

Antonina Cebulska-Wasilewska^{1,2}

Agnieszka Panek¹

Zbigniew Żabiński³

Paulin Moszczyński³

WPŁYW PAR RTĘCI, PODCZAS NARAŻENIA ZAWODOWEGO NA LIMFOCYTY *IN VIVO*, NA ICH PODATNOŚĆ NA PROMIENIOWANIE UV-C LUB X ORAZ WYDAJNOŚĆ NAPRAWY *IN VITRO**

INFLUENCE OF MERCURY VAPORS ON LYMPHOCYTES *IN VIVO* AND ON THEIR SUSCEPTIBILITY TO UV-C AND X-RAYS, AND REPAIR EFFICIENCY *IN VITRO*

¹ Z Zakładu Biologii Radiacyjnej i Środowiskowej Instytutu Fizyki Jądrowej Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

² Z Katedry Epidemiologii i Medycyny Zapobiegawczej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

³ Z Międzynarodowego Instytutu Medycyny Uniwersalistycznej w Warszawie Oddział w Tarnowie

STRESZCZENIE

Wstęp. Celem prowadzonych prac było zbadanie jak zawodowa ekspozycja na pary rtęci może wpływać na molekularne i cytogenetyczne uszkodzenia obserwowane w limfocytach. W badaniach podjęto próbę sprawdzenia, czy może ona modyfikować indywidualną podatność komórkową na promieniowanie oraz wydajność naprawy uszkodzeń radiacyjnych. **Materiał i metody.** Uszkodzenia cytogenetyczne badano opierając się na analizie częstości wymian chromatyd siostrzanych, natomiast stopień uszkodzeń DNA mierzono stosując alkaliczną wersję elektroforezy pojedynczych komórek w żelu agarozowym (SCGE). W badaniach podatności komórek na działanie środowiskowych czynników, limfocyty ekspozowano na 6J/m² promieniowania UV-C lub 2Gy promieniowania rentgenowskiego. W celu sprawdzenia wpływu ekspozycji na pary rtęci na procesy naprawy DNA zarówno w komórkach w fazie G₀ jak i podziałowej, limfocyty po napromienieniu inkubowano przez 2 godziny w obecności lub bez fitohemaglutyniny (PHA), stymulatora podziałów komórkowych. **Wyniki i wnioski.** W badaniach nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami w większości parametrów określających stopień uszkodzeń DNA indukowanych *in vivo*. Częstość wymian chromatyd siostrzanych (SCE) oraz procent komórek ze znamiennej wyższą ilością wymian (HFC) były wyższe w grupie ekspozowanej, choć nieistotne statystycznie. Stopień uszkodzeń DNA oznaczony w ekspozowanych UV-C limfocytach poprzez pomiar długości i momentu komety oraz wydajność naprawy indukowanych uszkodzeń nie różniły się znacząco między grupą referencyjną a zawodowo ekspozowaną na pary rtęci. Nie zaobserwowano również różnicy w promieniowrażliwości komórek dawców z grupy ekspozowanej i kontrolnej. Znacząco wyższą ilość nienaprawionych uszkodzeń zmierzono w limfocytach po ekspozycji na promienie X i 2-godzinnej inkubacji, bez i w obecności PHA, pochodzących od dawców ekspozowanych. Statystyczne różnice były obserwowane dla wszystkich miar określających stopień uszkodzenia DNA (% DNA, długość i moment komety). W konsekwencji, w limfocytach dawców narażonych na działanie rtęci zaobserwowano statystycznie niższą wydajność naprawy uszkodzeń DNA, indukowanych przez promieniowanie jonizujące zarówno w limfocytach niestymulowanych jak i stymulowanych. Obniżenie wydajności naprawy jest powiązane z latami pracy w warunkach ekspozycji na pary rtęci. Analiza wpływu ekspozycji na pary rtęci w wydzielonych grupach dawców niepalących i palących również wykazała statystycznie niższą wydajność naprawy uszkodzeń DNA, indukowanych przez promieniowanie X w grupie ekspozowanej. Med. Pr., 2005;56(4):303–310

Słowa kluczowe: pary rtęci, uszkodzenia DNA, SCE

ABSTRACT

Background: The aim of the study was to compare the levels of DNA and cytogenetic damage in lymphocytes from donors occupationally exposed to mercury vapors and from matched controls as well as their cellular susceptibility to radiation and capabilities to repair DNA damage induced by UV-C or X-ray exposures *in vitro*. **Materials and Methods:** To estimate cytogenetic damage, the analysis of sister chromatid exchange frequency (SCE) was used, and to detect DNA damage the alkaline version of single cell gel electrophoresis (SCGE) was applied. To analyze cellular susceptibility, lymphocytes were exposed to 6 J/m² of UV-C or irradiated with 2 Gy of X-rays. After challenging exposures, cells were incubated for 2 h with or without the presence of cellular mitogen (phytohemagglutinin – PHA). **Results and Conclusions:** The study did not show statistically significant differences either between the groups, levels of DNA damage (measured as the percentage of cells with comets or comet tail moments), or sister chromatid exchanges. Neither were there significant differences in the levels of DNA damage (measured as tail moment and comet length) detected in UV-C exposed lymphocytes after 2 h incubation in the presence or in the absence of PHA stimulating cells and in the susceptibility to X-ray radiation of lymphocytes between the groups of non-exposed persons and those occupationally exposed to mercury vapors. In the group exposed to mercury vapors, however, statistically significantly higher levels of non-repaired DNA damage measured in X-ray irradiated lymphocytes after 2 h of incubation, with or without the presence of mitogen were observed compared to controls. Significant differences were observed in all types of DNA damage measures (comet tail length, % of DNA

