

Aleksandra Steinmetz-Beck
Ewa Szahidewicz-Krupska
Bogusław Beck
Rafał Poręba
Ryszard Andrzejak

GENOTOKSYCZNY EFEKT PRZEWLEKŁEJ EKSPOZYCJI NA OŁÓW W TEŚCIE KOMETKOWYM

GENOTOXICITY EFFECT OF CHRONIC LEAD EXPOSURE ASSESSED USING THE COMET ASSAY

Z Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego
Akademii Medycznej we Wrocławiu

STRESZCZENIE

Wstęp. Ołów jest powszechnie obecny w środowisku i został uznany za czynnik prawdopodobnie rakotwórczy dla człowieka. Celem pracy było stwierdzenie, czy u osób wieloletnio, zawodowo narażonych na ołów występują genotoksyczne efekty ekspozycji. **Materiał i metody.** Występowanie uszkodzeń DNA oceniano w teście kometkowym (Single Cell Gel Electrophoresis). Grupę badaną stanowiło 62 mężczyzn – zatrudnionych w Hucie Miedzi, zawodowo narażonych na działanie ołowiu oraz 22 pracowników bez zawodowej ekspozycji na ołów. **Wyniki.** Średnie stężenie ołowiu we krwi (PbB) było znacznie wyższe u osób ekspozowanych na ołów w porównaniu do grupy kontrolnej. W badanej grupie wykazano istotnie statystycznie większą częstość komórek kometkowych oraz większą częstość komórek o wyższym stopniu uszkodzenia, tj. typu 3 i 4 (w przyjętej pięciostopniowej skali: typ 0 – komórki bez uszkodzenia, typ 5 – komórki całkowicie uszkodzone). Średnia liczba kometek jak i stopień uszkodzenia DNA (typy 1, 2, 3, 4) u pracowników ekspozowanych na Pb były znacznie większe w porównaniu do grupy kontrolnej (całkowita liczba kometek – $12,55 \pm 7,93\%$; 1 typ – $9,05 \pm 5,78\%$; 2 typ – $1,98 \pm 1,78\%$; 3 typ – $1,05 \pm 1,28\%$; typ 4 – $0,46 \pm 0,70\%$; $p < 0,05$ vs. całkowita liczba kometek – $6,63 \pm 3,05\%$; 1 typ – $5,68 \pm 2,32\%$; 2 typ – $0,55 \pm 0,87\%$; 3 typ – $0,35 \pm 1,04\%$; typ 4 – $0,04 \pm 0,19\%$; $p < 0,05$). Porównanie grupy osób przewlekle ekspozowanych na Pb ze stężeniem PbB w przedziale: powyżej 500 $\mu\text{g/l}$, 201–500 $\mu\text{g/l}$ oraz poniżej 200 $\mu\text{g/l}$, pozwoliło wykazać, że liczba kometek jak i stopień uszkodzenia DNA są największe w grupie osób ze stężeniem PbB powyżej 500 $\mu\text{g/l}$, a najniższe u osób ze stężeniem PbB poniżej 200 $\mu\text{g/l}$. **Wnioski.** Przedstawiona zależność może sugerować, że uszkodzenia DNA są następstwem toksycznych własności ołowiu. Test kometkowy może być przydatny w monitorowaniu toksycznych następstw ekspozycji na ołów, a stężenie ołowiu we krwi miarą wewnętrznej ekspozycji. Med. Pr., 2005;56(4):295–302

Słowa kluczowe: test kometkowy, uszkodzenie DNA, ołów, narażenie zawodowe

ABSTRACT

Background: Lead, an important xenobiotic, is globally well distributed. The IARC has classified inorganic lead compounds as possibly carcinogenic to humans. The study was designed to assess genotoxic effects in workers occupationally exposed to Pb. **Materials and Methods:** The study comprised 62 male workers with chronic exposure to lead and 22 matched non-exposed men. DNA damage was assessed by single cell gel electrophoresis (known as comet assay) using peripheral blood lymphocytes. The level of DNA damage was determined as the percentage of cells with comets. **Results:** Mean blood Pb (PbB) concentrations in workers exposed to lead were significantly higher than in controls ($422.6 \pm 181.2 \mu\text{g/l}$ vs. $81.0 \pm 37.84 \mu\text{g/l}$; $p < 0.01$). The level and the grade of DNA damage were significantly higher in workers exposed to lead (total – $12.55 \pm 7.93\%$; grade 1 – $9.05 \pm 5.78\%$; grade 3 – $1.05 \pm 1.28\%$; $p < 0.05$) than in controls (total – $6.63 \pm 3.05\%$; grade 1 – $5.68 \pm 2.32\%$; grade 3 – $0.35 \pm 1.04\%$; $p < 0.05$). The highest level and the degree of DNA damage were observed in workers with PbB over 500 $\mu\text{g/l}$ and the lowest in workers with PbB lower than 200 $\mu\text{g/l}$. **Conclusions:** Our results suggest that lead, particularly in people with chronic occupational Pb exposure and high PbB may induce DNA damage in peripheral lymphocytes detected by the comet assay, and thus should be regarded as a potential agent harmful to the human chromosome. The comet assay can be used to monitor and evaluate biological toxic effects in humans occupationally exposed to lead. Med Pr 2005;56(4):295–302

Key words: comet assay, DNA damage, lead, occupational exposure

Adres autorów: Pasteura 4, 50-367 Wrocław, e-mail: boguslawbeck@wp.pl

Nadesłano: 15.06.2005

Zatwierdzono: 11.07.2005

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

WSTĘP

Czynniki znajdujące się w środowisku życia w istotny sposób wpływają na integralność materiału genetycznego, w tym także człowieka. Wiele z nich wykazuje działanie mutagenne, a nawet rakotwórcze.

