojedinačnih vrijednosti iznosio 0 do 18 MN u 1000 binuklearnih stanica. Gornja granična vrijednost dobivena izračunavanjem 95. percentila za cjelokupnu promatranu populaciju iznosi 12,5 MN na 1000 limfocita. Utvrđeno je da na spontani nastanak MN utječu spol, dob i navika pušenja. Žene u prosjeku imaju više vrijednosti svih parametara MN-testa od muškaraca, a u njih je bio i naglašeniji porast vrijednosti citogenetičkog nalaza zbog navike pušenja. Kako su literaturni podaci o utjecaju pušenja cigareta na nastanak MN kontradiktorni, planiran je nastavak istraživanja radi razjašnjavanja utjecaja dnevno utrošenog broja cigareta i ukupnog trajanja pušačkog staža na vrijednosti parametara MN-testa. Usporedba rezultata s literaturnim podacima potvrdila je da su dobivene vrijednosti u skladu s vrijednostima MN-testa zabilježenim na općoj populaciji u drugim svjetskim laboratorijima. Normalne i granične vrijednosti MN-testa utvrđene u ovome istraživanju poslužit će kao osnova za usporedbu i tumačenje nalaza MN-testa u ispitanika izloženih populacija te daljnju nadogradnju laboratorijske baze podataka.

KLJUČNE RIJEČI: *citogenetički nadzor, dob, nestabilnost genoma, pušenje cigareta, rizik, spol, spontani nastanak mikronukleusa*

Biološki nadzor (engl. *biomonitoring*) važan je dio zdravstvenog nadzora nad ispitanicima koji su profesionalno izloženi različitim fizikalnim i kemijskim mutagenima i/ili kancerogenima. Zasniva se na mjerenju (ili utvrđivanju učestalosti) različitih bioloških pokazatelja koji upućuju na najranije, još

popravljive biološke učinke, koji prethode pojavi zloćudnih i/ili drugih bolesti. Primjenom biljega izloženosti, učinka i sklonosti (engl. *susceptibility*) na razini proučavanih populacija možemo utvrditi kakve su razine izloženosti štetnostima na radnim mjestima, je li izloženost rezultirala mjerljivim učinkom (primjerice oštećenjem molekule DNA) te otkriti ispitanike s većom osjetljivošću genoma koji su pod povišenim

* svi autori su jednakovrijedni

rizikom (1). Dobar biljeg trebao bi imati odgovarajuću specifičnost i osjetljivost, dokazanu ovisnost između doze i učinka te bi morao omogućiti utvrđivanje interindividualne i intraindividualne varijabilnosti (2). Najvažnije citogenetičke metode koje se primjenjuju u nadzoru profesionalno izloženih populacija jesu analiza strukturnih aberacija kromosoma (CA), analiza izmjena sestrinskih kromatida (SCE) i mikronukleus-test (MN) (3-5), a na molekularnoj razini važan je komet-test koji omogućuje osjetljivu procjenu primarnih oštećenja u molekuli DNA (6, 7).

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. Posljednjih je godina u okviru međunarodnog projekta HUMN (kratica od "HUMAN MicroNucleus") provedena standardizacija MN-testa te su prepoznati čimbenici koji mogu utjecati na njegove rezultate (8). MN-test je jednostavniji i brži od analize CA, a pregledavanjem velikog broja stanica (najmanje 1000 stanica po ispitaniku, za razliku od 100 do 200 stanica u analizi CA) postiže se i veća statistička značajnost (9, 10). Osim navedenoga u ovome se testu može istodobno utvrditi ukupni broj MN, ukupni broj stanica s MN, raspodjela MN u stanicama, broj nukleoplazmatskih mostova i nuklearnih pupova, broj stanica u apoptozi i nekrozi te indeks proliferacije stanica u uvjetima *in vitro* (11, 12), što ga trenutačno čini jednim od najsvestranijih citogenetičkih testova.

Mikronukleusi su samostalne kromatinske strukture koje su potpuno odvojene od jezgre. Nastaju kondenzacijom acentričnih kromosomskih fragmenata ili čitavih kromosoma zaostalih u anafazi koji se nisu ugradili u jezgre stanica kćeri (13). MN-test podjednako je osjetljiv za otkrivanje oštećenja diobenog vretena i aberacija kromosoma (14, 15) pa se prisutnost MN smatra kvantitativnim pokazateljem postojanja strukturnih i/ili numeričkih aberacija kromosoma nastalih pod utjecajem genotoksičnih agensa (4).

Osnovni preduvjet za primjenu nekog biološkog testa (ili metode) u svrhu nadzora profesionalno izloženih populacija jest poznavanje njegovih normalnih vrijednosti u općoj, tj. neizloženoj populaciji. U biološkom nadzoru korisno je poznavati i individualne ulazne vrijednosti određenoga biološkog pokazatelja (biljega, biomarkera), koje služe za sve kasnije usporedbe i procjenu izloženosti, učinka i/ili osjetljivosti na razini pojedinca. Međutim, u procjeni učinaka na razini populacije iznimnu važnost imaju

baze podataka u koje su pohranjene vrijednosti praćenog biljega, izmjerene ili utvrđene na velikom broju ispitanika opće populacije koja živi u istom podneblju te dijeli slične prehrabene i životne navike kao izložena populacija. Takve su baze podataka osobito važne u slučajevima neželjenih događaja (akcidenata) kada nije poznato kakva je bila osnovna vrijednost biljega u 'oštećenih' ispitanika koja je prethodila izloženosti. Baze podataka preporučljivo je redovito obnavljati novim podacima (idealno bi bilo svake dvije godine), a trebalo bi raspolagati podacima za najmanje 20 ispitanika svakog spola po desetljeću njihove dobi (13).

Citogenetički laboratorij Jedinice za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI) u Zagrebu već niz godina prikuplja podatke o kontrolnim vrijednostima MN-testa za opću populaciju Republike Hrvatske (RH). U ranijem su istraživanju (16) normalne vrijednosti MN-testa utvrđene u 50 nasumično izabranih ispitanika obaju spolova, a analiza MN provedena je primjenom kriterija koje je predložio projekt HUMN (11). Ovo se istraživanje nastavlja na prethodno, a njegov je cilj utvrditi normalne vrijednosti MN-testa na limfocitima periferne krvi u još većeg broja ispitanika iz opće populacije RH te ispitati koji čimbenici pridonose spontanom nastanku MN.

ISPITANICI I METODE

Ispitanici

Istraživana populacija obuhvaća 200 zdravih ispitanika obaju spolova iz opće populacije RH koji su dobrovoljno pristali na uzorkovanje venske krvi za provođenje citogenetičkih analiza u Jedinici za mutagenezu IMI. Ispitanici su bili upoznati sa svrhom istraživanja te su im objašnjena načela primjenjivanih metoda. Cjelokupna organizacija istraživanja, komunikacija s ispitanicima, uzorkovanje krvi, postupci pri rukovanju uzorcima krvi u laboratorijskim uvjetima te postupanje s dobivenim rezultatima provedeni su u skladu s etičkim načelima i smjericama pretpostavljenim za biomonitoring ljudskih populacija (4). Odgovarajuće dozvole etičkog povjerenstva (IMI, Zagreb) izdane su za potrebe znanstvenoistraživačkih projekata br. 022-0222148-2137 i 022-0222148-2125 (financiranih od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH) u okviru kojih su novačeni ispitanici.

Osim toga, laboratorij Jedinice za mutagenezu IMI je rješenjem Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi RH ovlašten za provođenje stručne djelatnosti citogenetičkog nadzora.

Izbor ispitanika proveden je na osnovi vrednovanja podataka prikupljenih standardiziranim anketnim upitnikom za citogenetička istraživanja, koji se uobičajeno rabi u Jedinici za mutagenezu IMI. Upitnik obuhvaća osnovne anamnestičke podatke, podatke o zanimanjima i životnim navikama, posebice navici pušenja, konzumiranju alkohola i eventualnoj medicinskoj izloženosti ispitanika. Uvidom u prikupljene podatke početna je populacija sužena na 200 ispitanika/ispitanica iz svih regija RH koji su imali slične prehrambene navike, nisu konzumirali alkohol, a za vrijeme istraživanja bili su zdravi. Ispitanici su prema navici pušenja podijeljeni na nepušače (nikada nisu pušili cigarete niti druge duhanske proizvode) i pušače (svakodnevno puše; većina 10 do 20 cigareta na dan). Prema zanimanjima u populaciji su prevladavali službenici zaposleni u uredima, studenti, nastavnici, sveučilišno osoblje, zdravstveni i drugi radnici koji na svojim radnim mjestima nisu bili izloženi kemijskim i/ili fizikalnim štetnostima. U obzir nisu uzeti ispitanici koji boluju od kroničnih bolesti te oni koji su prethodnih mjeseci imali bilo kakve akutne infekcije i medicinske izloženosti koje bi mogle utjecati na vrijednosti citogenetičkog nalaza.

Ispitanici su podvrgnuti minimalno invazivnom zahvatu vađenja venske krvi iz kubitalne vene. Krv je pohranjena u sterilne heparinizirane spremnike (Becton Dickinson; V=5 mL). Uzorkovanja su provedena u jutarnjim satima. Nakon vađenja, uzorci krvi su pohranjeni u hladnjak i do obrade, koja je provedena najkasnije unutar 24 h, držani su na 4 °C.