* Praca wykonana częściowo w ramach grantów: EC ERBIC 15CT 960300 pt. „Pesticide effects on Humans” oraz BBN/CM-4100\315\2\ 2004 pt. „Badania nad zróżnicowaniem osób zdrowych i pacjentów chorych na raka w podatności na uszkodzenia i wydajności procesu naprawy”. Kierownik grantów: prof. dr hab. A. Cebulska-Wasilewska.

in the comet and comet tail moments). As a result, lymphocytes of donors exposed to mercury vapors showed a statistically lower repair efficiency of X-ray-induced DNA damage both in non-stimulated (70.0% for the exposed, 85.7% for the non-exposed) and stimulated (84.0% for the exposed and 90.4% for the non-exposed) lymphocytes. Cellular DNA repair efficiency decreased with increasing number of years of occupational exposure. Statistically significant DNA repair deficiency in the donors exposed to mercury vapors was also observed when the groups were stratified to smokers and non-smokers. *Med Pr* 2005;56(4):303–310

Key words: mercury vapors, DNA damage, sister chromatid exchange

Adres 3. autora: Kościuszki 68, 32-800 Brzesko, e-mail: szpital@spzoz-brzesko.pl

Nadesłano: 1.06.2005

Zatwierdzono: 30.06.2006

© 2005, Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra med. J. Nofera w Łodzi

WSTĘP

Związki rtęci od dawna uważane są za szczególnie niebezpieczne dla człowieka. Liczne badania potwierdzają, że niewielkie stężenia tego pierwiastka powodują poważne uszkodzenia układu nerwowego, odpornościowego, a także nerek oraz wątroby (1–3). Ponadto związki rtęci stanowią również poważne zagrożenie dla kobiet w ciąży, gdyż bez problemu przenikają barierę krew – łożysko i powodują uszkodzenia płodu (4).

Celem prowadzonych prac było zbadanie, jak zawodowa ekspozycja na pary rtęci może wpływać na molekularne i cytogenetyczne uszkodzenia obserwowane w limfocytach. W badaniach podjęto również próbę sprawdzenia czy może ona modyfikować indywidualną podatność komórkową na promieniowanie oraz wydajność naprawy uszkodzeń radiacyjnych, mając na uwadze fakt, że promieniowanie UV oraz X są w sposób nieunikniony obecne w środowisku człowieka.

MATERIAŁY I METODY

Materiał biologiczny

Do badań pobrano próbki krwi pochodzące od 25 mężczyzn, zawodowo narażonych na działanie par rtęci. Dawcy ci są pracownikami elektrolizernii w zakładzie produkcji chloru. Średnia wieku w tej grupie wynosiła 37,8 lat, a zakres długości ekspozycji na pary rtęci wahał się od 2 do 35 lat. Grupę kontrolną stanowiło 50 nieekspozowanych mężczyzn z średnią wieku 38,5 lat. W grupie zawodowo ekspozowanej było 36% osób palących, a w grupie referencyjnej 64%. W miejscu pracy osób zawodowo ekspozowanych na pary rtęci prowadzono pomiar stężenia rtęci w powietrzu na podstawie zebranych próbek z dwóch różnych miejsc (5). Maksimum dopuszczalnej koncentracji rtęci metalicznej w powietrzu wyniosło 0,025 mg/m³. W zakładach tych prowadzono okresowo pomiary stężenia rtęci we krwi i moczu narażonych pracowników przy zastosowaniu atomowego spektrometru absorpcyjnego.

Średnie stężenie rtęci w grupie narażonej na pary rtęci wyniosło w krwi 19,1 µg/l (4,7–29,6), a w moczu 108,7 µg/l (32,8–172,9). Czułość stosowanej metody wyniosła w moczu 10 µg/l, a we krwi 4 µg/l (5). W obu grupach badanych dla potrzeb niniejszej pracy zebrano wywiad dotyczący warunków pracy, stylu życia i nałogów oraz możliwego narażenia podnoszącego ryzyko genotoksyczne. Heparynizowaną krew od dawców z obu badanych grup przetransportowano do laboratorium Zakładu Biologii Radiacyjnej i Środowiskowej Instytutu Fizyki Jądrowej PAN, gdzie część próbek poddano procedurze badań cytogenetycznych. Z drugiej części próbek wyizolowano i zamrożono limfocyty zgodnie ze standardową procedurą (6–8).

Wymiany chromatyd siostrzanych (SCE)

Do oceny uszkodzeń cytogenetycznych indukowanych *in vivo* w limfocytach zastosowano metodę wymian chromatyd siostrzanych. Wszystkie odczynniki zostały użyte zgodnie ze standardową procedurą cytogenetyczną, opublikowaną we wcześniejszych pracach (8,9). Pobrane od każdego dawcy próbki krwi inkubowano w medium RPMI 1640 z dodatkiem 20% surowicy, czynnika stymulującego do podziałów (PHA), bromodeoksyurydyny (BrdU) i antybiotyków przez 72 h w 37°C. Dwie godziny przed zakończeniem hodowli kultur komórkowych dodano czynnik hamujący podziały, kolcemid (0,1 µl/ml). Utrwalanie i barwienie przeprowadzono według standardowej procedury (9). Częstość SCE była analizowana w 100 prawidłowych metafazach, w drugim podziale mitotycznym, zawierających, co najmniej 44 chromosomy. Częstość komórek ze znamienne wyższą częstością wymian (high frequency cells – HFC) oznaczono jako procent komórek z ilością wymian przekraczającą poziom wymian w 95% populacji w grupie referencyjnej. Indeks mitotyczny (MI) oznaczono według zależności podanej we wcześniejszych pracach (10):

$$MI = (M_1 + 2 \cdot M_2 + 3 \cdot M_3) / (M_1 + M_2 + M_3)$$

gdzie:

M_1, M_2, M_3 to liczba metafaz odpowiednio w pierwszej, drugiej i trzeciej mitozie.