Istotną liczebnie grupę karcinogenów, występujących zarówno w środowisku jak i na stanowisku pracy, stanowią metale. Uznawanymi karcinogenami dla człowieka (grupa 1 wg IARC) są m.in.: arsen, kadm, sze-

ściowartościowy chrom oraz ich związki (1,2). Ołów i jego związki nieorganiczne zakwalifikowane zostały jako czynniki prawdopodobnie (grupa 2A wg IARC) rakotwórcze dla człowieka (2–4).

Wyniki badań doświadczalnych ostatnich lat potwierdzają własności rakotwórcze nieorganicznych związków ołowiu, natomiast wyniki badań epidemiologicznych są kontrowersyjne (5–7). Niektórzy autorzy wskazują, że istnieją dane epidemiologiczne, sugerujące związek między wzrostem ryzyka rozwoju raka a narażeniem środowiskowym lub zawodowym na ołów (6,7). Badania doświadczalne natomiast sugerują rakotwórcze działanie ołowiu w stężeniach niższych od stężeń uznanych za toksyczne (6).

Przeważa pogląd o promocyjnych własnościach ołowiu w rakogenezie, co jest zgodne z aktualnym stanowiskiem IARC, dotyczącym nieorganicznych związków ołowiu jako substancji rakotwórczych (4,7).

Genotoksyczne własności ołowiu są dobrze udokumentowane w wielu badaniach doświadczalnych. Obserwacje dokonane u ludzi na podstawie wyników różnych testów cytogenetycznych są mniej liczne, a ich wyniki niejednoznaczne.

Celem pracy było stwierdzenie, czy u osób przez wiele lat zawodowo narażonych na ołów występują uszkodzenia DNA.

MATERIAŁ I METODY

Przebadano 62 mężczyzn zawodowo ekspozowanych na ołów, ponadto na niektórych stanowiskach pracy także na kadm i miedź. Grupę kontrolną zestawiono z 22 osób bez zawodowej ekspozycji na metale.

Średni wiek w grupie osób narażonych wynosił 46,68 lat \pm 8,68 (od 22 do 65 lat). Średni wiek w grupie kontrolnej wynosił 49,95 lat \pm 8,44 (od 33 do 65 lat). Średni staż pracy przedstawiał się następująco: w grupie osób ekspozowanych na ołów 19,00 lat \pm 7,07 (od 6 do 40 lat), a w grupie kontrolnej 23,42 lat \pm 9,87 (od 7 do 40 lat).

Palenie tytoniu charakteryzował wskaźnik papierosolat, który wynosił średnio w grupie badanej 258,46 \pm 212,15 oraz 236,11 \pm 300,72 w grupie kontrolnej.

Najwyższe dopuszczalne stężenie (NDS) dla związków nieorganicznych ołowiu w Polsce wynosi 0,05 mg/m³ (8). Pomiar na stanowiskach pracy wykazały w niektórych przypadkach maksymalnie 2-krotne przekroczenia dla pyłów ołowiu. Charakterystykę grupy badanej oraz kontrolnej zawarto w tabeli 1.

Uszkodzenie jądrowego DNA oceniano za pomocą testu kometkowego (Single Cell Gel Electrophoresis)

Tabela 1. Charakterystyka grupy osób narażonych zawodowo na Pb (grupa badana) oraz u osób nienarażonych (grupa kontrolna)
Table 1. Characteristics of the study and control groups

Grupa Group	Wiek Age	Staż pracy Duration of exposure	Współczynnik palenia tytoniu Smoking habits	Stężenie PbB PbB level
Grupa badana Study group n = 62 $\bar{x} \pm SD$	46,68 \pm 8,63	19,00 \pm 7,07	258,46 \pm 212,15	422,65 \pm 181,24
Grupa kontrolna Control group n = 22 $\bar{x} \pm SD$	49,95 \pm 8,44	23,42 \pm 9,87	236,11 \pm 300,72	81,01 \pm 37,84
p				<0,001

PbB – stężenie ołowiu w krwi pełnej; \bar{x} – wartość średnia.
blood lead level; mean value.

