

**CITOGENETIČKA ANALIZA ĆELIJA KOSTNE SRŽI PACOVA
TRETIRANIH TOLUENOM***

***CYTOGENETIC ANALYSIS OF BONE MARROW CELLS OF RATS
TREATED WITH TOLUENE***

Svetlana Fišter, S. Jović, Jelka Stevanović, Milica Kovačević-Filipović**

U ovom radu su navedeni rezultati ispitivanja efekata toluena na ćelije kostne srži ženki Wistar pacova, koji su intraperitonealno dobijali toluen tokom 8 i 11 dana, u dozi od 0.602 µg /200 g telesne mase. Citogenetički su analizirane metafazne figure hromozoma da bi se utvrdila učestalost pojavljivanja strukturnih aberacija – prekida i gapova. Utvrđene su vrednosti mitotskog indeksa i broja poliploidnih ćelija. Nije ustanovljeno značajno povećanje učestalosti pojavljivanja prekida i gapova na hromozomima tretiranih jedinki u odnosu na kontrole, što znači da u uslovima ovog eksperimenta toluen nije iskazao nesumnjiv genotoksični efekat. Međutim, ustanovljeno je značajno povećanje vrednosti mitotskog indeksa, kao i značajno povećanje broja poliploidnih ćelija u obe grupe tretiranih pacova u odnosu na kontrole.

Ključne reči: toluen, genotoksičnost, hromozomske aberacije, prekidi i gapovi, poliploidne ćelije

Uvod / Introduction

Toluen se koristi u mnogim industrijskim procesima: u proizvodnji derivata benzena, različitih farmaceutskih sredstava, boja, parfema, trinitrotoluola (TNT) i deterdženata. Upotrebljava se i kao rastvarač za boje i gume, a predstavlja osnovu u proizvodnji fenola, benzena, krezola i drugih supstancija. Toksičnost ove materije je nesumnjivo dokazana. Veliki broj podataka iz literature ukazuje da toluen deluje: nefrotoksično [26], neurotoksično [23], hematotoksično [24] i

* Rad primljen za štampu 24. 5. 2004. godine

** Dr Svetlana Fišter, viši naučni saradnik, Katedra za biologiju; Slavoljub Jović, asistent pravnika, dr Jelka Stevanović, vanredni profesor, Katedra za fiziologiju i biohemiju, mr Milica Kovačević-Filipović, asistent, Katedra za patološku fiziologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

embriotoksično [11]. Osim toga, ima nalaza koji ukazuju i na moguće genotoksično delovanje toluena [4, 9, 14, 20]. Izloženost toluenu uzrokuje povišenje koncentracije slobodnih radikala i razvoj oksidativnog stresa praćenog pojačanom granulocitopoezom [5].

Dosadašnja istraživanja genotoksičnih efekta toluena na profesionalno izloženim ljudima, kao i u različitim laboratorijskim sistemima testiranja, dala su rezultate koje je teško uopštiti u jedinstvenu sliku. Toksični i genotoksični efekti toluena nesumnjivo zavise od dužine izloženosti, stanja biološkog sistema i prisustva drugih agenasa [3, 1]. Nije uvek jasno da li genotoksična i kancerogena svojstva, koja se pripisuju toluenu, potiču od samog toluena i njegovih metabolita [1], ili od pratećih supstancija, pre svega benzena čiji su tragovi skoro uvek prisutni. U literaturi mogu da se nađu donekle različiti rezultati. Tako je kod obučarskih radnika izloženih koncentracijama benzena do 15 ppm i toluena do 50 ppm, u toku 17 godina, zapažen porast hromozomskih aberacija, ali nije ustanovljena značajna korelacija između rezultata citogenetičkog testa i biomarkera izloženosti – koncentracije toluena i benzena u krvi ispitanika i fenola u urinu [4]. Autori ističu da rezultate treba skoro individualno tumačiti, imajući u vidu i efekte dodatnih faktora, kao što su godine starosti, pušenje i pijenje alkohola. Pelchova i sar. [20] iako primenom bakterijskog testa, ne dokazuju genotoksikante u urinu, povišenje učestanosti pojavljivanja hromozomskih aberacija kod izloženih ljudi pripisuju efektima toluena. Ispitujući efekte toluena primenom metode razmene sestrinskih hromatida – SCE-a, kod 42 štamparska radnika izložena ambijentalnom zagađenju, Hammer [9] je ustanovio da je učestalost SCE-a bila tri puta veća u grupi izloženih radnika nego u kontroli. Hammer [9], međutim, ističe da mora da se ima u vidu individualni metabolički balans, koji je posledica genetičkog polimorfizma, kada se govori o genetičkom riziku od toluena. Za razliku od istraživanja na profesionalno izloženim ljudima, neki laboratorijski eksperimenti, pri kojima je izvedeno dugogodišnje inhalaciono izlaganje miševa i pacova toluenu nisu dokazali genotoksična, kao ni kancerogena svojstva toluena [1]. Primenom mikronukleus testa - *in vitro*, [27] takođe nije dokazana genotoksična aktivnost toluena, benzena, acetona i njihovih smeša.