Metoda

Za MN-test primijenjen je standardni protokol na uzorcima pune krvi u kojem su stanične kulture uzgajane u uvjetima *in vitro* tijekom 72 sata, a radi sprečavanja diobe citoplazme u 44. satu dodan je citohalazin B (Sigma) u koncentraciji od 6 µg mL⁻¹ (17, 18). Limfociti su rasli na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂ (Heraeus Hera Cell 240 inkubator) u mediju RPMI 1640 (Gibco), uz dodatak 1 % fitohemaglutinina (Apogent), 20 % telećega fetalnog seruma te antibiotika penicilina 100 IU mL⁻¹ (Pliva) i streptomocina 100 µg mL⁻¹ (Krka). Nakon završetka kultiviranja, pristupilo se izradi mikroskopskih preparata u skladu sa standardnim protokolom (12) uz manje prilagodbe. Postupak je uključivao višekratno

centrifugiranje (8 do 10 min na 800 okretaja u minuti), ispiranje i obradu taloga te njegovo fiksiranje smjesom 3:1 (v/v) metanola i ledene octene kiseline (Kemika). Pročišćeni talog limfocita resuspendiran je u svježem fiksativu te nakapan na predmetna stakalca. Dobiveni su preparati osušeni na zraku i obojeni 10 %-tnom vodenom otopinom citološke boje Giemsa (Sigma). Preparati su analizirani pod svjetlosnim mikroskopom (povećanje 1000 x). U svakom uzorku pregledano je po 1000 binuklearnih limfocita u kojima je utvrđen ukupni broj MN, a usporedo su izbrojene stanice s MN i njihova raspodjela. Mikronukleusi su determinirani u skladu s propisanim kriterijima HUMN-a pri čemu je njihova veličina smjela iznositi između 1/16 do 1/3 promjera glavnih jezgara (11).

Statistička obrada podataka

Dobiveni podaci obrađeni su primjenom deskriptivne statistike, Spearmanove korelacijske analize, neparametrijskog Mann-Whitney U-testa i Kruskal-Wallis ANOVA-testa sadržanih u programskom paketu Statistica 5.0 (StatSoft). Statistička značajnost određena je na razini p<0,05.

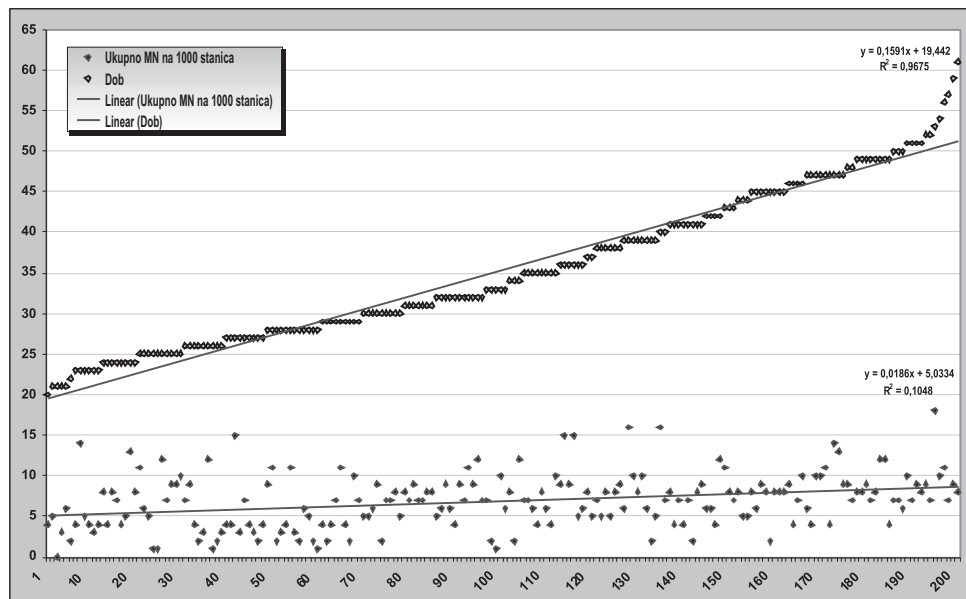
REZULTATI

Značajke istraživane populacije prikazane su na tablici 1. Žene (N=106) su bile brojčano zastupljenije od muškaraca (N=94). Rasponom godina života (20 do 61) obuhvaćena je populacija koja odgovara prosječnoj radno izloženoj populaciji u RH.

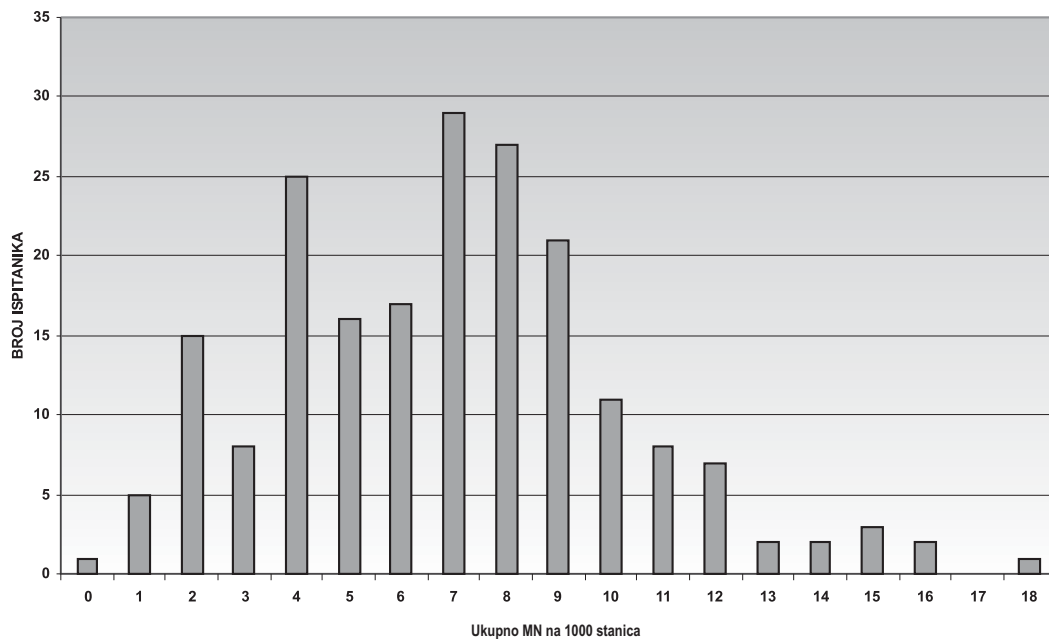
Pojedinačne vrijednosti ukupnog broja MN u limfocitima periferne krvi svih ispitanika opće populacije u ovisnosti o dobi prikazane su na slici 1. Relativna učestalost MN u istraživanoj populaciji prikazana je na slici 2.

Rezultati MN-testa za cjelokupnu populaciju te odvojeno za žene i muškarce, odnosno nepušače i pušače prikazani su na tablici 2. Na razini istražene populacije utvrđeno je prosječno (6,90±3,32) MN (medijan 7 MN), dok je raspon pojedinačnih vrijednosti iznosio 0 do 18 MN u 1000 binuklearnih stanica. Gornja granična vrijednost dobivena izračunavanjem 95. percentila za cjelokupnu promatranu populaciju iznosi 12,5 MN na 1000 limfocita (tablica 2).

Iz grafičkog prikaza na slici 3. vidljivo je da je od ukupnog broja mikroskopski pregledanih limfocita (N=200.000), njih 198.772 bilo bez MN, dok je preostalih 1228 sadržavalo 1 do 3 MN.



Slika 1 Pojedinačne vrijednosti ukupnog broja MN utvrđene u 200 ispitanika opće populacije koji su poredani prema rastućoj dobi



Slika 2 Relativna učestalost MN u istraživanoj populaciji (N=200)

Podaci o zastupljenosti limfocita s MN na razini cjelokupne populacije te odvojeno za žene i muškarce, odnosno nepušače i pušače prikazani su na tablici 2. U 11 ispitanika (5,5 %) nije utvrđena nijedna stanica s MN. U 143 ispitanika (71,5 %) nađene su stanice s po 1 MN. Preostalih 46 ispitanika (23 %) imalo je i stanice s 2 MN (35 po 1; 8 po 2, 1 po 3, 1 po 4). Po jedna stanica s 3 MN zabilježena je u 4 ispitanika.