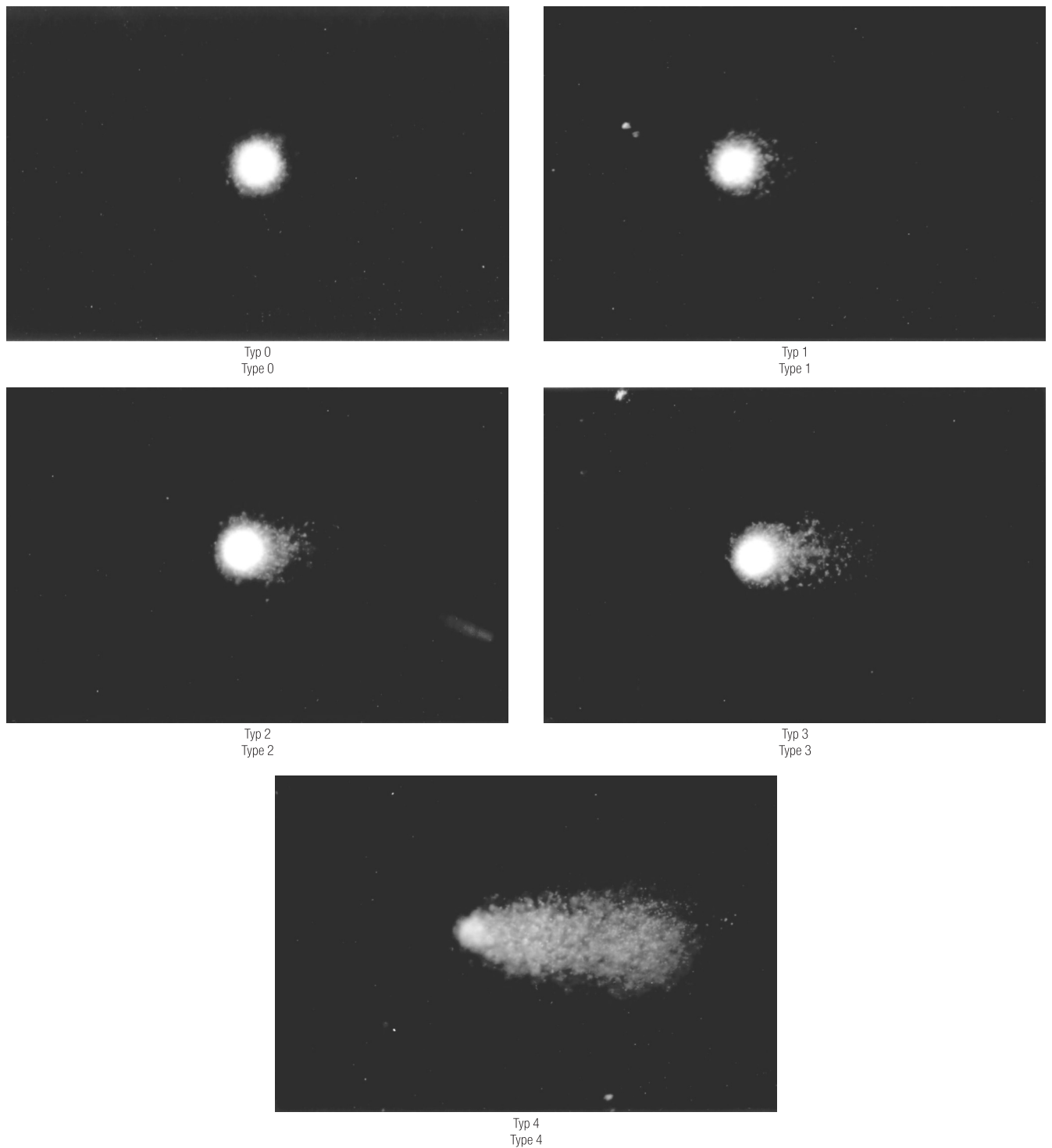
SD – odchylenie standardowe; p – poziom istotności.
standard deviation; statistical significance.

alkalicznej elektroforezy pojedynczej komórki w żelu (9,10). W teście wykorzystuje się różnice w prędkości migracji w polu elektrycznym na podłożu żelowym DNA oraz struktur uszkodzonego DNA. Nieszkodzony DNA pozostaje w jądrze komórkowym tworząc „głowę”, a uszkodzone nici wędrują w kierunku anody, dając obraz „ogona” komety. Ocena wizualna testu kometkowego polega na liczeniu komórek i zakwalifikowaniu ich do jednej z 5 kategorii od 0 do 4 w zależności od stopnia uszkodzenia materiału genetycznego. Typ 0 odpowiada komórce bez widocznego ogona, co oznacza brak uszkodzenia DNA, typ 1 – mały stopień uszkodzenia, typ 2 – średni stopień uszkodzenia. Typ 3 – duży stopień uszkodzenia. Typ 4 – to całkowita degradacja DNA, widoczny jest długi, rozproszony ogon (ryc. 1).

Oceniano 120 komórek i obliczano liczbę komórek tworzących kometki, ponadto oceniano stopień uszkodzenia DNA licząc kometki typu 1–4. Wyniki podawano jako procent komórek uszkodzonych.

Poziom ołowiu oznaczano we krwi pełnej na spektrofotometrze absorpcji atomowej SOLAAR M6 firmy Thermo Elemental na kuwecie elektrografitowej przy długości fali $\lambda = 283,3\text{nm}$ z wykorzystaniem korekcji tła Zeemana.

