

CITOGENETIČKA ANALIZA KROMOSOMSKIH ABERACIJA U OSOBA PROFESIONALNO IZLOŽENIH IONIZIRAJUĆEM ZRAČENJU

CYTOGENETIC ANALYSIS OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN PEOPLE PROFESSIONALLY EXPOSED TO IONISING RADIATION

Nada Starčević Čizmarević, Alena Buretić-Tomljanović, Saša Ostojić, Miljenko Kapović

SAŽETAK

S obzirom na sve veću izloženost humane populacije različitim izvorima radijacije, potrebno je, posebice u osoba profesionalno izloženih zračenju, pratiti njezine učinke na organizam. U ovom smo radu prikazali važnost primjene analize strukturnih kromosomskih aberacija, koja je najpouzdaniji biološki pokazatelj izloženosti ionizirajućem zračenju.

KLJUČNE RIJEČI: ionizirajuće zračenje, strukturne aberacije kromosoma, citogenetička analiza

UVOD

Različiti vanjski štetni čimbenici (zračenja, virusi, kemikalije itd.) uzrokuju oštećenja deoksiribonukleinske kiseline (DNK), molekule koja sadrži ukupnu genetičku informaciju svakog organizma. Danas se primjenjuju različite vrste testova kojima se određuje je li, i koliko, neka osoba izložena djelovanju mutagenih tvari. Citogenetička analiza kromosomskih aberacija pouzdan je test procjene oštećenosti DNK kao posljedice izloženosti ionizirajućem zračenju i pojedinim kemijskim mutagenima, dok su test izmjene sestrinskih kromatida i mikronukleus-test dobri pokazatelji izloženosti kemijskim mutagenima.^{1,2}

ABSTRACT

The people who are professionally exposed to radiation need to be monitored for its somatic and genetic effects. In this paper we presented the method of the structural chromosomal analysis that is the best biological indicator of the exposure to radiation.

KEY WORDS: ionising radiation, structural chromosomal aberrations, cytogenetic analysis

DJELOVANJE IONIZIRAJUĆEG ZRAČENJA

Zračenje koje ima dovoljno energije da razbije neutralne molekule u električki nabijene čestice, odnosno da izazove ionizaciju kroz neku materijalnu sredinu, naziva se ionizirajuće zračenje. Djelovanjem toga zračenja na živa bića, nastaju različita oštećenja koja mogu biti genetička i somatska. Genetička oštećenja nastaju zbog djelovanja zračenja na spolne stanice i učinci su vidljivi u nasljednika, dok se somatska oštećenja javljaju na tijelu ozračenih osoba. Neposredni somatski učinci akutnog zračenja organizma zapaženi su u individua koje su se zatekle u blizini središta atomske eksplozije u Japanu 1945. godine. Somatski učinci visoke doze zračenja na određenom tkivu uočavaju se u pacijenata koji se liječe od malignih bolesti i u osoba stradalih u nesrećama pri radu, uzrokovanim radioaktivnim materijalom. Genetički učinak zračenja očituje se na razini kromosoma i gena, mijenjajući najčešće strukturu kromosoma ili učestalost genskih mutacija.

Budući da stanice i tkiva sadrže oko 85% vode, velika je vjerojatnost interakcije zračenja s molekulama vode (indirektno djelovanje). Jedan manji dio unijete energije djelovat će i na organske makromolekule koje

Ustanova: Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Prispjelo: 16. 4. 2004.

Prihvaćeno: 30. 4. 2004.

Adresa za dopisivanje: Mr.sc. Nada Starčević Čizmarević, dipl. ing., Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilište u Rijeci, Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka. Tel.: 051-651-129, e-mail: snada@medri.hr

imaju ulogu u regulaciji složenih biokemijskih reakcija (direktno djelovanje).³ Promjene na molekulama vode i organskim molekulama temeljni su uzroci oštećenja stanice zračenjem.