Primjenom Spearmanove korelacijske analize na razini cjelokupne populacije utvrđeno je da na

vrijednosti MN-testa najviše utječu dob i navika pušenja. Uočena je statistički značajna pozitivna korelacija između dobi i ukupnog broja MN ($R=0,346$; $p<0,0001$), ukupnog broja stanica s MN ($R=0,350$; $p<0,0001$), ukupnog broja stanica s 1 MN ($R=0,437$; $p<0,0001$) i ukupnog broja stanica s 2 MN ($R=0,299$; $p<0,0001$). Navika pušenja statistički značajno pridonosi porastu ukupnog broja MN ($R=0,185$; $p=0,0088$) i porastu ukupnog broja stanica s MN ($R=0,182$; $p=0,0099$). Žene imaju veće vrijednosti svih

Tablica 1 Značajke istraživane populacije

Skupina	N	Dob / godine	Navika pušenja	
		Sr. vr.±SD (medijan; raspon)	Nepušači	Pušači
Žene	106	37,61±9,84 (36,5; 21 do 61)	64	42
Muškarci	94	32,97±8,17 (31; 20 do 57)	46	48
Σ	200	35,43±9,36 g (33; 20 do 61)	110	90

Tablica 2 Rezultati MN-testa na limfocitima periferne krvi za cjelokupnu populaciju te žene i muškarce, odnosno nepušače i pušače

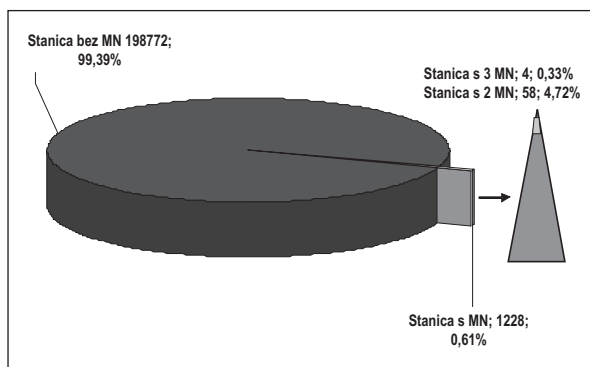
Ukupno na 1000 stanica	Sr. vr.	SD	Medijan	Raspon	5. perc.	25. perc.	75. perc.	95. perc.
CJELOKUPNA POPULACIJA (N=200)								
MN	6,90	3,32	7	0 do 18	2	4	9	12,5
St. s MN	6,49	3,02	7	0 do 15	2	4	8	11,5
St. s 1 MN	5,83	3,13	6	0 do 14	0	4	8	11
St. s 2 MN	0,29	0,61	0	0 do 4	0	0	0	1,5
St. s. 3 MN	0,02	0,14	0	0 do 1	0	0	0	0
ŽENE (N=106)								
MN	7,26	3,17	7	0 do 18	2	5	9	12
St. s MN	6,87 ^a	2,83	7	0 do 15	2	5	9	12
St. s 1 MN	6,09	3,01	6	0 do 14	0	4	8	11
St. s 2 MN	0,34	0,65	0	0 do 3	0	0	1	2
St. s. 3 MN	0,03	0,17	0	0 do 1	0	0	0	0
MUŠKARCI (N=94)								
MN	6,49	3,45	7	1 do 16	2	4	9	13
St. s MN	6,06	3,19	6	1 do 15	2	3	8	11
St. s 1 MN	5,53	3,26	5	0 do 14	1	3	8	11
St. s 2 MN	0,23	0,58	0	0 do 4	0	0	0	1
St. s. 3 MN	0,01	0,10	0	0 do 1	0	0	0	0
NEPUŠAČI (N=110)								
MN	6,40	3,32	6	0 do 18	2	4	8	12
St. s MN	6,05	2,98	6	0 do 15	2	4	8	11
St. s 1 MN	5,50	3,02	5	0 do 13	0	4	8	11
St. s 2 MN	0,30	0,67	0	0 do 4	0	0	0	2
St. s. 3 MN	0,01	0,10	0	0 do 1	0	0	0	0
PUŠAČI (N=90)								
MN	7,51 ^b	3,24	7	1 do 16	2	5	9	13
St. s MN	7,03 ^c	3,01	7	1 do 15	2	5	9	12
St. s 1 MN	6,23	3,24	7	0 do 14	0	4	8	11
St. s 2 MN	0,28	0,54	0	0 do 2	0	0	0	1
St. s. 3 MN	0,03	0,18	0	0 do 1	0	0	0	0

Mann-Whitney U-test – značajno povišeno (a) u odnosu na muškarce, $p=0,0457$; (b) u odnosu na nepušače, $p=0,0095$; (c) u odnosu na pušače, $p=0,0107$

promatranih parametara nego muškarci, ali je jedina značajna korelacija utvrđena za ukupni broj stanica s MN ($p=0,0441$).

Prikazi ovisnosti između ukupnog broja MN i dobi utvrđeni posebno za muškarce i žene te prema navici pušenja vidljivi su na slici 4. Žene kao skupina imaju veće vrijednosti svih promatranih parametara MN-

testa od muškaraca, ali razlike nisu statistički značajne (tablica 2). Pušači kao skupina imaju statistički značajno veći ukupni broj MN ($p=0,0095$; Mann-Whitney U-test) i ukupni broj stanica s MN ($p=0,0107$; Mann-Whitney U-test) u odnosu na nepušače. Radi dobivanja boljeg uvida u međusobne utjecaje spola i navike pušenja, posebno smo razmotrili vrijednosti

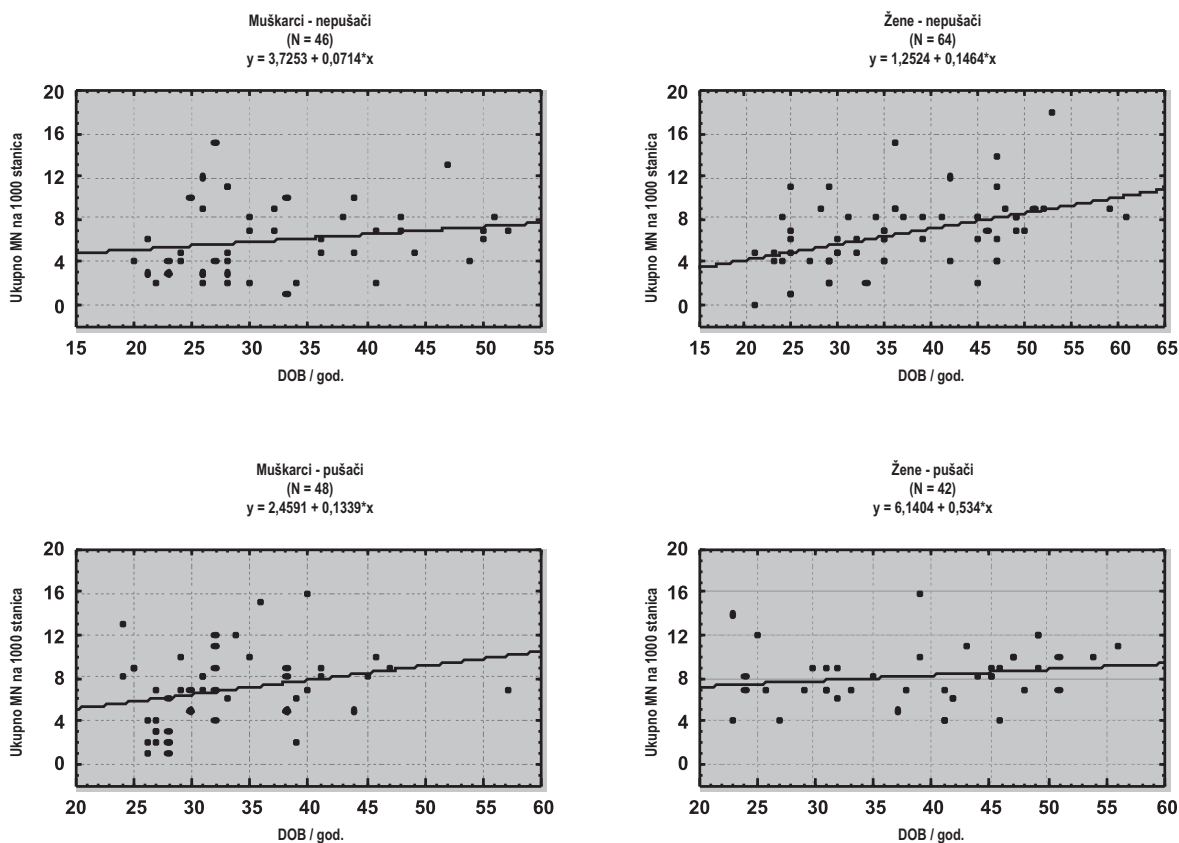


Slika 3 Zastupljenost stanica s 1 do 3 MN (broj, %) u ukupnom broju mikroskopski analiziranih stanica (N=200.000)

MN-testa u pušača i nepušača muškog i ženskog spola. Slika 5. prikazuje utjecaj spola i navike pušenja na ukupni broj MN. Pušačice imaju statistički značajno veći ukupni broj MN ($p=0,0063$; Mann-Whitney U-test) i ukupni broj stanica s MN ($p=0,0065$; Mann-Whitney U-test) od nepušačica (tablica 3). Iako i pušači imaju više MN, stanica s MN te stanica s 1 MN i 2 MN od nepušača, ni jedna razlika nije statistički značajna (tablica 3).

Rezultati MN-testa na limfocitima periferne krvi ispitanika opće populacije podijeljenih u četiri glavne dobne skupine prikazani su na tablici 4. gdje su detaljno razrađene podskupine prema spolu i navici pušenja. Iz tih se podataka općenito uočava porast vrijednosti parametara MN-testa s dobi, a primjenom Kruskal-Wallis ANOVA-testa potvrđeno je da su sve razlike između skupina, osim za ukupni broj stanica s 3 MN, statistički značajne. Premda je najstarija dobna skupina imala najviše vrijednosti promatranih parametara MN-testa, što je bilježeno i u ranijim istraživanjima, zbog malog će broja ispitanika pouzdanost dobivenih rezultata trebati dodatno potvrditi u budućim istraživanjima na većoj populaciji.