Analiza statystyczna została przeprowadzona w oparciu o program statystyczny „STATISTICA PL 6.0” (StatSoft Polska, Kraków). Obliczono średnie (\bar{x}) i odchylenie standardowe (SD) oznaczonych parametrów w badanych grupach. Rozkład zmiennych był sprawdzany testem W-Shapiro-Wilka. W przypadku zmiennych o rozkładzie normalnym do dalszej analizy



Ryc. 1. Rodzaje kometek w teście kometkowym.
Fig. 1. Types of comets assessed using the comet assay.

statystycznej wykorzystano analizę wariancji (ANOVA). W przypadku zmiennych o rozkładzie innym niż normalny stosowano nieparametryczny odpowiednik analizy wariancji test ANOVA Kruskala-Wallisa lub test U-Manna-Whitneya. Korelacje cząstkowe między

badanymi zmiennymi sprawdzono przez wyznaczenie współczynnika korelacji r (Pearsona dla zmiennych o rozkładzie zbliżonym do normalnego lub Spearmana dla zmiennych o innym rozkładzie). Za istotne statystycznie przyjmowano wyniki na poziomie $p < 0,05$.

WYNIKI

U osób narażonych średnie stężenie ołowiu we krwi (PbB) było istotnie wyższe niż u osób bez narażenia ($422,65 \pm 181,24 \mu\text{g/l}$ vs. $81,01 \pm 37,84 \mu\text{g/l}$).

W wydzielonych podgrupach wg poziomu ołowiu: podgrupa Pb1 – stężenie ołowiu we krwi poniżej $200 \mu\text{g/l}$; Pb2 – stężenie ołowiu $200\text{--}500 \mu\text{g/l}$; Pb3 – stężenie ołowiu powyżej $500 \mu\text{g/l}$; średnie stężenia ołowiu były znamienne różne pomiędzy wydzielonymi podgrupami oraz wobec grupy kontrolnej (tab. 2).

Średnia liczba komórek tworzących kometki w grupie badanej była znamienne wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej ($12,55 \pm 7,93\%$ vs. $6,63 \pm 3,05\%$), również częstość uszkodzenia DNA typu 1, 2, 3 i 4 różniła się znamienne (tab. 3).

U narażonych na ołów największą średnią liczbę kometek obserwowano u osób z stężeniem PbB powyżej $500 \mu\text{g/l}$ ($16,18 \pm 6,30\%$), a najniższą w grupie z PbB poniżej $200 \mu\text{g/l}$ ($5,67 \pm 4,34\%$). Częstość występowania „kometek” w grupie o najniższym średnim stężeniu ołowiu była podobna jak w grupie kontrolnej, natomiast w grupach z średnim stężeniem ołowiu powyżej $500 \mu\text{g/l}$ oraz w zakresie $200\text{--}500 \mu\text{g/l}$ znamienne wyższa (tab. 2).

Ponadto wykazano większą częstość kometek typu 3 i 4 u osób ze stężeniem ołowiu we krwi powyżej $500 \mu\text{g/l}$ ($1,6 \pm 1,39\%$; $0,70 \pm 0,69\%$) oraz większą częstość kometek typu 2 u osób ze stężeniem ołowiu między $200 \mu\text{g/l}$ a $500 \mu\text{g/l}$ ($1,72 \pm 1,8\%$) w porównaniu do osób grupy kontrolnej (typ 3 – $0,35 \pm 1,04\%$; typ 4 – $0,04 \pm 0,19\%$; typ 2 – $0,55 \pm 0,80\%$) i osób ekspozowanych na ołów z jego stężeniem we krwi poniżej

Tabela 2. Średnia liczba limfocytów bez uszkodzeń DNA i komórek tworzących kometki w podgrupach osób z poziomem ołowiu we krwi (PbB) do $200 \mu\text{g/l}$ (Pb1), od 200 do $500 \mu\text{g/l}$ (Pb2) oraz powyżej $500 \mu\text{g/l}$ (Pb3)

Table 2. The average number of lymphocytes without DNA damage and cells producing comets in subgroups of persons with Pb level lower than $200 \mu\text{g/l}$ (Pb1), ranging from 200 to $500 \mu\text{g/l}$ (Pb2) and over $500 \mu\text{g/l}$ (Pb3)