Od svih oštećenja organskih makromolekula izazvanih zračenjem, najznačajnija su oštećenja nukleinskih kiselina, kako DNK tako i ribonukleinske kiseline – RNK. Osim indirektnih oštećenja, apsorbirana energija zračenja može ih oštetiti i direktno. Procesi sinteze DNK i RNK te stvaranje proteina mogu biti poremećeni zračenjem na više načina, a zajedničko im je da remete raspored baza u DNK i RNK ili pak prekidaju prijenos informacija o redosljedju tih baza. Neka od osnovnih oštećenja DNK-molekule koja remete njezinu replikaciju ili prijenos šifre na RNK, a izazvana su radijacijom, jesu: hidriranje baze, pri čemu jedna baza prelazi u drugu (tranzicija i transverzija), depurinacija, dimerizacija, odnosno proces spajanja baza istog lanca, unakrsno povezivanje DNK i proteina te dvostruki ili jednostruki prekid lanca između šećera i fosfata ili šećera i baza⁴

Energija ionizirajuće čestice može istodobno uzrokovati lom oba lanca iste molekule na susjednim mjestima. Lomovi mogu biti i posljedica djelovanja dvije neovisne čestice, pri čemu dolazi do prekida lanaca molekula DNK na različitim mjestima.

IZVORI I ZAŠTITA OD IONIZIRAJUĆEG ZRAČENJA

Ionizirajuće zračenje ne osjeća se pri radu, niti se može sa sigurnošću tvrditi postoji li, i koji je prag izloženosti radijaciji bez štetnih posljedica za profesionalno osoblje. S porastom spoznaja i novih mogućnosti na području znanosti i tehnike, raste i udio ionizirajućeg zračenja iz umjetnih izvora (tablica 1.).

Primjenu radijacije u medicini, danas je gotovo nemoguće izbjeći. Sve je češća i sve je više ljudi izloženo zračenju. Zračenja su nužna za ranu i točnu dijagnozu bolesti, a upotrebljavaju se i pri liječenju nekih bolesti. Za naše je prilike ustanovljeno da je izloženost stanovništva umjetnim izvorima radijacije gotovo jednaka izloženosti iz prirodnih izvora, a medicinska rendgenska dijagnostika daje oko 85% od ukupne doze koju pučanstvo prima iz svih umjetnih izvora.⁵ Medicinski izvori radijacije za stanovništvo jesu radiografija, rendgen prosvjetljavanja (dijaskopije), stomatološke snimke, scintigrafija i radioterapija.⁶

Pravilno provođenje mjera zaštite na radu može smanjiti neželjene posljedice ionizirajućeg zračenja. Današnji propisi o zaštiti od ionizirajućeg zračenja u skladu su s preporukama Međunarodne komisije za zaštitu od zračenja. Važeći Zakon o zaštiti od ionizirajućih zračenja u Republici Hrvatskoj donijet je 19. ožujka 1999. (Narodne novine broj 27/99), a kao jednu od mjera zaštite od ionizirajućih zračenja navodi mjere za

Tablica 1. Izvori ionizirajućih zračenja

Table 1 Sources of ionising radiation

a)	prirodni izvori	49%
	kozmičko zračenje	12%
	radioizotopi izvan tijela	27%
	radioizotopi u tijelu	10%
b)	umjetni izvori	51%
	rtg dijagnostika	40%
	radioterapija	5%
	radioaktivni otpad	5%
	ostali umjetni izvori	1%

utvrđivanje i praćenje zdravlja djelatnika koji su na radnomu mjestu izloženi ionizirajućim zračenjima. Na temelju ovog zakona, ministar zdravstva donosi Pravilnik o zdravstvenim uvjetima za rad s izvorima ionizirajućih zračenja te mjerilima, sadržaju, načinu i rokovima čuvanja podataka o zdravstvenim pregledima osoba koje rade s izvorima ionizirajućih zračenja (NN 76/00). Prema tom pravilniku, analiza kromosomskih aberacija izvodi se pri zdravstvenom pregledu prije početka rada na novom radnome mjestu (tzv. prethodni pregled), zatim pri proširenom nadzornom zdravstvenom pregledu (svakih 60 mjeseci) i pri izvanrednom nadzornom zdravstvenom pregledu djelatnika koji su primili prekomjernu dozu zračenja. Analiza kromosomskih aberacija nije uključena u redovit zdravstveni pregled (svakih 12 mjeseci) djelatnika koji rade s izvorima ionizirajućih zračenja.