Analiza uszkodzeń DNA metodą elektroforezy pojedynczych komórek w żelu agarozowym (SCGE)

Do badań zastosowano komórki dawców, przechowywane w temperaturze -80°C . Przed rozpoczęciem eksperymentu limfocyty rozmrożono (6,7), a następnie oceniono ich żywotność. Część komórek przeznaczono do analizy uszkodzeń powstałych *in vivo*, a resztę do napromieniania. W badaniach zastosowano dwa typy promieniowania, wywołujące różne uszkodzenia DNA. Limfocyty napromieniono dawką 6 J/m^2 UV-C (60 W lampa kwarcowa, $\lambda = 254 \text{ nm}$) lub dawką 2 Gy promieniowania X (aparatury rentgenowski, moc dawki $0,5 \text{ Gy/min}$). Po ekspozycji na promieniowanie X część limfocytów przeznaczono do analizy podatności oznaczając w nich stopień uszkodzeń DNA natychmiast po napromienieniu. Komórki, zarówno po ekspozycji na UV-C jak i X, inkubowano przez 2 godziny bez i w obecności mitogenu PHA, następnie analizowano stopień uszkodzeń DNA. Do analizy stopnia uszkodzenia DNA stosowano alkaliczną wersję elektroforezy DNA pojedynczych komórek na żelu agarozowym. Metoda ta pozwala na analizę ilościową uszkodzeń DNA, takich jak pęknięcia nici DNA, miejsca apurynowe i apirymidynowe ujawniające się w wysokim pH. Wszystkie odczynniki i etapy preparatyki żeli zostały przeprowadzone zgodnie ze standardową procedurą opublikowaną we wcześniejszych pracach (9–11). Preparaty zanurzono na godzinę w schłodzonym roztworze lizującym o $\text{pH} = 10$. Po jednej godzinie preparaty przeniesiono do schłodzonego buforu elektroforetycznego (1 mM EDTA, 300 mM NaOH) o $\text{pH} > 13$, gdzie przetrzymano je przez 20 min pozwalając na relaksację DNA. Elektroforezę prowadzono w 4°C przy 30 V, 300 mA, $0,5 \text{ V/cm}$, co spowodowało wędrowkę fragmentów oraz pętli DNA w polu elektroforezy. Preparaty neutralizowano 0,4 M buforem Tris o $\text{pH} 7,5$. Po neutralizacji preparaty wybarwiono bromkiem etydy (17 $\mu\text{l/ml}$). Wybarwione preparaty analizowano przy zastosowaniu epifluorescencyjnego mikroskopu połączony z kamerą CCD. W analizie uszkodzeń DNA jądrowego korzystano z programu do analizy obrazu Comet 3.0 (Kinetic Imaging). Do oceny stopnia uszkodzenia DNA wybrano z tego programu najczęściej stosowane następujące miary:

- tDNA – procent DNA poza głową komety,
- TL – długość komety (mierzona od krawędzi głowy komety),
- TM – moment komety (iloczyn procentowej zawartości DNA w komecie przez jej długość).

Analizę ilości uszkodzeń DNA przeprowadzono dokonując pomiaru 75 komórek z każdego preparatu (wykonując dwa preparaty dla każdego traktowania). Analizę statystyczną uzyskiwanych rezultatów prowadzono korzystając z testu t-Studenta oraz analizę wariancji ANOVA pochodzącą z programu SPSS.

WYNIKI

W celu zbadania ilości uszkodzeń powstałych *in vivo* analizowano stopień uszkodzenia DNA w rozmrożonych limfocytach oraz częstość wymian chromatyd siostrzanych (SCE) w metafazach drugiego podziału. Ponadto oznaczono częstość komórek z znamienne wyższą liczbą wymian (HFC) oraz indeks mitotyczny (MI). W tabeli 1 zaprezentowano ilość uszkodzeń molekularnych (wyrażoną za pomocą: tDNA, TM,

Tabela 1. Porównanie średnich wartości markerów uszkodzeń DNA (tDNA, TM, TL) i cytogenetycznych (SCE, HFC, MI) w komórkach dawców z grupy referencyjnej i zawodowo ekspozowanej na pary rtęci.

Table 1. Comparison of the mean values parameters of the DNA damage (tDNA, TM, TL) detected by single cell gel electrophoresis (SCGE) assay in defrosted lymphocytes and chromatid exchange frequency (SCE) measured in the metaphase of second mitosis obtained in controls and workers occupationally exposed to mercury vapors

Markery uszkodzeń DNA DNA damage parameters	Grupa referencyjna Control group	Grupa ekspozowana Exposed group	Poziom istotności Significant level
tDNA	4,9	4,7	>0,05
TM	0,7	0,7	>0,05
TL	12,2	9,8	<0,05
SCE	7,1	7,5	>0,05
%HFC	6,1	8,8	>0,05
MI	2,4	2,5	>0,05

- tDNA – procent DNA poza głową komety;
the percentage of DNA outside the comet head;
- TL – długość komety; TM – moment komety;
comet length; comet moment;
- SCE – częstość wymian chromatyd siostrzanych;
frequency of sister chromatid exchange;
- HFC – procent komórek z ilością wymian przekraczającą poziom wymian w 95% populacji w grupie referencyjnej;
the percentage of high frequency cells with the number of exchanges exceeding the level observed in 95% of the control population;
- MI – indeks mitotyczny.
mitotic index.