Cilj ovoga rada je bio da se ustanovi da li kratkotrajna (7 i 11 dana) intraperitonealna aplikacija toluena izaziva genotoksične promene, odnosno da li uzrokuje povećanu učestalost strukturnih promena tipa gapa i hromozomskih prekida, kao i da se utvrdi da li toluen izaziva pojavu numeričkih aberacija i poremećaja u mitotskoj aktivnosti ćelija, što bi ukazalo na njegova eventualna kancerogena svojstva.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

U eksperimentu su korišćene ženke Wistar pacova, telesne mase 250-300 g. Pacovi su tretirani svakodnevnim intraperitonealnim davanjem 0,602 µg toluena rastvorenog u propilen glikolu (0,3 ml/200 g telesne mase) tokom 8 i 11

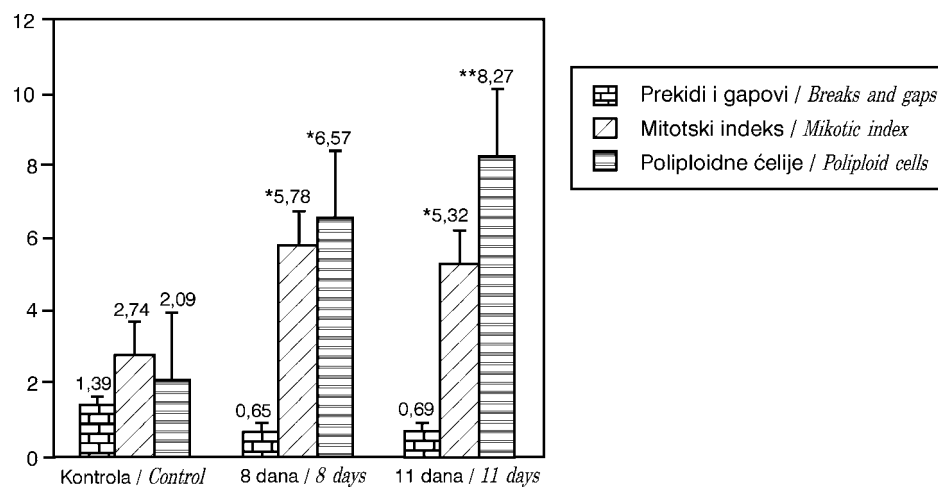
dana. Pre žrtvovanja pacovi su anestetizirani intramuskularno davanjem 0,5 ml smeše ketamina, ketalara i formidala. Kontrolna grupa pacova nije tretirana. Metafazne figure hromozoma, pogodne za citogenetičku analizu, dobijene su preparacijom iz kostne srži, prema modifikovanoj metodi Hsu i Patton [12].