CITOGENETIČKA ANALIZA KROMOSOMSKIH ABERACIJA

Najpouzdaniji biološki pokazatelji izloženosti ionizirajućem zračenju jesu kromosomske aberacije, i to posebno promjene strukture kromosoma. Aberacije koje nastaju, mogu biti vidljive na kromatidama ili kromosomima, ovisno o fazi staničnog ciklusa u kojoj je došlo do oštećenja.⁷

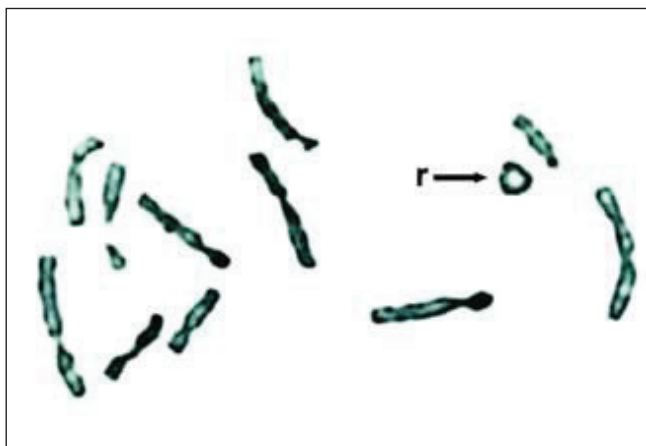
Analiza kromosomskih aberacija izvodi se na kromosomskim preparatima limfocita periferne krvi. Kultivacija limfocita periferne krvi traje 48 sati u sterilnim uvjetima na 37°C. Kromosomski preparati boje se 20%-tnom otopinom *Giemse*, nakon čega se analizira 200 mitoz po osobi. Pri uzimanju krvi za analizu, prikupljaju se podaci o kroničnim, preboljelim i nasljednim bolestima, primljenoj terapiji i rendgenskim pretragama, prethodnim zaposlenjima i izloženosti mutagenima te zaštitnim sredstvima i apsorbiranim dozama na radnomu mjestu,

kao i podaci o konzumaciji potencijalnih genotoksičnih supstancija.

Detaljno prikupljanje anamnestičkih podataka važno je zato što postoji čitav niz čimbenika o kojima ovisi učestalost kromosomskih aberacija, kao što su: doza ionizirajućeg zračenja, način primanja doze – akutna doza (određena doza primljena jednokratno) ili kronična doza (izloženost radijaciji traje duže vrijeme), vrsta ionizirajućeg zračenja (rendgensko zračenje, γ -zračenje, β -zračenje itd.), vremenski razmak od izloženosti zračenju do izvođenja analize (s vremenom, stanice s tipičnim aberacijama nestaju iz cirkulacije i zamjenjuju ih nove neoštećene stanice), istodobna profesionalna izloženost različitim fizičkim i kemijskim agensima ili pak istodobna profesionalna i dijagnostička/terapijska izloženost, genetička predispozicija te unutarnji unos radionukleida (u slučaju terapijskog ili slučajnog unosa radioaktivnih elemenata u organizam, ova analiza ima ograničenu vrijednost).^{8,9}