Tabela 2. Średnie wartości %DNA (tDNA) i długości komety (TL) zmierzone w limfocytach ludzi z grupy referencyjnej i eksponowanej. Limfocyty eksponowane na UV-C (dawka 6 J/m²) lub promienie X (dawka 2 Gy): bez inkubacji lub z inkubacją przez 2 h w 37°C bez i w obecności PHA

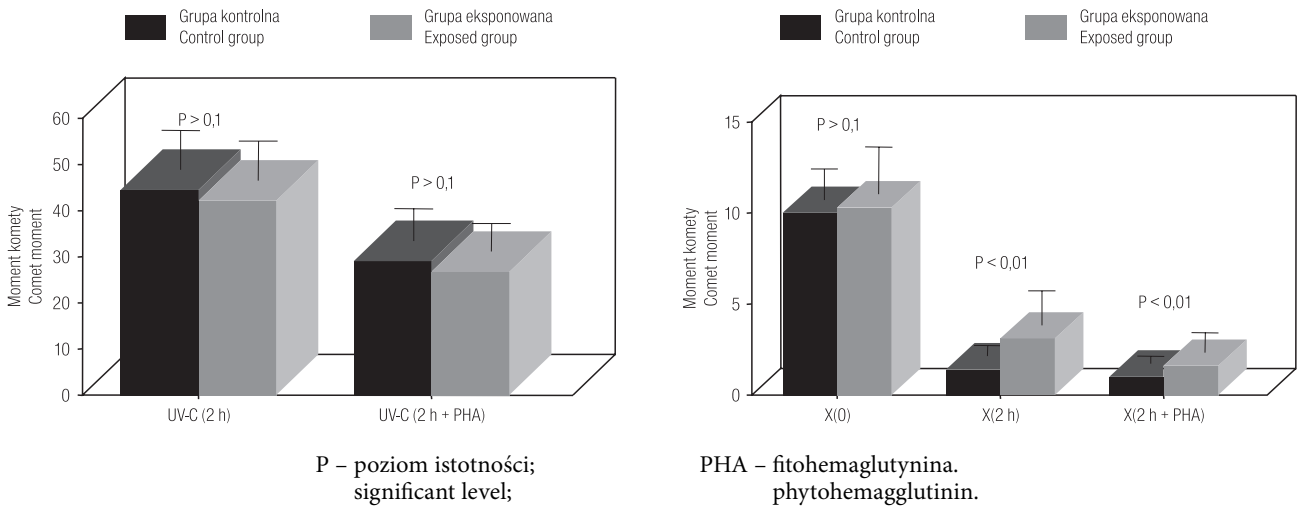
Table 2. The mean values of the percentage of DNA outside the comet head (tDNA) and tail length (TL), obtained in the exposed and control groups. Lymphocytes exposed to UV-C exposure (dose 6 J/m²) or X-ray-radiation (dose 2 Gy): without incubation and after 2 h incubation at 37°C in absence or presence of the mitogen (PHA)

Dawka Dose	Inkubacja Postexposure incubation	Mitogen Mitogen		Grupa referencyjna Control group	Grupa eksponowana Exposed group	Poziom istotności Significant level
UV-C (6 J/m ²)	2h	0	tDNA	55,9	48,7	<0,01
		PHA	tDNA	45,1	37,4	<0,01
		0	TL	76,4	75,4	>0,05
		PHA	TL	60,6	59,5	>0,05
X (2 Gy)	0	0	tDNA	18,5	17,2	>0,05
			TL	52,9	55,7	>0,05
	2h	0	tDNA	6,1	8,7	<0,01
		PHA	tDNA	5,6	6,6	>0,05
		0	TL	17,7	23,6	<0,01
		PHA	TL	13,9	17,7	<0,05

tDNA – procent DNA poza głową komety;
the percentage of DNA outside the comet head;

TL – długość komety;
comet length;

PHA – fitohemaglutynina.
phytohemagglutinin.



Ryc. 1. Porównanie średnich wartości moment komety (TM) zmierzonych w limfocytach po naświetleniu promieniami UV-C lub X pochodzących od dawców nieeksponowanych i zawodowo narażonych na działanie par rtęci.

Fig. 1. Comparison of mean values of tail moment parameter measured in lymphocytes after UV-C or X-rays treatment in referent and exposed groups.

TL) i cytogenetycznych (SCE, HFC, MI) w badanych grupach wraz z rezultatami analizy statystycznej między grupą referencyjną a eksponowaną. Generalnie, stwierdzono porównywalny stopień uszkodzeń DNA (z wyjątkiem TL) oraz indeksu mitotycznego komórek (MI) w badanych grupach. Pozostałe markery uszkodzeń cytogenetycznych (SCE, HFC) były w grupie eksponowanej na pary rtęci wyższe, choć nieistotne statystycznie.

Sprawdzono czy ekspozycja na pary rtęci może modyfikować ilość radiacyjnych uszkodzeń DNA w komórkach po ekspozycji na UV-C lub promieniowanie jonizujące w warunkach *in vitro*. W tabeli 2 przedsta-

wiono rezultaty analizy uszkodzeń DNA mierzonych w limfocytach po ekspozycji na promieniowanie UV-C (6 J/m²) oraz X (2 Gy) bez inkubacji oraz po dwugodzinnej inkubacji bez i w obecności mitogenu PHA wraz z rezultatami analizy statystycznej między badanymi grupami. Stopień uszkodzenia DNA wyrażono za pomocą średnich wartości tDNA i TL. Średnie wartości momentu komety (TM) mierzonego w tych badaniach są przedstawione na rycinie 1. W badaniach zaobserwowano brak istotnie statystycznych różnic między grupą referencyjną i eksponowaną w większości miar określających stopień uszkodzeń DNA w komórkach po napromienieniu UV-C oraz inkubacji naprawczej

bez i w obecności PHA. W grupie ekspozowanej, ilość uszkodzeń DNA bezpośrednio po ekspozycji na promienie X była nieznacznie wyższa, chociaż nieistotna statystycznie. W przypadku komórek traktowanych promieniami X, a następnie inkubowanych przez dwie godziny bez i w obecności mitogenu PHA stwierdzono statystycznie wyższy stopień nienaprawionego uszkodzenia DNA w grupie dawców ekspozowanych na pary rtęci w porównaniu do grupy referencyjnej.