Promotrimo li odvojeno podatke za sve žene i muškarce unutar dobni skupina, vidljivo je da žene najmlađe (20 do 30 godina) i najstarije dobne skupine (>50 godina) imaju više prosječne vrijednosti parametara MN-testa od muškaraca iste dobi, dok su prosječne vrijednosti parametara MN-testa za žene i muškarce dobni skupina 31 do 40 godina i 41 do 50 godina bile slične. Međutim, uzmemo li u obzir utjecaj navike pušenja unutar dobne skupine istog spola,

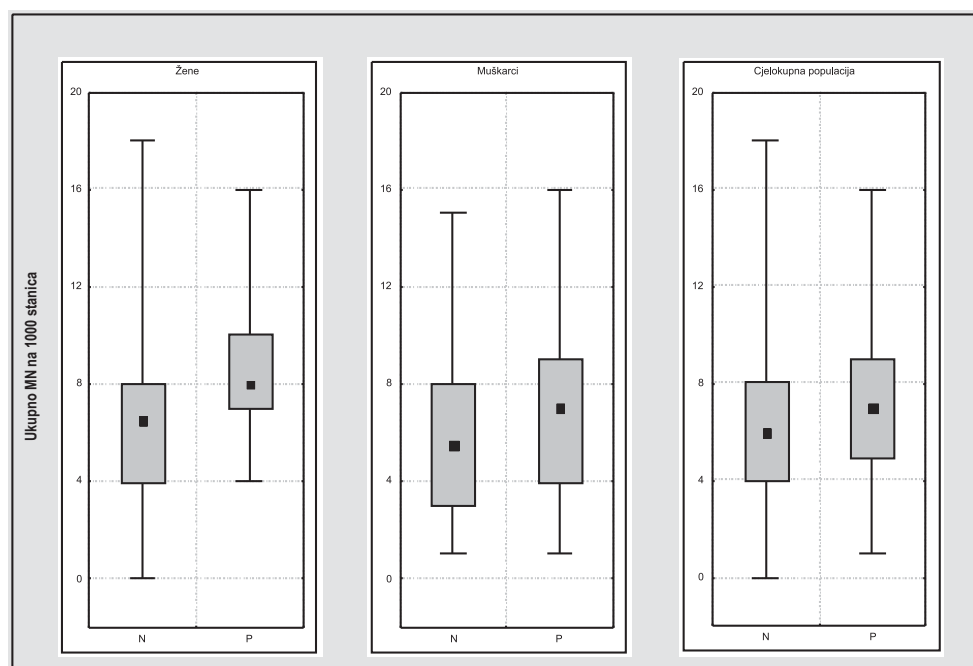


Slika 4 Ovisnost između ukupnog broja MN i dobi utvrđena posebno za muškarce i žene te prema navici pušenja

Tablica 3 Rezultati MN-testa na limfocitima periferne krvi nepušača i pušača s posebnim prikazom podataka za žene i muškarce

Ukupno na 1000 stanica	Sr. vr.	SD	Medijan	Raspon	5. perc.	25. perc.	75. perc.	95. perc.
NEPUŠAČI (N=110)								
ŽENE (N=64)								
MN	6,64	3,31	6,5	0 do 18	2	4	8	12
St anice s MN	6,31	2,99	6	0 do 15	2	4	8	11
Stanice s 1 MN	5,73	3,04	5,5	0 do 13	0	4	8	11
Stanice s 2 MN	0,33	0,64	0	0 do 3	0	0	0,5	2
Stanice s. 3 MN	-	-	-	-	-	-	-	-
MUŠKARCI (N=46)								
MN	6,07	3,33	5,5	1 do 15	2	3	8	12
Stanice s MN	5,67	2,95	5	1 do 12	2	3	7	11
Stanice s 1 MN	5,17	2,99	5	0 do 11	1	3	7	11
Stanice s 2 MN	0,26	0,71	0	0 do 4	0	0	0	1
Stanice s. 3 MN	0,02	0,15	0	0 do 1	0	0	0	0
PUŠAČI (N=90)								
ŽENE (N=42)								
MN	8,21 ^a	2,71	8	4 do 16	4	7	10	12
Stanice s MN	7,71 ^b	2,35	7	4 do 15	4	6	9	12
Stanice s 1 MN	6,64	2,91	7	0 do 14	0	5	9	11
Stanice s 2 MN	0,36	0,66	0	0 do 2	0	0	1	2
Stanice s. 3 MN	0,07	0,26	0	0 do 1	0	0	0	1
MUŠKARCI (N=48)								
MN	6,90	3,56	7	1 do 16	2	4	9	13
Stanice s MN	6,44	3,40	7	1 do 15	1	4	8	12
Stanice s 1 MN	5,88	3,49	6	0 do 14	1	3	8	12
Stanice s 2 MN	0,21	0,41	0	0 do 1	0	0	0	1
Stanice s. 3 MN	-	-	-	-	-	-	-	-

Mann-Whitney U-test - značajno povišeno u odnosu na nepušačice: (a) $p=0,0063$; (b) $p=0,0065$



Slika 5 Utjecaj spola i navike pušenja na ukupni broj MN
 N - nepušači, P - pušači

vidljivo je da su pušači, a osobito žene svih dobi do 50 godina imali značajno više vrijednosti parametara MN-testa u odnosu na nepušače (tablica 4).

Iz podataka za sve pušače i sve nepušače iz četiri glavne dobne skupine, prikazanih na tablici 4, vidljivo je da je navika pušenja najjače utjecala na vrijednosti parametara MN-testa u dobnoj skupini 31 do 40 godina, gdje su pušači imali prosječno 27 % više MN od nepušača. Taj je utjecaj bio manji u dobnoj skupini 20 do 30 godina (pušači su imali prosječno 13 % više MN od nepušača), dok je bio najmanje izražen u dobnoj skupini 41 do 50 godina (pušači su imali prosječno 9 % više MN od nepušača). Prema našim zapažanjima, u najstarijoj dobnoj skupini (>50 godina) utjecaj navike pušenja na ukupni broj MN nije bio značajan. Međutim, kako je ta skupina imala i najmanji broj ispitanika, za točnije je zaključke potrebno provesti daljnja istraživanja.

RASPRAVA

Mikronukleusi u limfocitima zdravih ispitanika opće populacije pokazatelj su oštećenja genoma akumuliranih tijekom životnog vijeka pojedinačne stanice te mutacija koje dolaze do izražaja u prvoj *in vitro* diobi. Nastanak MN uvelike je određen individualnom genskom strukturom, odnosno stabilnošću genoma pojedinca (19). Spontanom nastanku MN ponajprije pridonose različiti endogeni čimbenici, a dodatno čimbenici koji su normalno prisutni u životnom okolišu, način života i različite navike. Poznavanje mehanizama i uzroka spontanog nastanka MN vrlo je važno za ispravno tumačenje rezultata MN-testa, osobito u slučajevima kada se on primjenjuje u citogenetičkom nadzoru profesionalno izloženih populacija. Kako su MN pokazatelj oštećenja na razini DNA i/ili kromosoma i diobenog vretena, svi procesi koji izravno ili neizravno potiču takva oštećenja podjednako pridonose i porastu broja MN. Od posebnog su značenja oksidativni procesi koji se odvijaju unutar stanice i organizma (20), polimorfizmi gena te različite mutacije gena koje mogu rezultirati nestabilnostima genoma (10).

U ovome smo istraživanju proučili razinu citogenetičkog oštećenja u prosječne zdrave hrvatske populacije ispitanika obaju spolova u sličnom rasponu dobi kakav imaju potencijalne profesionalno izložene i radno aktivne populacije koje bi se u budućnosti mogle kontrolirati primjenom MN-testa. Naša vrijednost za ukupni broj MN utvrđena na razini cjelokupne

promatrane populacije (medijan 7 MN na 1000 stanica) vrlo je slična vrijednosti medijana od 6,5 MN na 1000 stanica, koja je dobivena na osnovi vrednovanja gotovo 5000 pojedinačnih podataka iz 23 svjetske baze podataka i objavljena 2001. (8). Iz raspona pojedinačnih vrijednosti uočljive su interindividualne razlike koje su jedno od osnovnih obilježja ljudske populacije i koje se normalno primjećuju u sličnim istraživanjima. U našem se istraživanju najveći broj pojedinačnih vrijednosti nalazio između 4 i 12,5 MN (što odgovara rasponu između 25. i 75. kvartila), dok su u ranije navedenom istraživanju (8) te vrijednosti iznosile između 3 i 12 MN.

Zbog različite organizacije istraživanja i različite veličine promatranih populacija, ukupni broj MN nerijetko je manji ili veći od ovoga koji smo utvrdili, ali se u većini istraživanja kreće između 7 i 10 MN na 1000 st. (21-25). Za usporedbu navodimo vrijednosti dobivene na populacijama podjednake veličine kao što je naša (26-28). Na istom broju ispitanika iz opće populacije u Francuskoj (122 muškarca i 78 žena) Di Giorgio i sur. (26) utvrdili su više vrijednosti ukupnog broja spontano nastalih MN [(12,87±5,03) MN na 1000 stanica]. Milošević-Djordjević (27) na populaciji od 164 ispitanika utvrdili su prosječno (8,03±0,42) MN na 1000 stanica. U nekim se radovima navodi samo ukupni broj stanica s MN, pa su tako Duffaud i sur. (28) na populaciji od 198 ispitanika utvrdili prosječno (9,7±2,8) stanica s MN na 1000 stanica u muškaraca (N=119), odnosno (9,8±3,1) stanica s MN na 1000 stanica u žena (N=79). Niže vrijednosti za ukupni broj MN (4,74±0,31) na 1000 stanica dobivene su u ranijem istraživanju na manjem broju ispitanika opće populacije u Hrvatskoj (16). Slične podatke navode Barale i sur. (29) u istraživanju na talijanskoj općoj populaciji, gdje su prosječne vrijednosti za regiju Cascina iznosile (4,13±3,20) MN na 1000 stanica (N=439 ispitanika), za regiju Navacchio (4,10±3,55) MN na 1000 stanica (N=341 ispitanika), a za regiju Pisa (3,19±3,19) MN na 1000 stanica (N=870 ispitanika).