Posle žrtvovanja, kostna srž femura i tibije je ispirana 5,4% rastvorom KCl. Posle 30 minuta stajanja (uz povremeno resuspendovanje) u hipotoničnom rastvoru, na sobnoj temperaturi, suspenzija je centrifugovana 7 minuta na 1000 obrtaja. Supernatant je odstranjen, a materijal u talogu je fiksiran Karnojevom fiksativom: metanol – glacijalna sirćetna kiselina u odnosu 3:1. Posle 15 minuta stajanja u fiksativu, materijal je ponovo centrifugovan 7 minuta na 1000 obrtaja. Postupak fiksacije ponovljen je dva do tri puta. Hromozomski preparati pravljani su kapanjem fiksanog materijala na zaleđene mikroskopske pločice, a potom sušenjem nad plamenikom. Bojenje je obavljeno u 15 % rastvoru gimze (Giemsa).

Metafazne figure hromozoma su analizirane kako bi se utvrdila učestalost pojavljivanja hromozomskih prekida i gapova, kao i broja poliploidnih ćelija. U uzorcima su određene i vrednosti mitotskog indeksa. Svi dobijeni rezultati, statistički su obrađeni Student t-testom.

Rezultati / Results

Rezultati istraživanja su prikazani na tabeli 1 i grafikonu 1.



(**) $p < 0,01$, (*) $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu / (**) $p < 0,01$, (*) $p < 0,05$ vs control

Grafikon 1. Efekti intraperitonealno aplikovanog toluena ženjkama Wistar pacova, tokom 8 i 11 dana u dozi od 0.602 $\mu\text{g}/200$ g telesne mase, na srednje vrednosti prekida i gapova, mitotskog indeksa i poliploidnih ćelija u njihovoj kostnoj srži /

Graph 2. The effects of intraperitoneal application of toluene to female Wistar rats during 8 and 11 days, 0.602 $\mu\text{g}/200$ g body weight, on mean values of breaks and gaps, mitotic indices and polyploid cells in their bone marrow

Tabela 1. Citogenetičke promene na ćelijama kostne srži ženki Wistar pacova intraperitonealno tretiranih toluenom, tokom 8 i 11 dana, u dozi od 0,602 µg/200 g telesne mase
 Table 1. Cytogenetic effects in female Wistar rat bone marrow cells, treated with intraperitoneal application of toluene, during 8 and 11 days, 0.602 mg/200 g body weight

Broj / Number	Pregledano mitozu / Mitoses examined	Prekida i gapova / Breaks and gaps	Poliploidnih ćelija / Polyploid cells	Mitotski indeks / Mitotic Index
<i>Kontrola / Control</i>				
1	30	1	-	2,97
2	25	-	1	2,52
3	20	-	1	3,11
4	23	1	-	3,06
5	25	-	1	2,19
	Σ=143	Σ=2 1,39 %	Σ=3 2,09 %	Σ=13,84 x̄ = 2,76
<i>8 dana tretmana toluenom / 8 days of toluene treatment</i>				
1	30	-	1	5,05
2	35	-	3	8,18
3	27	1	1	4,96
4	30	-	3	7,27
5	30	-	2	3,08
	Σ=152	Σ=1 0,65 %	Σ=10 *6,57 %	Σ=28,54 x̄ = *5,78
<i>11 dana tretmana toluenom / 11 days of toluene treatment</i>				
1	28	-	3	7,29
2	32	-	3	6,27
3	30	1	2	4,84
4	25	-	3	4,04
5	30	-	1	4,18
	Σ=145	Σ=1 0,69 %	Σ=12 **8,27 %	Σ=26,62 x̄ = *5,32

(**) p<0,01, (*) p<0,05 u odnosu na kontrolu / (**) p<0,01, (*) p<0,05 vs control

Kao što se uočava na tabeli 1 i grafikonu 1, tretman toluenom nije doveo do povećanja učestalosti pojavljivanja strukturnih promena hromozoma tipa gapa i prekida, već se nivo ovih promena, kod obe grupe tretiranih jedinki nalazi u oblasti njihovog spontanog dešavanja, čak je i niži od vrednosti kod kontrola (1,39%). Poznato je da je učestalost ovih promena u negativnim kontrolama, kod eksperimentalnih životinja, kao i u kulturama humanih limfocita, najčešće kreće od 1 do 2 posto, što ukazuju i naši raniji radovi [6, 7, 22, 8]. Lilp i saradnici [13] ukazuju da se vrednosti prekida i gapova povećavaju, do 2,8 posto, inbridingom i kod starih jedinki.