Możliwy wpływ zawodowej ekspozycji dawców na pary rtęci na wydajność naprawy uszkodzeń DNA indukowanych przez promieniowanie UV-C w limfocytach oznaczono na podstawie parametru oszacowanego według wzoru:

$$ER_{UV-C} = [(TM_{UV-C(2h)} - TM_{UV-C(PHA)}) / TM_{UV-C(2h)}] \cdot 100$$

gdzie:

$TM_{UV-C(2h)}$ i $TM_{UV-C(PHA)}$ są wartościami momentu komety w limfocytach ekspozowanych na UV-C i inkubowanych przez 2 godziny bez i w obecności PHA.

Średnie wartości wydajności naprawy uszkodzeń DNA indukowanych przez UV-C oszacowanej według powyższego wzoru dla grupy referencyjnej i ekspozowanej przedstawiono w tabeli 3. Analiza otrzymanych

rezultatów wykazała podobny poziom tego parametru w badanych grupach.

W celu zbadania wpływu ekspozycji na pary rtęci na podatność komórkowego DNA na promieniowanie jonizujące oraz wydajność naprawy indukowanych uszkodzeń zastosowano parametry oszacowane według poniższych zależności:

- Podatność na promieniowanie X (S_x):

$$S_x = TM_{X(0)} - TM_0$$

- Wydajność procesów naprawy uszkodzeń DNA indukowanych przez promieniowanie X w niestymulowanych limfocytach (RE_x):

$$RE_x = TM_{X(0)} - TM_{X(2h)} / TM_{X(0)}$$

- Wydajność procesów naprawy uszkodzeń DNA indukowanych przez promieniowanie X w stymulowanych limfocytach (RE_{xs}):

$$RE_{xs} = TM_{X(0)} - TM_{X(PHA)} / TM_{X(0)}$$

gdzie:

TM_0 , $TM_{X(0)}$, $TM_{X(2h)}$, $TM_{X(PHA)}$ są wartościami momentu komety zmierzonymi w komórkach nietraktowanych, ekspozowanych na promieniowanie X bez inkubacji oraz po 2 godzinnej inkubacji bez i w obecności PHA.

Tabela 3. Bioindykatory radiowrażliwości komórek (S_x) i wydajności naprawy DNA (wydajność naprawy RE_x oraz RE_{UV}) oznaczone z odpowiedzi ich komórek na zastosowanie dawek wzbudzających UV-C lub promieniowania X dla limfocytów osób z grup nieekspozowanych i ekspozowanych przed i po stratyfikacji grup według nałogu palenia

Table 3. Indices radiosensitivity of cells (S_x) and DNA repair efficiency (repair efficiency: RE_x and RE_{UV}) evaluated from responses to UV-C or X-ray challenge of lymphocytes from workers and controls before and after stratification according to smoking

Grupa Group		RE_{UV}	S_x	RE_x %	RE_{xs} %
Cała Total	referencyjna Control group	33,9 ± 11,3	9,3 ± 1,8	85,7 ± 6,2	90,4 ± 3,9
	ekspozowana Exposed group	35,8 ± 9,6	9,5 ± 2,2	70,0 ± 15,9	84,0 ± 9,7
	P	>>0,05	>>0,05	0,000	0,001
Niepaląca Non smoking	referencyjna Control group	31,4 ± 13,8	9,5 ± 1,87	84,9 ± 6,7	92,6 ± 2,7
	ekspozowana Exposed group	37,4 ± 8,8	9,5 ± 2,6	70,4 ± 17,0	84,4 ± 10,3
	P	>>0,05	>>0,05	0,002	0,01
Paląca Smoking	referencyjna Control group	35,2 ± 9,9	9,2 ± 1,8	86,1 ± 6,0	89,2 ± 4,0
	ekspozowana Exposed group	33,4 ± 10,5	9,4 ± 1,7	69,5 ± 14,6	83,5 ± 8,9
	P	>>0,05	>>0,05	0,000	0,01

RE_{UV} – wydajność naprawy uszkodzeń DNA indukowanych przez UV;
DNA repair efficiency induced by UV;

P – poziom istotności;
significant level;

RE_x – wydajność naprawy w komórkach bez stymulacji;
DNA repair efficiency in non-stimulated of cells;

RE_{xs} – wydajność naprawy w stymulowanych limfocytach (bioindykatory szacowane na bazie momentu komety).
DNA repair efficiency in stimulated lymphocytes (bioindicators estimated on the basis of comet moments).

S_x – podatność na promieniowanie X;
radiosensitivity of cells;

Wartości średnie podatności komórkowego DNA na promieniowanie oraz wydajności naprawy powstałych uszkodzeń oszacowane dla komórek niestymulowanych i stymulowanych, a także rezultaty analizy statystycznej między badanymi grupami przedstawiono również w tabeli 3. Porównanie podatności komórek na promieniowanie X wykazało podobny poziom tego parametru w grupie referencyjnej i eksponowanej. Natomiast analiza wydajności procesów naprawy wykazała statystycznie znaczące obniżenie wydajności naprawy uszkodzeń DNA u osób eksponowanych na pary rtęci. Znamienne niższa wydajność komórkowej naprawy DNA spowodowana ekspozycją na pary rtęci jest stwierdzona zarówno w komórkach w fazie G_0 jak i w komórkach dzielących się. Jak wynika z rezultatów przedstawionych w tabeli 3, obniżenie wydajności naprawy spowodowane ekspozycją jest obserwowane także w podgrupach dawców palących papierosy, jak również niepalących.