Kako smo za potrebe istraživanja izabrali zdrave ispitanike uz čija se zanimanja ne veže izloženost kemijskim i fizikalnim štetnostima koje bi mogle utjecati na vrijednosti citogenetičkog nalaza te ispitanike koji u prethodnih godinu dana nisu bili izloženi medicinskim postupcima s X-zračenjem niti su dugotrajno uzimali lijekove čiji bi mehanizmi djelovanja mogli rezultirati povišenim vrijednostima promatranoga citogenetičkog biomarkera, smanjili smo utjecaj velikog broja vanjskih čimbenika na

Tablica 4 Rezultati MN-testa na limfocitima periferne krvi ispitanika opće populacije podijeljenih u četiri glavne dobne skupine. Prikazane su srednje vrijednosti i SD, a u zagradama medijan i raspon za svaki promatrani parametar.

Dobna skupina / godine	N	Ukupno na 1000 stanica				
		MN	Stanice s MN	Stanice s 1 MN	Stanice s 2 MN	Stanice s 3 MN
20 do 30	78	5,58±3,40 (5; 0 do 15)	5,21±3,00 (4,5; 0 do 12)	4,15±3,06 (4; 0 do 11)	0,14±0,57 (0; 0 do 4)	0,01±0,11 (0; 0 do 1)
Žene	32	5,78±3,28 (5; 0 do 14)	5,66±3,04 (5; 0 do 12)	4,22±3,31 (4; 0 do 11)	0,06±0,35 (0; 0 do 2)	0,03±0,18 (0; 0 do 1)
N	23	4,91±2,89 (5; 0 do 11)	4,83±2,72 (5; 0 do 11)	4,04±3,02 (4; 0 do 11)	0,09±0,42 (0; 0 do 2)	-
P	9	8,00±3,32 ^{a,c} (7; 4 do 14)	7,78±2,91 ^{b,d} (7; 4 do 12)	4,67±4,12 (4; 0 do 11)	-	0,11±0,33 (0; 0 do 1)
Muškarci	46	5,43±3,51 (4; 1 do 15)	4,89±2,96 (4; 1 do 11)	4,11±2,92 (3,5; 0 do 11)	0,20±0,69 (0; 0 do 4)	-
N	25	5,68±3,68 (4; 2 do 15)	5,24±3,07 (4; 2 do 11)	4,56±3,08 (4; 0 do 11)	0,28±0,89 (0; 0 do 4)	-
P	21	5,14±3,35 (4; 1 do 13)	4,48±2,84 (4; 1 do 0)	3,57±2,68 (3; 0 do 10)	0,10±0,30 (0; 0 do 1)	-
NEPUŠAČI (ž+m)	48	5,31±3,31 (4; 0 do 15)	5,04±2,89 (4; 0 do 11)	4,31±3,03 (4; 0 do 11)	0,19±0,70 (0; 0 do 4)	-
PUŠAČI (ž+m)	30	6,00±3,54 (6,5; 1 do 14)	5,47±3,20 (5,5; 1 do 12)	3,90±3,14 (3,5; 0 do 11)	0,07±0,25 (0; 0 do 1)	0,03±0,18 (0; 0 do 1)
31 do 40	60	7,47±3,22* (7; 1 do 16)	7,15±3,10* (7; 1 do 15)	6,85±3,06* (7; 1 do 14)	0,28±0,49* (0; 0 do 2)	0,02±0,33 (0; 0 do 1)
Žene	28	7,46±2,89 (7; 2 do 16)	7,14±2,76 (7; 2 do 15)	6,82±2,74 (7; 2 do 14)	0,32±0,55 (0; 0 do 2)	-
N	17	6,94±2,82 (7; 2 do 15)	6,65±2,74 (6; 2 do 14)	6,35±2,74 (6; 2 do 14)	0,29±0,47 (0; 0 do 1)	-
P	11	8,27±2,94 (7; 5 do 16)	7,91±2,74 (7; 5 do 15)	7,55±2,70 (7; 5 do 14)	0,36±0,67 (0; 0 do 2)	-
Muškarci	32	7,47±3,53 (7; 1 do 16)	7,16±3,42 (7; 1 do 15)	6,88±3,36 (7; 1 do 14)	0,25±0,44 (0; 0 do 1)	0,03±0,18 (0; 0 do 1)
N	12	6,00±3,10 (6,5; 1 do 10)	5,75±3,05 (5,5; 1 do 10)	5,58±3,06 (5,5; 1 do 10)	0,08±0,29 (0; 0 do 1)	0,08±0,29 (0; 0 do 1)
P	20	8,35±3,54 (8; 2 do 16)	8,00±3,42 (8; 2 do 15)	7,65±3,36 (7,5; 2 do 14)	0,35±0,49 (0; 0 do 1)	-
NEPUŠAČI (ž+m)	29	6,55±2,92 (7; 1 do 15)	6,28±2,85 (6; 1 do 14)	6,03±2,85 (6; 1 do 13)	0,21±0,41 (0; 0 do 1)	0,03±0,19 (0; 0 do 1)
PUŠAČI (ž+m)	31	8,32±3,29 ^e (8; 2 do 16)	7,97±3,15 ^f (7; 2 do 15)	7,61±3,09 (7; 2 do 14)	0,35±0,55 (0; 0 do 2)	-
41 do 50	50	7,68±2,61* (8; 2 do 14)	7,14±2,29* (7; 2 do 13)	6,64±2,28* (6; 2 do 12)	0,46±0,65* (0; 0 do 2)	0,04±0,20 (0; 0 do 1)
Žene	37	7,70±2,71 (8; 2 do 14)	7,11±2,31 (7; 2 do 13)	6,57±2,27 (6; 2 do 12)	0,49±0,69 (0; 0 do 2)	0,05±0,23 (0; 0 do 1)
N	19	7,42±2,89 (8; 2 do 14)	6,95±2,63 (7; 2 do 13)	6,47±2,50 (6; 2 do 12)	0,47±0,61 (0; 0 do 2)	-
P	18	8,00±2,54 (8; 4 do 12)	7,28±1,96 (7,5; 4 do 10)	6,67±2,06 (6; 4 do 10)	0,50±0,79 (0; 0 do 2)	0,11±0,32 (0; 0 do 1)
Muškarci	13	7,62±2,40 (8; 4 do 13)	7,23±2,35 (7; 3 do 12)	6,85±2,41 (7; 2 do 11)	0,38±0,51 (0; 0 do 1)	-
N	7	7,14±2,91 (7; 4 do 13)	6,57±2,76 (6; 3 do 12)	6,00±2,71 (6; 2 do 11)	0,57±0,53 (1; 0 do 1)	-

Tablica 4 - nastavak

Dobna skupina / godine	N	Ukupno na 1000 stanica				
		MN	Stanice s MN	Stanice s 1 MN	Stanice s 2 MN	Stanice s 3 MN
P	6	8,17±1,72 (8,5; 5 do 10)	8,00±1,67 (8; 5 do 10)	7,83±1,72 (8; 5 do 10)	0,17±0,41 (0; 0 do 1)	-
NEPUŠAČI (ž+m)	26	7,35±2,84 (7; 2 do 14)	6,85±2,62 (7; 2 do 13)	6,35±2,51 (6; 2 do 12)	0,50±0,58 (0; 0 do 2)	7,35±2,84 (7; 2 do 14)
PUŠAČI (ž+m)	24	8,04±2,33 (8; 4 do 12)	7,46±1,89 (8; 4 do 10)	6,96±2,01 (7; 4 do 10)	0,42±0,72 (0; 0 do 2)	0,08±0,28 (0; 0 do 1)
51 do 61	12	9,42±3,00* (9; 7 do 18)	8,83±2,29* (8,5; 7 do 15)	8,25±1,86* (8; 5 do 12)	0,58±1,00* (0; 0 do 3)	-
Žene	9	10,11±3,18 (9; 7 do 18)	9,33±2,45 (9; 7 do 15)	8,56±2,07 (8; 5 do 12)	0,78±1,09 (0; 0 do 3)	-
N	5	10,60±4,16 (9; 8 do 18)	9,60±3,13 (9; 7 do 15)	8,60±2,51 (9; 5 do 12)	1,00±1,41 (0; 0 do 3)	-
P	4	9,50±1,73 (10; 7 do 11)	9,00±1,63 (9; 7 do 11)	8,50±1,73 (8; 7 do 11)	0,50±0,58 (0,5; 0 do 1)	-
Muškarci	3	7,33±0,58 (7; 7 do 8)	7,33±0,58 (7; 7 do 8)	7,33±0,58 (7; 7 do 8)	-	-
N	2	7,50±0,71 (7,5; 7 do 8)	7,50±0,71 (7,5; 7 do 8)	7,50±0,71 (7,5; 7 do 8)	-	-
P	1	7	7	7	-	-
NEPUŠAČI (ž+m)	7	9,71±3,73 (9; 7 do 18)	9,00±2,77 (8; 7 do 15)	8,29±2,14 (8; 5 do 12)	0,71±1,25 (0; 0 do 3)	-
PUŠAČI (ž+m)	5	9,00±1,87 (10; 7 do 11)	8,60±1,67 (9; 7 do 11)	8,20±1,64 (8; 7 do 11)	0,40±0,55 (0; 0 do 1)	-

N - nepušači; P - pušači; ž - žene; m - muškarci

Mann-Whitney U-test – *povišeno u odnosu na sve ne pušačice iste dobne skupine (a) p=0,0236; (b) p=0,0224; pušače iste dobne skupine (c) p=0,0440; (d) p=0,0128; sve nepušače iste dobne skupine (e) p=0,0517; (f) p=0,0483.*

Kruskal-Wallis ANOVA – *(*) razlike između dobnih skupina za sve parametre, osim za st. s 3 MN su značajne, p<0,01.*

pojedinačne nalaze MN-testa. Stoga smo se pri tumačenju nalaza ponajprije ograničili na utjecaj spola i dobi (kao unutarnjih čimbenika uvjetovanih nasljeđem) i navike pušenja (kao vanjskog čimbenika), koji su i inače u literaturi spominjani kao najvažniji ometajući čimbenici u MN-testu (4, 8, 30).