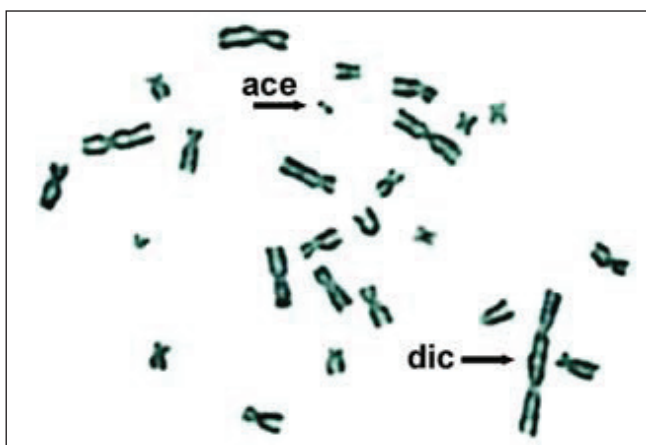
Kromosomske aberacije koje nastaju kao posljedica ionizirajućeg zračenja jesu kromatidni i kromosomski prekidi (engl. – gap) te lomovi, minute, acentrični fragmenti, dicentrični i prstenasti (engl. – ring) kromosomi (slika 1.–4.). Kromatidne lomove imaju i osobe koje nisu profesionalno izložene radijaciji, ali u manjem postotku (1–2%). Gapovi nisu pravi lomovi kromatida već prividno odvojeni dijelovi zbog neobojenosti manjega kromatidnog dijela, a mišljenja o njihovom značenju razlikuju se. Minute su acentrični fragmenti manji od širine kromatide. Acentrični fragmenti su odlomljeni dijelovi kromosoma koji nemaju centromeru. Dicentrični kromosom podrazumijeva kromosom s dvije centromere, a nastaje kao posljedica loma na dva različita kromosoma i spajanjem tih dvaju kromosoma. Uz dicentrične kromosome obvezno su prisutni i pripadajući acentrični fragmenti, što pomaže pri identifikaciji dicentričnih kromosoma. *Ring*-kromosom nastaje kao posljedica loma na oba kraka jednog kromosoma, nakon čega nastaju acentrični fragmenti, a preostali terminalni dijelovi kromosoma koji sadrži centromeru, spajaju se u “prstenasti” kromosom. Dicentrični kromosomi javljaju se u neozračenih osoba u svega 1 na 1000 slučajeva, dok je učestalost *ring*-kromosoma oko 5% učestalosti dicentričnog kromosoma.¹⁰ Stoga nalaz s dicentričnim ili *ring*-kromosomima popraćenim acentričnim fragmentima upućuje na prekomjernu izloženost ionizirajućem zračenju.¹¹

Pri procjeni oštećenja kromosoma radijacijom važna je ne samo vrsta nego i učestalost pojedinih aberacija. Tako, npr., ako se citogenetičkom analizom ustanovi pet ili više acentričnih fragmenata, dva ili više dicentričnih kromosoma ili jedan prstenasti kromosom, ili pak ako je ukupan zbroj acentričnih fragmenata i dicentričnih kromosoma jednak ili veći od 5, učestalost i tip kro-



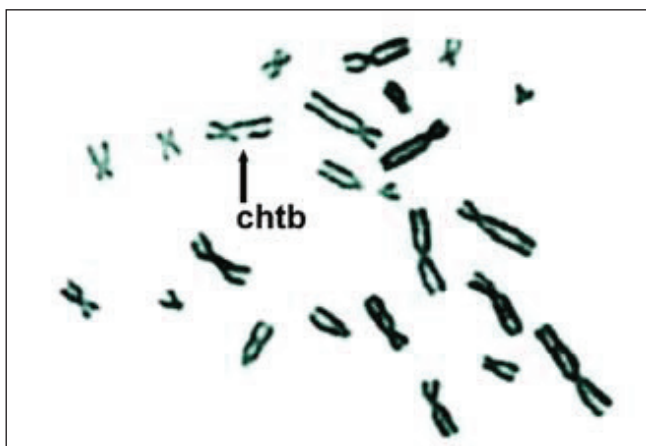
Slika 1. Parcijalna metafaza s *ring*-kromosomom (r)

Figure 1 *Partial metaphase with ring chromosome (r)*



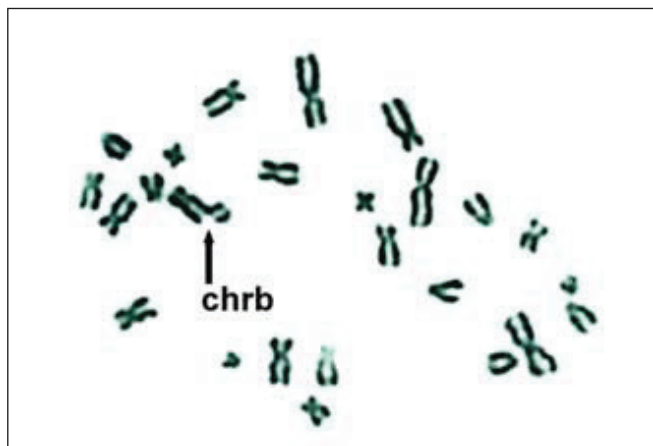
Slika 2. Parcijalna metafaza s dicentričnim kromosomom (dic) i pratećim acentričnim fragmentom (ace)

Figure 2 *Partial metaphase with dicentric chromosome (dic) and accompanying acentric fragment (ace)*



Slika 3. Parcijalna metafaza s kromatidnim lomom (chtb)

Figure 3 *Partial metaphase with chromatide break (chtb)*



Slika 4. Parcijalna metafaza s kromosomskim lomom (chr b)

Figure 4 Partial metaphase with chromosome break (chr b)

mosomskih aberacija odstupaju od kontrolnih vrijednosti za opću populaciju Republike Hrvatske. Takav nalaz pokazuje pretjeranu izloženost ionizirajućem zračenju pa se ispitanik smatra nesposobnim za rad u području nadzora oko izvora ionizirajućeg zračenja i upućuje se na kontrolni pregled za 180 dana.