W badaniach zatem sprawdzono zależność pomiędzy podatnością na promieniowanie oraz wydajnością naprawy indukowanych uszkodzeń a latami pracy w warunkach ekspozycji na pary rtęci. W tym celu dawców podzielono na trzy kategorie w zależności od stażu pracy. Średnie wartości podatności oraz efek-

tywności naprawy oszacowane dla poszczególnych klas wydzielonych na podstawie lat pracy przedstawiono w tabeli 4. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotnie statystycznie skorelowane obniżenie wydajności naprawy uszkodzeń DNA zarówno z ekspozycją na pary rtęci ($r^2 = -0,547$, $p < 0,000$) jak i wydłużającym się okresem pracy w ekspozycji ($r^2 = -0,532$, $p < 0,000$).

OMÓWIENIE I WYNIKI

Dzięki badaniom prowadzonym od początku lat osiemdziesiątych (12–14) stwierdzono, że związki rtęci mają efekt cytotoksyczny i mutageny. Cytotoksyczny efekt tych związków w głównej mierze opiera się na zdolności rtęci do obniżania poziomu zredukowanego glutationu (15), generowania wolnych rodników (5) oraz peroksydacji lipidów (16). Równie liczne badania donoszą o wywoływaniu przez związki rtęci zaburzeń aktywności ważnych enzymów komórkowych, takich jak reduktaza glutationu czy dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) (17). Dane literaturowe sugerują również powstanie w wyniku działania rtęci uszkodzeń cyto-genetycznych, takich jak zaburzenia ilości chromosomów (18), wzrost częstości aberracji chromosomowych (19,20) oraz mikrojąder (21).

Celem badań było sprawdzenie wpływu zawodowej ekspozycji na pary rtęci na poziom uszkodzeń molekularnych i cytogenetycznych w limfocytach osób eksponowanych oraz ich komórkową podatność na czynniki genotoksyczne i wydajność naprawy uszkodzeń DNA. Analiza statystyczna, przeprowadzona za pomocą testu t-Studenta, nie wykazała statystycznie istotnych różnic między grupami referencyjną i eksponowaną w ilości uszkodzeń DNA powstałych *in vivo*, oszacowanych za pomocą średnich wartości procentu DNA i momentu komety, mierzonych w rozmrożonych limfocytach. W grupie eksponowanej na rtęć poziom wymian chromatyd siostrzanych (SCE) oraz częstość komórek ze znamienne wyższą liczbą wymian (HFC) były wyższe, ale nieistotne statystycznie (tab. 1). W badanych grupach zaobserwowano również porównywalny indeks mitotyczny (MI). Rezultaty te są zgodne z danymi prezentowanymi przez Popescu i wsp. (22), którzy w badaniach ludzi zawodowo eksponowanych na związki rtęci obserwowali brak znaczącej różnicy w częstości SCE przy statystycznie istotnym wzroście aberracji chromosomowych. Natomiast badania *in vitro* przeprowadzone przez Wulf i wsp. (23) wykazały linową korelację między stężeniem Hg we krwi a SCE,

Tabela 4. Bioindykatory radiowrażliwości komórek (S_x) i wydajności naprawy DNA (RE_x , RE_{XS} i RE_{UV}) oznaczone dla limfocytów osób nieeksponowanych i eksponowanych po podziale grupy na kategorie związane z latami pracy w warunkach ekspozycji na pary rtęci

Table 4. Indices of radiosensitivity of cells (S_x) and DNA repair efficiency (RE_x , RE_{XS} and RE_{UV}) evaluated for lymphocytes from workers and controls from its response UV-C or X-ray challenge after stratification of the whole group to various categories of (working years) exposure duration

Lata pracy Years of employment	RE_{UV}	S_x	RE_x %	RE_{XS} %
0	33,9 ± 11,3	9,30	85,7 ± 6,2	90,4 ± 4,9
1–10	33,9 ± 8,6	9,55	76,2 ± 4,9	88,1 ± 9,7
11–20	36,5 ± 13,5	9,58	58,9 ± 21,2	77,7 ± 10,1
21–35	39,2 ± 7,9	9,75	67,1 ± 9,7	81,49 ± 6,8
Poziom istotności Significant level	>>0,05	>>0,05	<0,000	<0,000

RE_{UV} – wydajność naprawy uszkodzeń DNA indukowanych przez UV;
DNA repair efficiency induced by UV;

S_x – podatność na promieniowanie X;
radiosensitivity of cells;

RE_x – wydajność naprawy w komórkach bez stymulacji;
DNA repair efficiency in non-stimulated of cells;

RE_{XS} – wydajność naprawy w stymulowanych limfocytach
(bioindykatory szacowane na bazie momentu komety).
DNA repair efficiency in stimulated lymphocytes
(bioindicators estimated on the basis of comet moments).

jednak zmierzony zakres stężeń Hg we krwi był wyższy niż w naszej grupie i wahał się w przedziale od 23,15 do 65,41 $\mu\text{l/l}$ krwi. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że metody SCE i SCGE zastosowane do analizy genotoksyczności *in vivo* przy niskiej ekspozycji są prawdopodobnie mało wrażliwym narzędziem lub pary rtęci nie powodują bezpośrednio uszkodzeń wykrywanych przez powyższe metody.