Utvdili smo da žene u prosjeku imaju više MN od muškaraca i taj je rezultat sličan onomu koji su vrednovanjem podataka MN-testa na velikom broju ispitanika dobili Bonassi i sur. (8). Podaci o višim vrijednostima MN u žena nego muškaraca navode se i u drugim istraživanjima (13, 31-34). Taj se fenomen uglavnom tumači gubitkom jednog od X-kromosoma putem MN (10, 35, 36).

Pozitivna korelacija između učestalosti MN i životne dobi utvrđena je u mnogim istraživanjima (8, 21, 31, 33, 37-41). Poznato je da starenje prati niz procesa na razini stanice i organizma koji mogu utjecati na porast razine primarnih oštećenja DNA, povećanu učestalost kromosomskih aberacija, ali i

spontani nastanak aneuploidije zbog gubitka pojedinih kromosoma (10, 32, 39, 42, 43). Općenito se navodi da se MN koji sadržavaju čitave kromosome češće nalaze u starijih nego mlađih ispitanika (14, 39). U ovome istraživanju primijenjen je standardni MN-test kojim se ne može utvrditi podrijetlo MN. Međutim, primjenom tehnike fluorescencijske in situ hibridizacije (FISH) može se točno utvrditi koji su kromosomi sadržani u MN. Osim ranije navedenog gubitka X-kromosoma, dokazano je da se starenjem putem MN gube i Y-kromosomi (36, 44, 45). Norppa i Falck (46) na osnovi opsežne analize rezultata brojnih studija navode da između 30 % i 80 % spontano nastalih MN u ljudskim limfocitima sadržava čitave kromosome. Za razliku od spolnih kromosoma koji se češće gube putem MN, autosomi se u MN pojavljuju nasumično i ne gube se isključivo u vezi sa starenjem (36, 46, 47). Također je primijećeno da i naizgled zdravi ispitanici mogu imati vrlo velik broj MN u kojima prevladava neki određeni kromosom. Tako je opisan slučaj paradoksalnoga

spontanog gubitka kromosoma br. 2 koji upućuje na nestabilnost genoma (48). U zdravih se ispitanika rijetko nalaze visoke spontane razine MN, ali se one dovode u vezu s različitim bolestima. Tako je uočeno da dijabetes (49) i sindrom policističnih jajnika (50) mogu utjecati na porast broja MN. Sličan učinak imaju pojedine vrste lijekova koje ispitanici iz opće populacije uzimaju kraće ili dulje vrijeme (51, 52). Međutim, treba istaknuti da u velikom istraživanju na populaciji zdravih žena koje su uzimale kontracepciju nije utvrđen značajan porast broja MN (53). Slične su rezultate dobili Lončar i suradnici (54). Podaci o medicinskoj izloženosti pri dijagnostičkim pretragama i njezinu doprinosu nastanku MN su kontradiktorni. Uzevši u obzir da su suvremeni rendgenski uređaji tehnički napredniji pa su niže i doze zračenja koje se primaju pri pojedinoj dijagnostičkoj pretrazi, nakon jednostavnijih se snimanja u prosječnog ispitanika ne očekuje pojava većih oštećenja. Međutim, uvijek valja imati na umu da su neki pojedinci genetički osjetljiviji, pa je podatak o medicinskoj izloženosti X-zračenju važan pri tumačenju nalaza MN-testa. Pojedini se dijagnostički postupci, osobito oni s primjenom kontrasta, ipak dovode u vezu s porastom broja MN (55, 56).

Pušenje duhana u ovom se istraživanju pokazalo kao značajan čimbenik koji narušava cjelovitost DNA u limfocitima zdravih ispitanika opće populacije. Općenito uzevši, podaci o doprinosu navike pušenja porastu vrijednosti parametara MN-testa su kontradiktorni. Dok rezultati nekih istraživanja upućuju na štetan utjecaj navike pušenja i porast broja MN u pušača (13, 28, 57-60), dio istraživanja nije dokazao takvu povezanost (16, 37, 38, 61). Rezultati opsežnog istraživanja provedenog u okviru projekta HUMN (62) ne pokazuju statistički značajan doprinos navike pušenja vrijednostima parametara MN-testa u "prosječnih" pušača, već samo u onih koji puše više od 30 cigareta na dan. S obzirom na to da je većina ispitanika pušača obuhvaćenih našim istraživanjem pušila 10 do 20 cigareta na dan, ograničili smo se na procjenu općenitog utjecaja navike pušenja te nismo istraživali doprinos dnevno utrošenog broja cigareta i ukupnog trajanja pušačkog staža na vrijednosti parametara MN-testa. Međutim, istraživanja na općoj populaciji planiramo nastaviti te će se svakako pokušati procijeniti jesu li vrijednosti parametara MN-testa značajno više u svih pušača ili samo onih ispitanika koji troše vrlo veliki broj cigareta na dan. Na takav zaključak, osim ranije spomenutog (62), upućuju i rezultati istraživanja na općoj populaciji iz Japana (63).

Naše je istraživanje pokazalo da postoje razlike u utjecaju navike pušenja na spontani nastanak MN u muškaraca i žena i da su one povezane s dobi ispitanika. Najjači utjecaj navike pušenja, ali sličan u muškaraca i žena, utvrdili smo u dobnoj skupini 31 do 40 godina. Navika pušenja manje je utjecala na nastanak MN u najmlađoj dobnoj skupini, ali je važno naglasiti da su mlađe pušačice bile osjetljivije od pušača iste dobi. Čini se da taj utjecaj nakon 50.-te godine života biva prevladan nekim drugim čimbenicima povezanim sa starenjem koji također pridonose nastanku MN. Međutim, kako smo imali relativno malen broj ispitanika te dobi, u tom se zaključku oslanjamo samo na literaturne podatke, dok će za točnije zaključke za populaciju RH biti potrebno provesti daljnja istraživanja. Na osnovi dugogodišnjeg iskustva u citogenetičkom nadzoru, zaključujemo da se pri tumačenju pojedinačnih nalaza MN-testa utjecaj navike pušenja svakako mora uzeti u obzir jer mutageni i genotoksični spojevi (reaktivni kisikovi radikali, policiklički aromatski ugljikovodici, nitrozamini, aldehidi i dr.) koji nastaju tijekom pušenja cigareta mogu djelovati sinergistički s drugim štetnostima, o čemu posebno valja voditi računa u profesionalno izloženih ispitanika.

U ovome istraživanju nisu bili posebno vrednovani utjecaji čimbenika prehrane. S obzirom na to da je naša država malena, kako površinom tako i brojem stanovnika, smatramo da na broju ispitanika koji su bili uključeni u istraživanje nije imalo smisla uspoređivati regionalne razlike s obzirom na vrstu prehrane jer njih danas više i nema, osobito zbog sve jačeg utjecaja globalizacije na prehrambene navike stanovništva, a i zbog sve manjeg trošenja lokalno proizvedene hrane i prevladavajućeg konzumiranja prerađenih namirnica uvezenih iz različitih dijelova Europe i svijeta. Uvidom u podatke iz anketnih upitnika utvrđeno je da se radi o prosječnoj hrvatskoj populaciji sa sličnim prehrambenim navikama u kojoj nije bilo pothranjenih ili suviše pretilih ispitanika, niti onih s posebnim načinima prehrane. Podaci ranijeg istraživanja provedenog na vegetarijancima i ispitanicima s klasičnom prehranom ne upućuju na značajne razlike u učestalosti MN (33). Međutim, utvrđeno je da deficit folne kiseline, niska koncentracija vitamina B12 te porast koncentracije homocisteina u plazmi mogu korelirati s porastom broja MN (40, 64, 65).