Ako pak učestalost i tip kromosomskih aberacija odgovara gornjoj kontrolnoj vrijednosti za opću populaciju Republike Hrvatske, odnosno ako je tijekom analize ustanovljeno da je ukupan zbroj acentričnih fragmenata i dicentričnih kromosoma jednak 4, ispitanik nije nesposoban za rad u području nadzora oko izvora ionizirajućeg zračenja, ali se valjanost liječničke svjedodžbe izdaje na vrijeme od 180 dana i pretraga se ponavlja u tom vremenu.

Za pisanje nalaza upotrebljava se internacionalna nomenklatura *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (1995) – ISCN 1995 (tablica 2.).

Tablica 2. Najčešće rabljene kratice kromatidnih i kromosomskih aberacija

Table 2 Most frequently used abbreviations of chromatide and chromosomal aberrations

Kromatidne aberacije	Kromosomske aberacije
chtg - od engl. chromatid gap (kromatidni gap)	chrg - od engl. chromosome gap (kromosomski gap)
chtb - od engl. chromatid break (kromatidni lom)	chr b - od engl. chromosome break (kromosomski lom)
smin - od engl. single minute (jednostruka minuta)	dmin - od engl. double minutes (dvostruka minuta)
	ace - od engl. acentric fragment (acentrični fragment)
	dic - od engl. dicentric chromosome (dicentrični kromosom)
	r - od engl. ring chromosome (prstenasti kromosom)
	mar - od engl. marker chromosome (biljeg kromosom)



ANALIZA KROMOSOMSKIH ABERACIJA
 Broj analiziranih limfocita: 200
 Kromosomske aberacije:
 dmin - (2) 1,0%
 ace - (1) 0,5%
 dic - (1) 0,5%
 Kromatidne aberacije:
 chtg - (1) 0,5%
 Učestalost i tip kromosomskih aberacija odgovara gornjoj kontrolnoj vrijednosti za opću populaciju RH, te se predlaže ponoviti pretragu u roku 180 dana.

Slika 5. Primjer graničnog nalaza

Figure 5 Example of a borderline result

KRATKI PRIKAZ I KOMENTAR NAŠIH REZULTATA

Analiza kromosomskih aberacija osoba profesionalno izloženih ionizirajućem zračenju izvodi se na Zavodu za Biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci od 1989. godine. Ukupno je ispitano 800 osoba (tablica 3.), od toga 76,5% (n=612) do srpnja 2000., kada je objavljen novi i danas važeći Pravilnik o zdravstvenim pregledima osoba koje rade s izvorima ionizirajućih zračenja.

U razdoblju do 2000. godine obrađen je veći broj ispitanika i zabilježeno je pet graničnih nalaza te pet nalaza koji odstupaju od graničnih vrijednosti. Međutim, prema tada važećim propisima, granični nalaz podrazumijevao je 4%–8% kromosomskih lomova, dok je prisutnost svega jednog dicentričnog kromosoma upućivala na prekomjernu izloženost zračenju.

Od 2000. godine analizirano je 188 osoba. Njih 126 su zdravstveni djelatnici, od čega je 45 obavljalo prethodni pregled prije početka rada u zoni ionizirajućeg zračenja, a 81 djelatnik već je radio s izvorima ion-

Tablica 3. Učestalost dicentričnog i prstenastog kromosoma u ispitanika i u općoj populaciji^{10,12}

Table 3 *Incidence of dicentric and ring chromosome in testes and in general population*

Vrste kromosomskih aberacija	Ispitanici n (%)	Opća populacija (%)
dic	15 (1,2)	0,1
r	1 (0,1)	0,005

izirajućeg zračenja. Niti jedan nalaz nije odstupao od kontrolnih vrijednosti za opću populaciju Republike Hrvatske, dok su u jedne osobe vrijednosti dobivene citogenetičkom analizom bile granične (slika 5.).