Grupa Group	PbB $\bar{x} \pm \text{SD}$ $\mu\text{g/l}$	Komórki bez zmian Cells without DNA damage $\bar{x} \pm \text{SD}$ %	Kometki ogółem Total number of comets $\bar{x} \pm \text{SD}$ %	Kometki typ 1 Comets type 1 $\bar{x} \pm \text{SD}$ %	Kometki typ 2 Comets type 2 $\bar{x} \pm \text{SD}$ %	Kometki typ 3 Comets type 3 $\bar{x} \pm \text{SD}$ %	Kometki typ 4 Comets type 4 $\bar{x} \pm \text{SD}$ %
Grupa Pb1 Group Pb1	$155,28 \pm 30,42$	$94,32 \pm 4,34$	$5,67 \pm 4,34$	$4,66 \pm 3,01$	$0,37 \pm 0,90$	$0,27 \pm 0,61$	$0,36 \pm 0,88$
Grupa Pb2 Group Pb2	$361,53 \pm 96,20$	$88,10 \pm 8,44$	$11,89 \pm 8,44$	$8,99 \pm 6,51$	$1,72 \pm 1,80$	$0,88 \pm 1,22$	$0,29 \pm 0,60$
Grupa Pb3 Group Pb3	$612,88 \pm 91,31$	$83,86 \pm 6,33$	$16,18 \pm 6,30$	$10,88 \pm 4,66$	$2,98 \pm 1,44$	$1,60 \pm 1,39$	$0,70 \pm 0,69$
Grupa kontrolna Control group	$81,01 \pm 37,84$	$93,47 \pm 3,13$	$6,63 \pm 3,05$	$5,68 \pm 2,32$	$0,55 \pm 0,80$	$0,35 \pm 1,04$	$0,04 \pm 0,19$

\bar{x} – wartość średnia;
mean value

SD – odchylenie standardowe.
standard deviation.

Tabela 3. Średnia liczba limfocytów bez zmian oraz tworzących kometki w grupie osób narażonych i w grupie kontrolnej

Table 3. Percentage of cells without DNA and with (comets) DNA damage in the study and control group

Grupa Group	Komórki bez zmian Cells without DNA damage %	Kometki ogółem Total number of comets %	Kometki typ 1 Comets type 1 %	Kometki typ 2 Comets type 2 %	Kometki typ 3 Comets type 3 %	Kometki typ 4 Comets type 4 %
Grupa badana Study group n = 62 $\bar{x} \pm \text{SD}$	$87,44 \pm 7,93$	$12,55 \pm 7,93$	$9,05 \pm 5,78$	$1,98 \pm 1,78$	$1,05 \pm 1,28$	$0,46 \pm 0,70$
Grupa kontrolna Control group n = 22 $\bar{x} \pm \text{SD}$	$93,44 \pm 3,13$	$6,63 \pm 3,05$	$5,68 \pm 2,32$	$0,55 \pm 0,87$	$0,35 \pm 1,04$	$0,04 \pm 0,19$
p	< 0,001	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

p – poziom istotności;
statistical significance;

\bar{x} – wartość średnia;
mean value;

SD – odchylenie standardowe.
standard deviation.

Tabela 4. Zależności między stężeniem ołowiu w krwi i liczbą poszczególnych typów kometek
Table 4. Correlations between lead concentration and the different types of comets

	Kometki typ 1 Comets type 1	Kometki typ 2 Comets type 2	Kometki typ 3 Comets type 3	Kometki typ 4 Comets type 4	Kometki ogółem Comets total
PbB	r = 0,44	r = 0,61	r = 0,45	r = 0,42	r = 0,57
	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

PbB – stężenie ołowiu w krwi pełnej;
 blood lead level;

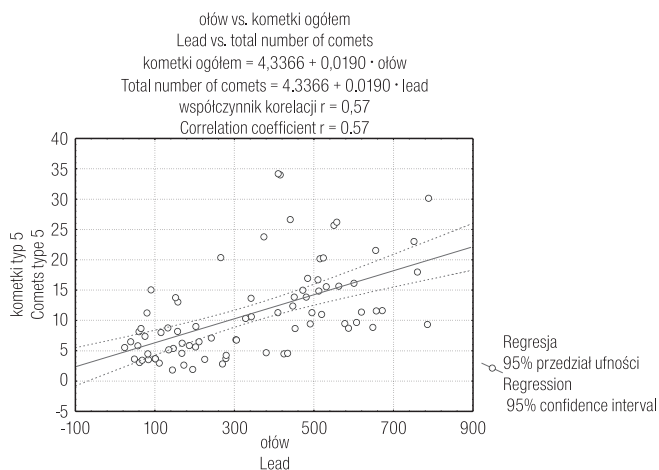
p – poziom istotności.
 statistical significance.

200 µg/l (typ3 – 0,27 ± 0,61%; typ 4 – 0,36 ± 0,88%; typ 2 – 0,37 ± 0,90%) (tab. 2). W podgrupie osób ze stężeniem ołowiu przekraczającym dopuszczalne stężenie we krwi dla osób ekspozowanych na Pb całkowita liczba kometek oraz kometek typu 2 i 3 była istotnie większa w porównaniu do grupy kontrolnej oraz pozostałych podgrup pracowników wyodrębnionych na podstawie stężenia ołowiu we krwi, natomiast komетки typu 4 występowały istotnie częściej niż w grupie kontrolnej oraz w grupie ze stężeniem ołowiu w przedziale 200–500 µg/l (tab. 2).