Premda nisu ustanovljene strukturne promene na hromozomima tretiranih pacova, nastalo je povećanje broja poliploidnih ćelija kod obe eksperimentalne grupe životinja. Naime, u kostnoj srži je ustanovljeno statistički značajno ($p < 0,05$ i $p < 0,01$) povišenje broja poliploidnih ćelija u odnosu na kontrolu (tabela 1 i grafikon 1). Vrednosti mitotskog indeksa (tabela 1 i grafikon 1) takođe su značajno povećane ($p < 0,05$) kod obe eksperimentalne grupe, u poređenju sa kontrolom.

Diskusija / Discussion

Genotoksični efekti toluena zavise od tipa eksperimentalnog modela, doze, načina davanja, dužine delovanja toluena, eventualnih primesa benzena i drugih genotoksičnih materija, kao i od specifičnosti i efikasnosti angažovanih sistema reparacije DNK i drugih zaštitnih mehanizama [2, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 25].

Naši rezultati, dobijeni na eksperimentalnom modelu pacova kojima je tokom 7 i 11 dana intraperitonealno aplikovana mala doza toluena, pokazuju da nema povećanja učestalosti povećanja strukturnih promena na hromozomima.

Istraživanja koja su sproveli Bogadi-Sare i sar. [4], na grupi profesionalno hronično izloženih obučarskih radnika, iako su pokazala statistički značajne razlike između izložene i kontrolne grupe, nisu jasno ukazala na genotoksična svojstva benzena i toluena. Na suprot tome, Hammer [9] je, primenom metode razmene sestrinskih hromatida – SCE-a, kod 42 štamparska radnika izložena dugotrajnom ambijentalnom zagađenju toluena, ustanovio tri puta veću učestalost SCE-a u grupi izloženih radnika u odnosu na kontrolnu grupu. Bogadi-Sare i sar. [4], ali takođe i Hammer [9] ističu da zbog genetičke individualne varijabilnosti, rezultate treba individualno posmatrati i oprezno tumačiti kada se razmatra genetički rizik od toluena. Kada je reč o podacima dobijenim na ljudima svakako treba da se ima u vidu uticaj pridruženih faktora, čije je genotoksično dejstvo dokazano kao što su: uticaj pušenja (nikotina i drugih sastojaka duvanskog dima), virusne infekcije, upotreba nekih lekova i hrane sa aditivima, kontakt sa pesticidima, kozmetičkim sredstvima itd. Naime, potvrđeno je da svi navedeni faktori mogu da uzrokuju povećanu učestalost hromozomskih aberacija [28]. S druge strane, u laboratorijskim uslovima, u kulturama humanih limfocita – *in vitro* [27], kao i na miševima – *in vivo*, [1], genotoksični efekti toluena nisu dokazani, sa čime su u skladu rezultati našeg eksperimenta.

Iako našim eksperimentom nisu utvrđeni učestali prekidi, kao jasan efekat genotoksičnosti, ustanovljeno povišenje mitotskog indeksa, tj. proliferativne aktivnosti, praćeno značajnim povećanjem broja poliploidnih ćelija, moglo bi da ukaže na potencijalno kancerogeno svojstvo testiranog agensa, što je svojstveno mnogim genotoksikantima već opisanim u literaturi [28]. Budući da eksperiment nije izveden *in vitro*, ne može sa sigurnošću da se tvrdi da je ustanovljeni efekat posledica mogućeg kancerogenog dejstva ispitivane supstance, već naj-

verovatnije predstavlja kompleksan odgovor organizma tretiranih pacova na aplikaciju toluena. Tako, opisani nalazi o povećanju mitotske aktivnosti i broja poliploidnih ćelija u saglasnosti su sa prethodno opisanim [5] povećanjem broja opredeljenih matičnih ćelija za granulo-monocitopoezu (CFU-GM), kao i povećanjem broja nezrelih ćelija prethodnica mijeloidne loze, koje je nastalo kao posledica sterilne zapaljenjske reakcije, a jasno upućuju na pojačanu aktivnost kostne srži.