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem poslužiti će kao osnova za usporedbu rezultata ispitanika profesionalno izloženih različitim kemijskim i fizikalnim štetnostima, ali nam je cilj i postupno

nadograđivati postojeću bazu podataka. Na osnovi dosadašnjih iskustava i saznanja, MN-test ima veliku prednost pred ostalim citogenetičkim testovima jer omogućuje procjenu oštećenja na razini funkcije i cjelovitosti diobenog vretena, što ostale metode ne mogu (10). Važna mu je prednost što omogućuje utvrđivanje podrijetla MN, čime se dobivaju korisni podaci o individualnoj nestabilnosti genoma (46). Također, treba napomenuti da taj test omogućuje procjenu učestalosti nuklearnih pupova, koji su pak indirektni pokazatelj amplifikacije pojedinih gena (65). Nadalje u MN-testu mogu se istodobno brojiti i nukleoplazmatski mostovi koji su pokazatelj postojanja bicentričnih kromosoma u stanici koji se tijekom diobe nisu mogli raspodijeliti u stanice kćeri (65, 66). Osim toga, ovaj test omogućuje i utvrđivanje broja stanica u apoptozi i nekrozi (66-68), kao i indeksa diobe jezgara (NDI, engl. *nuclear division index*) koji je pokazatelj brzine proliferacije stanica te upućuje na trajanje staničnog ciklusa u uvjetima *in vitro* (11, 12). Svi se ti podaci simultano određuju prema kriterijima koje je utvrdio projekt HUMN (11). U Hrvatskoj su prve rezultate MN-testa provedenog primjenom kriterija HUMN-a na općoj populaciji prikazali Garaj-Vrhovac i suradnici (16). U tom su istraživanju navedeni i podaci za učestalost nuklearnih pupova i nukleoplazmatskih mostova. Njihova je učestalost također istražena u okviru projekta HUMN (66). Za razliku od MN, čije je prognostičko značenje dobro poznato i dokazano, pravo značenje nuklearnih pupova i nukleoplazmatskih mostova u biološkom nadzoru tek treba razjasniti i potkrijepiti podacima na velikom broju ispitanika, kako na razini opće tako i na razini izloženih populacija. Naime, oni se u MN-testu analiziraju tek desetak godina. Stoga je u praksi prikladno utvrditi ukupni broj MN kao vjerodostojan pokazatelj razine citogenetičkog oštećenja. Učestalost MN se pri specifičnim izloženostima dodatno može utvrditi i u mononuklearnim limfocitima (68). Također je korisno razmotriti i raspodjelu MN jer se iz prisutnosti stanica s više MN također može zaključiti o mogućim štetnim utjecajima čimbenika kojima je neki ispitanik izložen, kao i aneugemim ili klastogenim mehanizmima koji su doveli do nastanka MN. Jedan od najnovijih protokola MN-testa (12) navodi da se u MN-testu na ljudskim limfocitima pod optimalnim uvjetima na 1000 binuklearnih limfocita može očekivati 0 do 5 nuklearnih pupova te 0 do 10 nukleoplazmatskih mostova, dok apoptoza može biti 0 % do 7 %, a nekroza 0 % do 9 %. Ti su podaci svakako korisni za tumačenje rezultata MN-testa,

imajući u vidu i gornju graničnu vrijednost za opću populaciju RH koja za naš dijagnostički laboratorij iznosi 12,5 MN na 1000 stanica. To bi bile osnovne smjernice kojima se treba rukovoditi pri tumačenju nalaza. Međutim, pri tumačenju pojedinačnih „graničnih“ slučajeva unutar populacije izloženih ispitanika u obzir treba uzeti sve unutarnje i vanjske čimbenike koji sinergističkim djelovanjem mogu značajno povisiti ukupnu razinu MN. Detaljan prikaz tih čimbenika može se naći u prikazu kojega su autori Battershill i sur. (30).

Naposlijetku, treba istaknuti da je MN-test koristan i u otkrivanju nestabilnosti genoma koja se dovodi u vezu s povećanim rizikom od pojave raka (69). U novije vrijeme dokazana je i uzročno-posljedična veza između povećanog broja MN i nekih karcinoma (primjerice urogenitalnih karcinoma i karcinoma probavnog sustava) (70). Također je dokazano da neovisno o sijelima zloćudnih tumora oboljeli ispitanici prije liječenja imaju povišenu razinu MN u odnosu na opću populaciju (71).

Uzevši u obzir sve navedene prednosti, jednostavnost primjene te dokazanu osjetljivost MN-testa, smatramo da je izbor ove metode, kao prikladnog pokazatelja citogenetičkog rizika u profesionalno izloženih populacija, potpuno opravdan.

U ovome su istraživanju ustanovljene normalne i granične vrijednosti MN-testa koje su u skladu s vrijednostima MN-testa utvrđenim na općoj populaciji u drugim svjetskim laboratorijima. Dobivene će vrijednosti poslužiti kao osnova za usporedbu i tumačenje nalaza MN-testa u ispitanika izloženih populacija te daljnju nadogradnju laboratorijske baze podataka.

Zahvala

Rad je izrađen uz financijsku potporu projekata MZOŠ 022-0222148-2137 i 022-0222148-2125.

LITERATURA

1. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DEG, Tice R, Waters MD, Aitio A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res* 2000;463:111-72.
2. World Health Organization (WHO). Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. *Environmental Health Criteria* 222 [pristup 20. siječnja 2010.]. Dostupno na <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>.
3. Hagmar L, Bonassi S, Strömberg U, Mikoczy Z, Lando C, Hansten I-L, Huici Montagud A, Knudsen L, Norppa H,

- Reuterwall C, Tinnerberg H, Brøgger A, Forni A, Høgstedt B, Lambert B, Mitelman F, Nordenson I, Salomaa S, Skerfving S. Cancer predictive value of cytogenetic markers used in occupational health surveillance programs: a report from an ongoing study by the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Mutat Res* 1998;405:171-8.
4. Albertini RJ, Nicklas JA, O'Neill JP. Future research directions for evaluating human genetic and cancer risk from environmental exposures. *Environ Health Persp* 1996;104(Suppl 3):503-10.
 5. International Atomic Energy Agency (IAEA). Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. International Atomic Agency Technical Report Series 405. Vienna: IAEA; 2001.
 6. Kassie F, Parzefall W, Knasmüller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res* 2000;463:13-31.
 7. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004;26:249-61.
 8. Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin Y, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Jia C, Di Giorgio M, Ferguson LR, Fučić A, Garcia Lima O, Hrelia P, Krishnaja AP, Lee T-K, Migliore L, Mikhalevich L, Mirkova E, Mosesso P, Müller W-U, Odagiri Y, Scarfo MR, Szabova E, Vorobtsova I, Vral A, Zijno A. HUMAN MicroNucleus Project: International database comparison for results with the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen* 2001;37:31-45.
 9. Miller B, Albertini S, Locher F, Thybaud V, Lorge E. Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutat Res* 1997;392:45-59.
 10. Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decodier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochemie* 2006;88:1515-31.
 11. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 2003;534:65-75.
 12. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2007;2:1084-104.
 13. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 1993;285:35-44.
 14. Norppa H, Luomahaara S, Heikänen H, Roth S, Sorsa M, Renzi L, Lindholm C. Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens. *Environ Health Persp* 1993;101(Suppl 3):139-43.
 15. Kirsch Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Vanhumelen P. The *in vitro* micronucleus test - a multiendpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res* 1997;392:19-30.
 16. Garaj-Vrhovac V, Đurinec M, Kopjar N, Oreščanin V. A survey on the cytogenetic status of the Croatian general population by use of the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res* 2008;649:91-100.
 17. Surallés J, Carbonell E, Degraffi F, Antoccia A, Tanzarella C. A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 1994;7:407-10.
 18. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M, Lorge E, Norppa H, Surrales J, von der Hude W, Wakata A. Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:167-72.
 19. Murgia E, Ballardini M, Bonassi S, Rossi AM, Barale R. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutat Res* 2008;639:27-34.
 20. Burcham PC. Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. *Mutat Res* 1999;443:11-36.
 21. Fenech M, Morley A. The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutat Res* 1985;148:99-105.
 22. Heddle J. Micronuclei *in vivo*. *Prog Clin Biol Res* 1990;340:185-94.
 23. Yager J. The effect of background variables on human peripheral lymphocyte micronuclei. *IARC Sci Publ* 1990;104:147-50.
 24. Norppa H, Hayashi M, Maki Paakanen J, Sorsa M. The micronucleus assay in lymphocytes. *Prog Clin Biol Res* 1990;40:207-16.
 25. Elhajouji A, Cunha M, Kirsch-Volders M. Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis* 1998;13:193-8.
 26. Di Giorgio C, De Méo MP, Laget M, Guiraud H, Botta A, Duménil G. The micronucleus assay in human lymphocytes: screening for inter-individual variability and application to biomonitoring. *Carcinogenesis* 1994;15:313-7.
 27. Milosevic-Djordjevic O, Grujicic D, Novakovic T, Arsenijevic S, Marinkovic D. Micronuclei and ageing in a sample of Yugoslavian population. *Russ J Genet* 2002;38:201-4.
 28. Duffaud F, Orsiere T, Villani P, Pelissier AL, Volot F, Favre R, Botta A. Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients. *Mutagenesis* 1997;12:227-31.
 29. Barale R, Marrazzini A, Bacci E, Di Sibio A, Tessa A, Cocchi L, Scarcelli V, Lubrano V, Vassalle C, Landi S. Sister-chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1650 subjects in an Italian population: I. Contribution of methodological factors. *Environ Mol Mutagen* 1998;31:218-27.
 30. Battershill JM, Burnett K, Bull S. Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitoring studies *Mutagenesis* 2008;23:423-37.
 31. Fenech M, Neville S, Rinaldi J. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutat Res* 1994;313:203-7.
 32. Bonassi S, Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Bigatti P, Camurri L, Dalprà L, De Ferrari M, Forni A, Lando C, Padovani P, Pasquini R, Stella M, Puntoni R. Influence of sex on cytogenetic end points - evidence from a large human sample and review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:671-9.