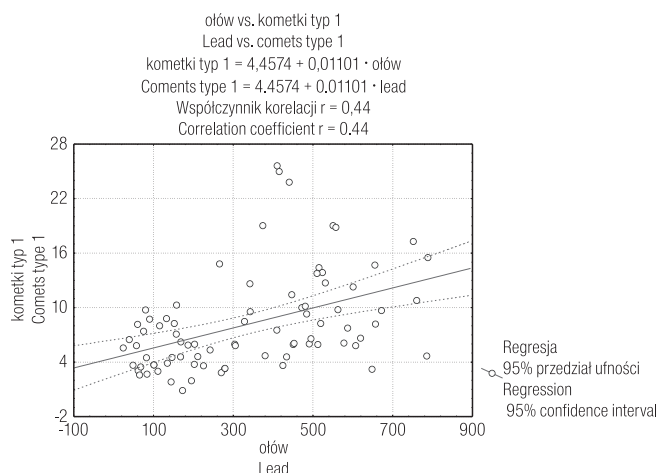
Średnia liczba komórek tworzących komетки oraz kometek wszystkich typów była podobną w grupie osób narażonych z najniższym poziomem ołowiu oraz w grupie osób bez ekspozycji na Pb (tab. 2).

W grupie osób narażonych na ołów obliczone korelacje między stężeniem ołowiu we krwi a liczbą kometek wykazały statystycznie istotną, dodatnią zależność między badanymi zmiennymi zarówno dla całkowitej liczby kometek jak i poszczególnych stopni uszkodzenia komórek. Wartości współczynników korelacji dla kometek typu 1, 2, 3, 4 oraz całkowitej ich liczby zawarto w tabeli 4.

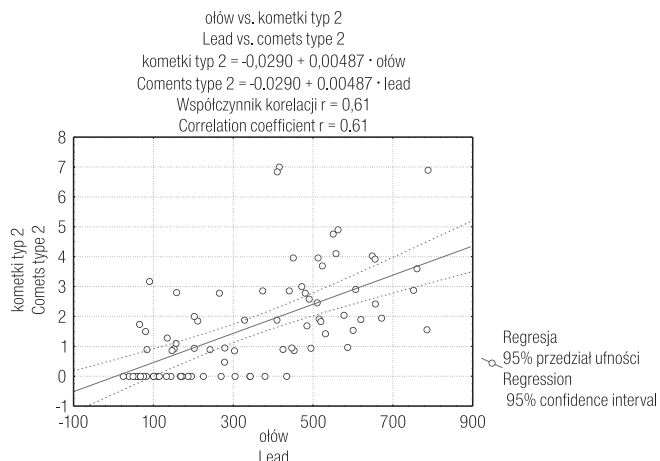
Dla całkowitej liczby kometek współczynnik korelacji wynosił r = 0,57 (p < 0.001) (ryc. 2). Wartość współczynnika korelacji wynosiła: dla komórek z uszkodzeniem typu 1 – r = 0,44; p < 0,001 (ryc. 3); typu 2 – r = 0,61; p < 0,001 (ryc. 4); typu 3 – r = 0,45; p < 0,001 (ryc. 5); typu 4 – r = 0,42 (ryc. 6).



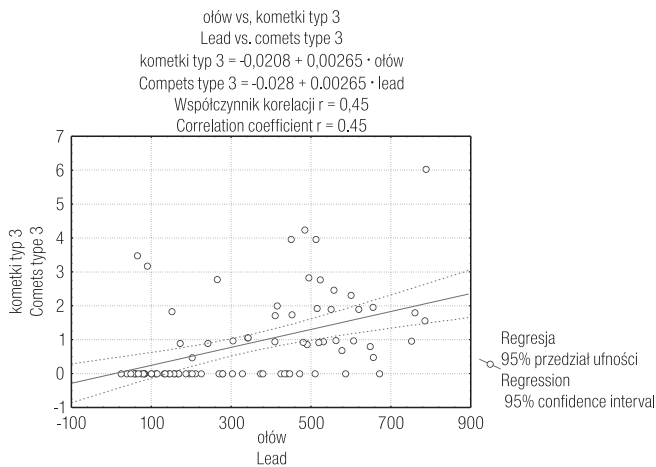
Ryc. 2. Zależność liniowa między stężeniem ołowiu we krwi i liczbą kometek ogółem.
Fig. 2. Linear correlation between blood lead concentration and the total number of comets.



Ryc. 3. Zależność liniowa między stężeniem ołowiu we krwi i liczbą kometek typu 1.
Fig. 3. Linear correlation between blood lead concentration and the number of comets type 1.

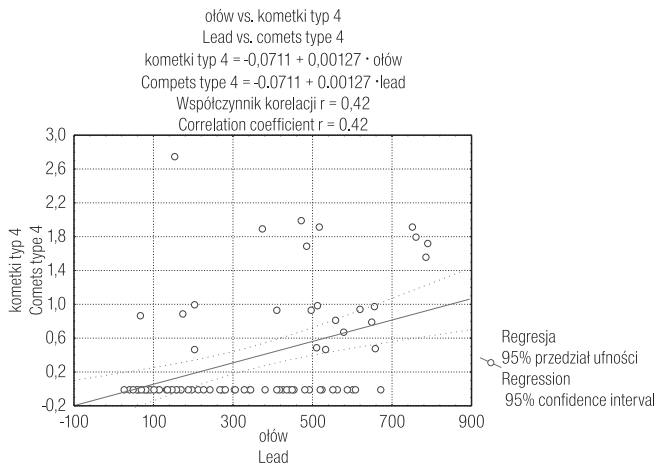


Ryc. 4. Zależność liniowa między stężeniem ołowiu we krwi i liczbą kometek typu 2.
Fig. 4. Linear correlation between blood lead concentration and the number of comets type 2



Ryc. 5. Zależność liniowa między stężeniem ołowiu we krwi i liczbą kometek typu 3.