Zaključak / Conclusion

Rezultati citogenetičke analize ukazuju da u uslovima postavljenog eksperimenta nisu nastale strukturne promene na hromozomima pacova tretiranih toluenom, odnosno ne javljaju se oštećenja na osnovu kojih bi moglo nedvosmisleno da se zaključi da je toluen iskazao genotoksična svojstva. Utvrđeno značajno povećanje mitotske aktivnosti i povećanje broja poliploidnih ćelija kostne srži tretiranih pacova ne može sa sigurnošću da se pripíše potencijalnom kancerogenom efektu, i najverovatnije je povezano sa ranije pokazanim povećanjem celularnosti kostne srži i povećanom proizvodnjom leukocita.

U zaključku može da se kaže da je u slučaju eksperimentalnog modela kratkotrajne intraperitonealne aplikacije toluena, kakva je korišćena u ovom radu, uočeno povećanje mitotske aktivnosti i poliploidije ne predstavlja gubitak kontrole, već je posledica još uvek kontrolisane reakcije nastale kao odbrambeni odgovor čitavog organizma na prisustvo toluena.

Literatura / References

1. Agency for Substance and Disease Registry U.S. Public Health Service: Toxicology and carcinogenesis studies of Toluene (CAS No. 108-88-3) in F344/N Rats and B6CBF₁ Mice (Inhalation Studies), 1990. - 2. Backes W. L., Sequeira D. J., Cawley G. F., Eyer C. S.: *Xenobiotica*, 23, 1353-1366, 1993. - 3. Benignus V. A., Barton C. N., Bittikofer J. A., Muller K. E.: *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, 61, 3, 326-334, 1981. - 4. Bogadi-Sare, A., Brumen, V., Turk, R., Karacić, V., Zavalic, M.: *Ind. Health.*, 35, 3, 367-373, 1997. - 5. Božić T., Stevanović J., Kovačević M., Jović S., Lukić S., Petakov M., Borozan S., Mijačević Z., Knežević M., Bulajić S.: *Acta Veterinaria*, 53, 201-210, 2003. - 6. Fišter Svetlana, Živković S., Soldatović B.: *Acta Veterinaria*, 36, 3-12, 1986. - 7. Fišter Svetlana, Soldatović B., Živković S.: *Acta Veterinaria*, 37, 41-46, 1987. - 8. Fišter Svetlana: Zbornik radova Drugog save- tovanja iz kliničke patologije i terapije životinja, Budva, 12.-16.06.2000, ss. 298-305, 2000. - 9. Hammer K. D.: *Mutat. Res.*, 26, 519, 1-2, 171-177, 2002. - 10. Hauffman L. J., Judy D. J., Frazer D., Shapiro R. E., Castranova V., Billie M., Dedhia H. V.: *Tox. Appl. Pharmacol.*, 145, 61-67, 1997. - 11. Hawrot P. S., Staples R. E.: *Teratd.* 19, 41A, 1979. - 12. Hsu T. C., Patton J. I.: *Comparative mammalian Cytogenetics*. Springer Verlag, Berlin, Heildeberg, New York, pp. 454-460, 1969. - 13. Lilp J. G., Korogodina Yu. V.: *Cytologia (USSR)* XXIII, No. 10, 1174-1179, 1981. - 14. Maki-Paakkanen J., Husgafvel-Pursiainen K., Kalliomaki P.L., Tuominen J., Sorsa M.: *J. Toxicol. Environ. Health*, 6, 775-781, 1980. - 15. Mattia C. J., Adams J. D., Bondy S. C.: *Bioch. Pharmacol.*, 46, 103-110, 1993a. - 16. Mattia C. J., Ali S. F., Bondy S. C.: *Mol. Chem. Neuropathol.*, 18, 313-328, 1993b. - 17. Milenković P, Ivanović Z., Lukić M. L.,