W celu sprawdzenia wpływu ekspozycji na pary rtęci na wydajność naprawy w badaniach zastosowano dwa typy promieniowania (UV-C i X), wywołujące różne rodzaje uszkodzeń DNA. Analiza statystyczna przeprowadzona dla limfocytów eksponowanych na UV-C nie wykazała istotnych statystycznie różnic między badanymi grupami w większości parametrów (poza tDNA) określających stopień indukowanych uszkodzeń DNA (tab. 2, ryc. 1) oraz wydajność ich naprawy (tab. 3). Zatem rezultaty nasze sugerują, że zawodowa ekspozycja na pary rtęci nie ma modyfikującego wpływu na podatność komórkowego DNA na UV-C ani na wydajność naprawy uszkodzeń DNA, wywołanych przez to promieniowanie. Wyniki te są zgodne z danymi literaturowymi otrzymanymi przez Christie i wsp. (24), którzy wykazali, że w komórkach jajnika chomika chińskiego związki rtęci w nietoksycznych stężeniach nie wpływają na system naprawy uszkodzeń wywołanych przez UV-C.

W celu sprawdzenia wrażliwości komórek osób eksponowanych na pary rtęci na środowiskowy czynnik genotoksyczny, promieniowanie jonizujące, zbadano stopień uszkodzeń bezpośrednio po napromienieniu. Analiza statystyczna przeprowadzona dla limfocytów wykazała porównywalny poziom mierzonych uszkodzeń DNA we wszystkich parametrach w obu badanych grupach (tab. 2, 3, ryc. 1). Porównanie między badanymi grupami poziomu uszkodzeń DNA w komórkach inkubowanych przez 2 godziny po ekspozycji na promienie X wykazało istotne statystycznie różnice we wszystkich mierzonych parametrach (tDNA $p < 0,01$, TM $p < 0,01$, TL $p < 0,01$) (tab. 2, ryc. 1). Podobny efekt ekspozycji na pary rtęci zaobserwowano w komórkach inkubowanych w obecności PHA, w których stwierdzono znacząco wyższy stopień uszkodzeń DNA w grupie eksponowanej, zarówno dla momentu komety ($p < 0,01$) jak i długości komety ($p < 0,05$) (tab. 2). Analiza wydajności naprawy uszkodzeń DNA wywołanych przez promieniowanie X wykazała statystycznie istotne ($p < 0,01$) obniżenie jej w grupie eksponowanej na pary rtęci zarówno w komórkach stymulowanych jak i niestymulowanych w porównaniu do gru-

py kontrolnej. W grupie eksponowanej, 60% dawców w grupie niestymulowanych limfocytów i 52% osób w grupie komórek stymulowanych miało niższą wydajność procesu naprawy uszkodzeń indukowanych przez promieniowanie jonizujące niż 95% populacji w grupie referencyjnej. Dodatkowo w naszych badaniach przeprowadzono analizę wpływu par rtęci na badane parametry w grupach dawców niepalących i palących. Analiza otrzymanych rezultatów potwierdziła prawidłowość występującą w całej grupie, wykazując wyraźne zaburzenia procesów naprawy u osób eksponowanych zarówno niepalących ($RE_x p < 0,002$, $RE_{XS} p < 0,01$) jak i palących ($RE_x p < 0,000$, $RE_{XS} p < 0,01$). Rezultaty te są zgodne z danymi z publikacji Cantoni i wsp. (25), którzy wykazali, że związki rtęci powodują hamowanie procesów naprawy pojedynczych pęknięć nici DNA, indukowanych przez promieniowanie rentgenowskie i mogą wpływać na homeostazę DNA przez inhibicję procesów naprawy DNA.

Obserwowane w naszych badaniach zaburzenia w naprawie uszkodzeń DNA wydają się tym bardziej istotne, że przeprowadzona przez nas próba powiązania ekspozycji na pary rtęci z naprawą uszkodzeń DNA wykazała statystycznie istotny spadek wydajności naprawy wraz z wydzielonymi kategoriami na podstawie stażu pracy w warunkach ekspozycji (tab. 4).

Rezultaty naszych badań sugerują negatywny wpływ rtęci na naprawę uszkodzeń DNA. Wydaje się, że w grupie badanej mechanizm działania rtęci jest powiązany z blokowaniem enzymów naprawiających uszkodzenia DNA oraz związanych z tym procesem białek, posiadających tzw. palce cynkowe (14). Motyw ten jest strukturą zawierającą cynk w kompleksie z 4 cysteinami bogatymi w grupy tiolowe (-SH), do których jony rtęci mają wysokie powinowactwo (26,27). Rezultaty naszych badań sugerują także, że wpływ par rtęci na naprawę uszkodzeń DNA w dużej mierze zależy od włączanego systemu naprawy.

W przypadku naszych badań nie jest wiadomo, czy w obserwowanym procesie nastąpiła prawidłowa naprawa uszkodzeń. Dlatego też osiągnięte rezultaty nie pozwalają na oszacowanie prawdopodobieństwa wystąpienia raka, co najwyżej mogą sugerować podwyższone ryzyko.

Podsumowując, nasze badania wykazały zaburzenia naprawy DNA u osób eksponowanych na pary rtęci oraz wzrost końcowego uszkodzenia DNA, obecnego w komórkach. Spadek wydajności naprawy DNA może sugerować wzrost narażenia zdrowia ludzi związany z możliwym wzrostem ryzyka uszkodzenia ważnego genu.

Podziękowania

Serdeczne podziękowania *E. Kasper*, *W. Niedźwiedź*, *A. Wierzewskiej* oraz *J. Wiltowskiej* za pomoc w pracach eksperymentalnych.