33. Kažimirová A, Barančoková M, Krajčovičová-Kudlačková M, Volkovová K, Staruchová M, Valachovičová M, Pauková V, Blažiček P, Wsolová L, Dušinská M. The relationship between micronuclei in human lymphocytes and selected micronutrients in vegetarians and non-vegetarians. *Mutat Res* 2006;611:64-70.
34. Wojda A, Zietkiewicz E, Witt M. Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects. *Mutagenesis* 2007;22:195-200.
35. Tucker JD, Nath J, Hando JC. Activation status of the X chromosome in human micronucleated lymphocytes. *Hum Genet* 1996;97:471-5.
36. Bukvić N, Gentile M, Susca F, Fanelli M, Serio G, Buonadonna L, Capurso A, Guanti G. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. *Mutat Res* 2001;498:159-67.
37. Migliore L, Parrini M, Sbrana J, Biagini C, Battaglia A, Loprieno N. Micronucleated lymphocytes in people occupationally exposed to potential environmental contaminants: the age effect. *Mutat Res* 1991;256:13-20.
38. Forni A. Comparison of chromosome aberrations and micronuclei in testing genotoxicity in humans. *Toxicol Lett* 1994;72:185-90.
39. Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Casalone R, Dalprà L, De Ferrari M, Degrassi F, Forni A, Lamberti L, Lando C, Migliore L, Padovani P, Pasquini R, Puntoni R, Sbrana I, Stella M, Bonassi S. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidem Biom Prev* 1997;6:249-56.
40. Fenech M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes—a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutat Res* 1998;404:155-65.
41. Bolognesi C, Lando C, Forni A, Landini E, Scarpato R, Migliore L, Bonassi S. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age Ageing* 1999;28:393-7.
42. Guttenbach M, Schakowski R, Schmid M. Aneuploidy and ageing: sex chromosome exclusion into micronuclei. *Hum Genet* 1994;94:295-8.
43. Catalán J, Autio K, Wessman M, Lindholm C, Knuutila S, Sorsa M, Norppa H. Age-associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of women. *Cytogenet Cell Genet* 1995;68:11-6.
44. Nath J, Tucker JD, Hando JC. Y chromosome aneuploidy, micronuclei, kinetochores, and aging in men. *Chromosoma* 1995;103:725-31.
45. Catalán J, Autio K, Kuosma E, Norppa H. Age-dependent inclusion of sex chromosomes in lymphocyte micronuclei of man. *Am J Hum Genet* 1998;63:1464-72.
46. Norppa H, Falck GCM. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 2003;18:221-33.
47. Scarpato R, Landini E, Migliore L. Acrocentric chromosome frequency in spontaneous human lymphocyte micronuclei, evaluated by dual colour hybridization, is neither sex- nor age related. *Mutat Res* 1996;372:195-204.
48. Peace BE, Livingston G, Silberstein EB, Loper JC. A case of elevated spontaneous micronucleus frequency derived from chromosome 2. *Mutat Res* 1999;430:109-19.
49. Martínez-Pérez LM, Cerda-Flores RM, Gallegos-Cabriales EC, Dávila-Rodríguez MI, Ibarra-Costilla E, Cortés-Gutiérrez EI. Frequency of micronuclei in Mexicans with type 2 diabetes mellitus. *Prague Med Rep* 2007;108:248-55.
50. Yesilada E, Sahin I, Ozcan H, Yıldırım IH, Yologlu S, Taskapan C. Increased micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2006;154:563-8.
51. Téllez M, Martínez B, Criado B, Lostao CM, Peñagrikano O, Ortega B, Flores P, Ortiz-Lastra, Alonso RM, Jiménez RM, Arrieta I. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the antihypertensive drug atenolol in cultured human lymphocytes: effects of long-term therapy. *Mutagenesis* 2000;15:195-202.
52. Milošević-Đorđević O, Grujičić D, Marinković D, Arsenijević S, Banković S. Effect of various doses of gestogens on micronuclei frequency in human peripheral blood lymphocytes of pregnant women. *Hum Reprod* 2003;18:433-6.
53. Landi S, Barale R. Sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronuclei in female lymphocytes: correlations with biological rhythms and contraceptive pill use. *Mutagenesis* 1999;14:581-5.
54. Lončar D, Milošević-Djordjević O, Živanović A, Grujičić D, Arsenijević S. Effect of low-dose ethinylestradiol and gestodene in combination on the frequency of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes of healthy women *in vivo*. *Contraception* 2004;69:327-31.
55. Cochran ST, Khodadoust A, Norman A. Cytogenetic effects of contrast material in patients undergoing excretory urography. *Radiology* 1980;136:43-6.
56. Norman A, Cochran S, Bass D, Roe D. Effects of age, sex and diagnostic X-rays on chromosome damage. *Int J Radiat Biol* 1984;46:317-21.
57. Tomanin R, Ballarin C, Nardini B, Mastrangelo G, Sarto F. Influence of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes by the cytokinesis block method. *Mutagenesis* 1991;6:123-6.
58. Vaglenov AK, Karadjov AG. Micronucleus frequencies in Bulgarian control populations. *Central Eur J Occup Environ Med* 1997;3:187-94.
59. Schneider M, Diemer K, Engelhart K, Zankl H, Trommer WE, Biesalski HK. Protective effects of vitamins C and E on the number of micronuclei in lymphocytes of smokers and their role in ascorbate free radical formation in plasma. *Free Radic Res* 2001;34:209-19.
60. Xue K-X, Wang S, Ma G-J, Zhou P, Wu P-Q, Zhang R-F, Xu Z, Chen W-S, Wang Y-Q. Micronucleus formation in peripheral blood-lymphocytes from smokers and the influence of alcohol- and tea-drinking habits. *Int J Cancer* 1991;50:702-5.
61. Hoffmann H, Speit G. Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. *Mutat Res* 2005;581:105-14.
62. Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin Y, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Fenech M, The HUMN collaborative group. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat Res* 2003;543:155-66.
63. Ishikawa H, Tian Y, Yamauchi T. Influence of gender, age and lifestyle on micronuclei frequency in healthy Japanese population. *J Occup Health* 2003;45:179-81.

64. Crott J, Thomas P, Fenech M. Normal human lymphocytes exhibit a wide range of methionine-dependency which is related to altered cell division but not micronucleus frequency. *Mutagenesis* 2001;16:317-22.
65. Fenech M, Crott JW. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res* 2002;504:131-6.
66. Fenech M, Bonassi S, Turner J, Lando C, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Bigatti P, Bolognesi C, Cao J, De Luca G, Di Giorgio M, Ferguson LR, Fučić A, Garcia Lima O, Hadjidekova VV, Hrelia P, Jaworska A, Joksić G, Krishnaja AP, Lee T-K, Martelli A, McKay MJ, Migliore L, Mirkova E, Müller W-U, Odagiri Y, Orsiere T, Scarfi MR, Silva MJ, Sofuni T, Surallés J, Trenta G, Vorobtsova I, Vral A, Zijno A. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutat Res* 2003;534:45-64.
67. Fenech M, Crott J, Turner J, Brown S. Necrosis, apoptosis, cytotaxis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 1999;14:605-12.
68. Kirsch-Volders M, Fenech M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis* 2001;16:51-8.
69. Fenech M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discovery Today* 2002;7:1128-37.
70. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti P, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fučić A, Hagmar L, Joksić G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa H, Fenech M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007;28:625-31.
71. Milošević-Đorđević O, Grujičić D, Vasković Ž, Marinković D. High micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients irrespective of gender, smoking and cancer sites. *Tohoku J Exp Med* 2010;220:115-20.

Summary

NORMAL AND CUT-OFF VALUES OF THE CYTOKINESIS-BLOCK MICRONUCLEUS ASSAY ON PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN THE CROATIAN GENERAL POPULATION

The cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay on peripheral blood lymphocytes is one of the most important methods employed in cytogenetic biomonitoring. For the purposes of biological dosimetry, it is important to know the spontaneous frequency of a biomarker and its normal values in general population. These values are used for population databases, which should be updated regularly. In this study, MN levels were investigated in cytokinesis-blocked lymphocytes of 200 healthy male and female blood donors selected at random from the general population of Croatia. The aim was to assess the variability and determine possible influences of external and/or internal factors on the background levels of MN and to establish the cut-off value for the CBMN assay. The background frequency of MN was (6.90 ± 3.32) MN (median 7 MN) and the range was 0 to 18 MN per 1000 binuclear lymphocytes. The cut-off value, which corresponds to 95th percentile of the distribution of 200 individual values, was 12.5 MN. Spontaneous formation of MN was influenced by sex, age, and smoking. Women had higher MN levels than men. However, only age and smoking significantly increased the values of all parameters evaluated by the CBMN assay. Since the existing literature data on smoking-related formation of MN are contradictory, we will continue these investigations to resolve how the number of cigarettes smoked per day and the duration of smoking in years influence the results of the CBMN assay. Our results are consistent with the background MN frequencies reported by other cytogenetic laboratories worldwide. Normal and cut-off values estimated in this study will be used to update the current general population data and as reference for occupationally or accidental exposure.

KEY WORDS: *age, cytogenetic monitoring, gender, genome instability, risk, smoking habits, spontaneous formation of micronuclei*

CORRESPONDING AUTHOR:

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