Kataranovski M., Lord B.I.: Cell Prolif., 26, 503-510, 1993. - 18. Myhre O., Fonnum F.: Biochem. Pharmacol., 62, 119-128, 2001. - 19. Paguotto L. D., Liberman L. M.: Am. Ind. Hyg. Assoc., 28, 129-134, 1967. - 20. Pelclova D., Cerna M., Pastorkova A., Vrbikova V., Prochazka B., Hurychova D., Dlaskova Z., Hornychova M.: Arch. Environ. Health., 55, 4, 268-273, 2000. - 21. Smith-Kielland A., Ripel A.: Arch. Toxicol., 67, 107-112, 1993. - 22. Soldatović B., Fišter Svetlana, Milčić D., Stanimirović Z.: Acta Veterinaria, 44, 345-350, 1994. - 23. Sugimoto K.: Act. Chim. Japan, 39, 18-30, 1973. - 24. Tahti H., Ruuska J., Vapaatalo H.: Acta Pharmacol. Toxicol. Suppl. 4, 41-78, 1977. - 25. Tamizhslevi R., Samikkannu T., Niranjali S.: Indian J. Exp. Biol., 33, 796-797, 1995. - 26. Von Oettingen W. F., Neal P. A., Donahue D.: U S Publ. Health Serv. Bull., 279 (a), 1-50, 1942. - 27. Zarani F., Papazafiri P., Kappas A.: Induction of micronuclei in human lymphocytes by organic solvents in vitro. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol., 18, 1, 21-28, 1999. - 28. Zimonjić D., Savković N., Anđelković M.: Genotoksični agensi. Naučna knjiga, Beograd, 1990.

ENGLISH

CYTOGENETIC ANALYSIS OF BONE MARROW CELLS OF RATS TREATED WITH TOLUENE

Svetlana Fišter, S. Jović, Jelka Stevanović, Milica Kovačević-Filipović

The paper presents the results of investigations of the effect of toluene on bone marrow cells of female Wistar rats treated intraperitoneally with toluene for 8 or 11 days, in doses of 0.602 µg/200 g body mass. Cytogenetic analyses were performed on the metaphase figure of chromosomes in order to determine the frequency of structural aberrations – breaks and gaps. The values of the mitotic index and number of poliploid cells were determined. No significant increase was determined in the frequency of breaks and gaps in chromosomes of treated animals in comparison with the controls, which means that, under the experimental conditions, toluene did not exhibit a definite genotoxic effect. However, it has been determined that there was a significant increase in the value of the mitotic index, as well as a significant increase in the number of poliploid cells in both groups of treated rats in comparison with controls.

Key words: Toluene, genotoxicity, chromosomal aberrations, breaks and gaps, poliploid cells

РУССКИЙ

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРЫС, ЛЕЧЕННЫХ ТОЛУЕНОМ

Светлана Фиштер, С. Йович, Елка Стеванович, Милица Ковачевич-Филипович

В этой работе вынесены результаты испытывания эффекта толуена на клетки костного мозга самок *Wistar* крыс, которым внутривентриально даван толуен в течение 8 и 11 дней, в дозе от 0.602 µг / 200 г массы тела. Цитогенетически анализированы метафазовые фигуры хромосом, чтобы утвердилась частота струк-

турных аберраций-разрывов и гапов. Утверждены стоимости митотического индекса и числа полиплоидных клеток. Не установлено значительное увеличение частоты разрывов и гапов на хромосомах, леченных единичных животных в отношении контролей, что значит, что в условиях этого эксперимента толуен не показал несомненный генотоксический эффект. Между тем, установлено значительное увеличение стоимости митотического индекса, словно и значительно увеличение числа полиплоидных клеток в обеих группах, леченных крыс в отношении контролей.

Ключевые слова: толуен, генотоксичность, хромосомные аберрации, разрывы и гапы, полиплоидные клетки