Iz tablice 3. vidljivo je da se strukturne aberacije kromosoma nađu u osoba profesionalno izloženih ionizirajućem zračenju puno češće nego u općoj populaciji. Tako je učestalost dicentričnih kromosoma u skupini naših ispitanika 19 puta veća, a marker-kromosoma i prstenastog kromosoma čak 25 puta veća nego u općoj populaciji. Nalaz prstenastog kromosoma vrlo je rijedak pa smo i u našem uzorku od 800 ispitanika pronašli samo jedan takav kromosom. Već smo naveli da je nalaz jednoga prstenastog kromosoma pokazatelj prekomjerne izloženosti zračenju i čini osobu privremeno nesposobnom za rad u zoni radijacije.

ZAKLJUČAK

Citogenetička analiza poradi procjene doze štetnog djelovanja ionizirajućeg zračenja, dobar je pokazatelj izloženosti ionizirajućem zračenju, što potvrđuju i znatno više učestalosti kromosomskih aberacija u naših ispitanika u odnosu prema vrijednostima u općoj populaciji. To je složena pretraga koja obuhvaća analizu velikog broja metafaza i određeno iskustvo citogenetičara. Za korektnu procjenu i praćenje osoba profesionalno izloženih ionizirajućem zračenju, uz analizu kromosomskih aberacija potrebni su i podaci koji uključuju trajanje izloženosti ionizirajućem zračenju, primljene doze, rabljene zaštite i vrste agensa.

LITERATURA

- Cardoso RS, Takahashi-Hyodo S, Peitl P Jr, Ghilardi-Neto T, Sakamoto-Hojo ET. Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei, and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to ionizing radiation. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2001; 21: 431-9.
- Erol MK, Oztas S, Bozkurt E, Karakelleoglu S. Sister chromatid exchange analysis and chromosoma aberration studies in interventional cardiology laboratory workers: one war follow up study. *Jpn Heart J*. 2002; 43:159-66.
- Jakobović Z. 1991. Biološko djelovanje ionizirajućeg zračenja. U: *Ionizirajuće zračenje i čovjek*. Školska knjiga Zagreb: 70-78.
- Brusick D. 1987. *Fundamentals of Genetic Toxicity*. U: *Principles of Genetic Toxicology*. Second Edition. Plenum Press New York and London: 13-52.
- Hebrang A., Petrović F. 1987. Izvori radijacije kojima je izložen čovjek. U: *Radijacija i zaštita u medicinskoj dijagnostici*. Praxis medica, Medicinska knjiga Beograd – Zagreb: 93-134.
- Al-Haj AN, Lagarde CS. Statistical analysis of historical occupational dose records at a large medical center. *Health Phys*. 2002; 83:854-60.
- Pincheira J, Lopez I, Sanhueza S, Ferruz P, Navarrete MH, Santos MJ, Lopez-Saez JF. G2 repair and chromosomal damage in lymphocytes from workers occupationally exposed to low-level ionizing radiation. *Biol Res*. 1999; 32:297-306.
- Bender MA, Awa AA, Brooks AL, Evans HJ, Groer PG, Littlefield LG, Pereira C, Preston RJ, Wachholz BW. Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. *Mutat Res*. 1988; 196:103-59.
- Maffei F, Angelini S, Forti GC, Violante FS, Lodi V, Mattioli S, Hrelia P. Spectrum of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of hospital workers occupationally exposed to low doses of ionizing radiation. *Mutat Res*. 2004 22; 547: 91-9.
- Rozgaj R, Kasuba V, Simic D. The frequency of dicentrics and acentrics and the incidence of rogue cells in radiation workers. *Mutagenesis*. 2002; 17:135-9.
- Horvat Đ. 1986. Strukturne aberacije kromosoma u sistemu zaštite od zračenja. U: *Zdravstveni i dozimetrijski nadzor osoba zaposlenih u zoni ionizirajućeg zračenja*. Sveučilišna naklada Liber Zagreb: 19-26.
- Rauch A, Pfeiffer RA, Trautmann U, Liehr T, Rott HD, Ulmer R. A study of ten small supernumerary (marker) chromosomes identified by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Clin Genet*. 1992; 42:84-90.