Fig. 5. Linear correlation between blood lead concentration and the number of comets type 3.



Ryc. 6. Zależność liniowa między stężeniem ołowiu we krwi i liczbą kometek typu 4.

Fig. 6. Linear correlation between blood lead concentration and the number of comets type 4.

OMÓWIENIE

Mechanizm rakotwórczego działania nieorganicznych związków ołowiu pozostaje niewyjaśniony. Jako przypuszczalnie prowadzące do przemiany nowotworowej komórki sugeruje się działanie klastogenne ołowiu, zaburzenie syntezy i/lub procesów naprawczych DNA (6,7,11). Ołów może zastępować jony cynku w niektórych białkach (np. w protaminach) uczestniczących w regulacji procesów transkrypcji (6). Jednym z możliwych mechanizmów uczestniczących w powstawaniu uszkodzeń DNA jest udział związków ołowiu w powstawaniu reaktywnych form tlenu w komórce. Wzrost wolnych rodników tlenowych może być związany z nagromadzeniem kwasu delta-aminolewulinowego,

w wyniku inaktywacji przez ołów dehydratazy aminolewulinowej (6,7).

W badaniach osób narażonych na ołów stwierdzono istotny statystycznie wzrost liczby wymian chromatyd siostrzanych – SCE (12–15), znamienne wzrost częstości występowania mikrojąder (16) oraz aberracji chromosomowych (12). Duydu opisał istotną statystycznie zależność między częstością SCE a wydalaniem z moczem kwasu delta-aminolewulinowego u osób narażonych na ołów (13).

Mikrożelowa elektroforeza na poziomie pojedynczej komórki (SCGE) w środowisku zasadowym jest prostym, szybkim i czułym testem wykrywania uszkodzeń DNA – jedno i dwuniciowych pęknięć nici DNA, miejsc apurynowych/apirymidinowych oraz miejsc niekompletnej naprawy przez wycinanie (17,18). Test ten jest wykorzystywany zarówno w badaniach molekularnych jak i epidemiologicznych, a także do monitorowania występowania uszkodzeń DNA u osób narażonych na działanie substancji rakotwórczych lub potencjalnie rakotwórczych (17).

Test kometkowy autorzy zastosowali do oceny, czy przewlekła ekspozycja na ołów może prowadzić do powstania uszkodzeń DNA.

W naszych badaniach stwierdziliśmy znamienne wzrost liczby komórek tworzących komетки u pracowników narażonych na ołów w porównaniu do osób bez zawodowego narażenia. Obie grupy różnił znamienne wyższy poziom ołowiu we krwi u osób ekspozowanych na ołów. Wyniki naszych badań są zgodne z obserwacjami innych autorów. Podobnie u osób zawodowo ekspozowanych na ołów – znamienne wzrost liczby leukocytów krwi obwodowej wykazujących uszkodzenia DNA w teście kometkowym obserwowali Palus, Fracasso, Danadevi (15,19,20).

W badanej przez nas grupie pracowników oceniano uszkodzenie DNA, analizując nie tylko całkowitą liczbę kometek u osób narażonych na Pb, lecz także stopień uszkodzenia mierzony długością ogona komетки w skali 5-stopniowej. W grupie narażonych (z średnim stężeniem PbB znamienne wyższym niż w grupie kontrolnej) nie tylko całkowita liczba kometek była znamienne większa lecz także liczba komórek 1-, 2- 3- i 4- stopnia uszkodzenia niż w kontroli.

Istotny wzrost liczby komórek wykazujących uszkodzenia DNA wraz ze wzrostem poziomu ołowiu we krwi wykazał Danavi i wsp. (20), a ponadto stwierdził dodatnią zależność między poziomem uszkodzenia DNA a stażem pracy.

Wyniki naszych badań wskazują na zależność powstawania uszkodzeń DNA oraz ich stopnia od stężenia ołowiu we krwi, zwłaszcza stężenia przekraczającego normy higieniczne. W grupie osób ze stężeniami PbB powyżej dopuszczalnego dla osób narażonych, zamiennie częściej obserwowaliśmy komórki tworzące kometki w porównaniu do wszystkich pozostałych podgrup oraz grupy kontrolnej. Podobnie w grupie Pb3 zamiennie częściej niż u osób ze stężeniem ołowiu poniżej 200 µg/l oraz w zakresie 200–500 µg/l i u osób bez narażenia na ołów występowało uszkodzenie DNA wyższego stopnia (typu 2 i 3). Natomiast liczba całkowita kometek jak i poszczególnych typów uszkodzenia (od najniższego do najwyższego) u osób narażonych z grupy z najniższym stężeniem PbB i w grupie kontrolnej była podobna. Powstawanie uszkodzenia DNA można zatem przypuszczalnie wiązać z toksycznym oddziaływaniem ołowiu na komórki.