PIŚMIENICTWO

1. Moszczyński P., Rutowski J., Słowiński S., Bem S.: Immunological effects of occupational exposure to metallic mercury in the population of T-cells and NK-cells. *Analyst*, 1998;123:99–103
2. Peraza M.A., Ayala-Fierro F., Barber D.S., Casarez E., Rael L.T.: Effects of micronutrients on metal toxicity. *Env. Health Persp.*, 1998;106:203–216
3. Rutowski J., Moszczyński P., Bem S., Szewczyk A.: Efficacy of urine determination of early renal damage markers for nephrotoxicity monitoring during occupational exposure to mercury vapours. *Med. Pr.*, 1998;49(2):129–135
4. Seńczuk W.: Toksykologia. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1990
5. Zalups R.K.: Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol. Rev.*, 2000;52(1):113–144
6. Anderson D., Yu T.W., Philips B.J., Schmezer P.: The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. *Mutat. Res.*, 1994;307:261–271
7. Cebulska-Wasilewska A., Nowak D., Niedźwiedź W., Anderson D.: Correlation between DNA damage and chromosomal damage induced by chemical and radiation. *Mutat. Res.*, 1998;421:83–91
8. Anderson D., Hughes J.A., Cebulska-Wasilewska A., Wierzewska A., Kasper E.: Biological Monitoring of Workers Exposed to Emissions from Petroleum Plants. *Env. Health Persp.*, 1996;104:609–613
9. Cebulska-Wasilewska A., Wierzewska A., Dyga W., Drag Z., Siffel C., Horvath M. i wsp.: Induction of DNA and cytogenic damage in lymphocytes of Polish workers exposed to pesticides. *Cent. Eur. J. Occup. Med.*, 2000;6(4):272–287
10. Cebulska-Wasilewska A., Dyga W., Krasnowolski S., Wierzewska A., Budzanowska E.: Monitoring of DNA and cytogenetic damage in lymphocytes in patients with skin cancer disease. *Pol. J. Med. Phys. Eng.*, 1999;4:187–199
11. Dyga W., Niedźwiedź W., Cebulska-Wasilewska A.: Repair of the DNA damage induced in UV-C-irradiated human lymphocytes. *Pol. J. Med. Phys.*, 1999;5:117–127
12. Hamilton-Koch W., Snyder R.D., Lavelle J.M.: Metal-induced DNA damage and repair in human diploid fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Chem. Biol. Interact.*, 1986;59:17–28
13. Robison S., Cantoni O., Costa M.: Analysis of metal-induced DNA lesions and DNA-repair replication in mammalian cells. *Mutat. Res.*, 1984;131:173–181
14. Williams M.V., Winters T., Waddell K.S.: *In vivo* effects of mercury (II) on deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase, DNA polymerase (α , β), and uracil-DNA glycosylase activities in cultured human cells: relationship to DNA damage, DNA repair, cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.*, 1986;31:200–207
15. Zalups R.K., Lash L.H.: Depletion of glutathione in the kidney and the renal disposition of administered inorganic mercury. *Drug Metabol. Dispos.*, 1997; 4:25–
16. Tanaka-Kagawa T., Suzuki M., Yamanaka N., Imura N.: Strain difference in sensitivity of mice to renal toxicity of inorganic mercury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1998;285(1):335–341
17. Żabiński Z., Dąbrowski Z., Moszczyński P., Rutowski J.: The activity of erythrocyte enzymes and basic indices of peripheral blood erythrocytes from workers chronically exposed to mercury vapours. *Toxicol. Ind. Health*, 2000;16:58–64
18. Verschaeve L., Kirsch-Volders M., Hens L., Susanne C.: Comparative *in vitro* cytogenetic studies in mercury-exposed human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 1985;157:221–226
19. Franchi E., LoMieno G., Ballardini M., Petrozzi L., Migliore L.: Cytogenetic monitoring of fishermen with environmental mercury exposure. *Mutat. Res.*, 1994;320:23–29
20. Rapp A., Bock C., Dittmar H., Greulich O.: UV-A breakage sensitivity of human chromosomes as measured by COMET-FISH depends on gene density and not on the chromosome size. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2000;56:109–117
21. Sekowski J.W., Malkas L.H., Wei Y., Hickey R.J.: Toxicology and Mercuric Ion Inhibits the Activity and Fidelity of the Human Cell DNA Synthesome. *Appl. Pharmacol.*, 1997;145:268–276
22. Popescu H. I., Negru L., Lancranjan I.: Chromosome aberrations induced by occupational exposure to mercury. *Env. Health*, 1979;346:461–469
23. Wulf H.C., Kromann N., Kousgaard N., Hansen J.C., Niebuhr E., Albqge K.: Sisters chromatid exchange (SCE) in Greenlandic Eskimos. Dose-response relationship between SCE and seal diet, smoking, and blood cadmium and mercury concentrations. *Sci. Tot. Env.*, 1986;48:81–94
24. Christie N., Cantoni O., Sugiyama M., Cattabeni F., Costa M.: Differences in the effects of HG (II) on DNA repair induced in Chinese Hamster ovary by ultraviolet or X-rays. *Mol. Pharmacol.*, 1985;24:173–178
25. Cantoni O., Costa M.: Correlation of DNA strand breaks and their repair with cell survival following acute exposure to mercury (II) and X-rays. *Mol. Pharmacol.*, 1983;24:84–92
26. Hartwig A., Asmuss M., Blessing H., Hofmann S., Jahnke G., Khandelwal S. i wsp.: Interference by toxic metal ions with zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability. *Food Chem. Toxicol.*, 2002;40:1179–1184
27. Asmuß M., Mullenders L.H.F., Hartwig A.: Interference by toxic metal compounds with isolated zinc finger DNA repair proteins. *Toxicol. Lett.* 2000;112–113:227–231