Prace wielu autorów wskazują, że ołów może wykazywać własności klastogenne i aneugeniczne (12,14–16). Uszkodzenia DNA mogą stanowić wczesny etap transformacji nowotworowej komórki. Mimo dyskusyjnych wyników, klasyfikujących ołów jako substancję rakotwórczą dla człowieka, brak jak dotąd jednoznacznych dowodów wykluczających genotoksyczne działanie Pb. Coraz częściej w piśmiennictwie pojawiają się opinie o roli ołowiu jako promotora. Jako możliwe drogi genotoksycznego działania wskazywane są: zaburzenia aktywności białkowej kinazy C-alfa, nasilenie tworzenia wolnych rodników tlenowych (19), oddziaływanie z białkami zawierającymi cynk, w tym białkami uczestniczącymi w procesach reparacyjnych DNA oraz procesach replikacji (6,7).

Nawet istnienie potencjalnego ryzyka zdrowotnego uzasadnia potrzebę monitorowania toksycznych następstw ekspozycji, zwłaszcza pod kątem indukowania uszkodzeń DNA. Szczególnie ważne jest badanie genotoksycznych efektów narażenia, jeżeli w środowisku pracy lub życia występuje kilka substancji rakotwórczych i/lub promotorów.

Test kometkowy jest metodą czułą, dostępną i prostą, przez licznych autorów uznaną jako test genotoksyczności (17,18). SCGE może stać się wartościowym narzędziem stosowanym w monitorowaniu, na poziomie komórkowym, toksycznych następstw narażenia na ołów.

Wyniki badań prezentowane w niniejszej pracy wskazują, że przewlekła ekspozycja na ołów wiąże się z ryzykiem powstawania uszkodzeń DNA, a test

kometkowy jest czułą metodą pozwalającą na ocenę wczesnych efektów toksycznych tego narażenia.

PIŚMIENNICTWO

1. International Agency for Research on Cancer (IARC): Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans – Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. Tom 58. World Health Organization, Lyon 1993, ss. 119–237
2. International Agency for research on Cancer (IARC): Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans – Some Metals and Metallic Compounds. Tom 23. World Health Organization, Lyon 1980, ss. 1–210, 325–415
3. International Agency for Research on Cancer (IARC): Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans – Overall Evaluation of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs. Tom 1–42, Supl. 7. World Health Organization, Lyon 1987
4. International Agency for Research on Cancer (IARC): Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Human – Inorganic and organic lead compounds. Tom 87. World Health Organization, Lyon 2004
5. Johnson F.M.: The genetic effects of environmental lead. *Mutat. Res.*, 1998;410:123–140
6. Silbergeld E.K., Waalkers M., Rice J.M.: Lead as a carcinogen: Experimental evidence and mechanisms of action. *Am. J. Ind. Med.*, 2000;38:316–323
7. Silbergeld E.K.: Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen. *Mutat. Res.*, 2003;533:121–133
8. Langauer-Lewowicka H., Zajac-Nęda M.: Metale: Ołów. W: Marek K [red.]. *Choroby zawodowe*. Wyd. I. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 2001, ss. 176–183
9. Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L.: A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 1988;175:184–191
10. McKelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Meo P.M., Collins A.: The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat. Res.*, 1993;288:47–63
11. Steenland K., Boffetta P.: Lead and cancer in humans: where are we now? *Am. J. Ind. Med.*, 2000;38:295–299
12. Huang X.P., Feng Z.Y., Zhai W.L., Xu J.H.: Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in workers exposed to lead. *Biomed. Environ. Sci.*, 1988;1:382–387
13. Duydu Y., Suzen H.S., Aydin A., Cander O., Uysal H., Isimer A. i wsp.: Correlation between lead exposure indicators and sister chromatid exchange (SCE) frequencies in lymphocytes from inorganic lead exposed workers. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2001;41:241–246
14. Wu F.Y., Chang P.W., Wu C.C., Kuo H.W.: Correlations of blood lead with DNA-protein cross-links and sister chromatid exchanges in lead workers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2002;11:287–290
15. Palus J., Rydzynski K., Dziubałtowska E., Wyszyńska K., Natarajan A.T., Nilsson: Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat. Res.*, 2003;540:19–28

-
16. Hamurcu Z., Donmez H., Saraymen R., Demirtas H.: Micro-nucleus frequencies in workers exposed to lead, zinc and cadmium. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2001;83:97–102
 17. Collins A.R., Dobson V.L., Dusinska M., Kennedy G., Stetina R.: The comet assay: what can it really tell us. *Mutat Res.*, 1997;375:183–193
 18. Speit G., Hartman A.: The comet assay a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol. Biol.*, 2005;291:85–96
 19. Fracasso M.E., Perbellini L., Solda S., Talamini G., Franceschetti P.: Lead induced strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. *Mutat Res.*, 2002;515:159–169
 20. Danadevi K., Rozati R., Saleha-Banu B., Hanumanth Rao P., Grover P.: DNA damage in workers exposed to lead using comet assay. *Toxicology*, 2003;187:183–193