

A kemoprevenció biomarker indikátorai fémexponáltak körében

Major Jenő, Jakab Mátyás, Biró Anna, Klupp Tibor, Magyar Balázs,
Gál Katalin, Oláh Gábor, Fodor Zoltán, Tompa Anna

Fodor József Országos Közegészségügyi Központ, Országos Kémiai Biztonsági Intézet,
Citogenetikai és Molekuláris Toxikológiai Osztály, Budapest

Egy összesen 47 főből álló, nemes-, színes- és nehézfémekkel exponált csoportból anémia, egyéb hematológiai ill. immunológiai eltérések és emelkedett kromozómatörés-gyakoriság miatt, 22 fő esetében a Humetta® kelátképzővel végzett három hónapos kemoprevencióra került sor. Ennek keretében részletes anamnézist vettünk föl, elvégeztük a donorok teljes klinikai laboratóriumi vizsgálatát, illetve a geno- és immuntoxikológiai állapot felmérését a kemoprevenció előtt és után. A kezelések után jelentős javulás mutatkozott a kezeletlen kontrollokhoz képest az anémiák és az emelkedett szérumb-glükózsintek gyakoriságában. Kevésbé markáns, de érzékelhető javulást észleltünk a szérumb-koleszterinszintekben és a májfunkciók paramétereiben. Emellett a kromoszómaaberráció és az apoptotikus sejtfrakciók gyakoriságában is normalizálódást figyeltünk meg. Az immunológiai paramétereket a kezelés nem befolyásolta. A kapott eredmények arra utalnak, hogy fémexponáltak körében a Humetta® kezelés sok esetben megfelelő lehet az expozíció káros hatásainak kivédésében. *Magyar Onkológia* 48:125–129, 2004

Chemoprevention with chelating agent Humetta® for three months was performed, due to anaemia and other haematologic disorders, immunotoxicological alterations and/or increased chromosome aberration rate among galvanisers and goldsmiths occupationally exposed to precious and heavy metals. Twenty-two of altogether 47 subjects took part voluntarily in the chemoprevention, and the rest of the subjects served as untreated controls. Complex clinical laboratory testing including detailed anamneses; genotoxicological and immunotoxicological monitoring were performed before and after administration of chemopreventive agent. After chemoprevention a significant improvement was observed in anaemia and serum glucose levels, while a less marked improvement was found in serum cholesterol levels and liver functions. Altered chromosome aberration and apoptotic cell fraction also tended to normalise after treatment. Immunological parameters were not affected by the treatment. The obtained results may suggest that chemoprevention with chelating agents as Humetta® can help in the prevention of harmful effects of occupational exposures to metals. *Major J, Jakab M, Biró A, Klupp T, Magyar B, Gál K, Oláh G, Fodor Z, Tompa A. Biomarker indicators of chemoprevention among subjects occupationally exposed to metals. Hungarian Oncology 48:125–129, 2004*



Bevezetés és célkitűzés

A fém- és fémfeldolgozó iparban a nehéz, ill. színesfém-expozíciók következtében fokozottan várhatók toxikus hatások, ideértve a geno- és immuntoxikus késői hatásokat is. A fémexpozíciók testi sejteket károsító késői toxikus hatása

elsősorban az általuk létrehozott oxidatív stresszen, és a következményesen kialakuló DNS-károsodásokon (mutációkon) alapul. Ezek következtében ezeken a munkahelyeken fokozott az ilyen etiológiájú nem fertőző krónikus betegségek kialakulásának kockázata, ami indokolja a kemoprevenciók stratégiák kidolgozását, és az adott munkahelyekre történő alkalmazását. Az Országos Kémiai Biztonsági Intézetben, a Széchenyi pályázat keretében a magas daganatkockázatú dolgozók egészségvédelme érdekében célzott kemoprevenciók stratégiák kidolgozását kezdtük meg (14). Ennek keretében a foglalkozásuk során exponáltak körében részletes anamnézist veszünk föl, elvégezzük a donorok teljes klinikai laboratóriumi vizsgálatát, illetve a geno- és immuntoxikológiai állapot felmérését (12), majd a kapott eredmények alapján célzott kemopre-

Közlésre érkezett: 2004. március 10.
Elfogadva: 2004. április 27.

Levelezési cím: Dr. Major Jenő,
Fodor József Országos Közegészségügyi Központ,
Országos Kémiai Biztonsági Intézet, Citogenetikai és
Molekuláris Toxikológiai Osztály, 1450 Budapest, Pf. 36.,
Tel.: +36 1 476-6432, Fax: +36 1 476-1227,
E-mail: majorj.okbi@okk.antsz.hu

Készült a Széchenyi NKFP-1/016/2001 pályázat támogatásával.

venciók lépéseket javasolunk az üzemorvos részére.

Egy nehéz-, színes-, ill. nemesfémek feldolgozásával foglalkozó munkahelyen, a munkavédelem szigorítása mellett, a fémionháztartásban bekövetkezett változások és azok következményeinek elhárítása érdekében, célzott kemoprevenció vált indokolttá. Ennek lehetséges módja a káros fémek szervezetből történő eltávolítása a vizsgálatunkba bevont Humetta® kelátképző készítmény segítségével. A kemoprevenációs kezelés indikációi anémia (vashiány, alacsony hemoglobinszint), egyéb hematológiai vagy immunológiai eltérés, ill. emelkedett kromoszómatorés-gyakoriság voltak (14), és a három hónapos kezelés hatékonyságát ismételt vizsgálatokkal ellenőriztük. A vizsgálatok elvégzéséhez az ETT hozzájárult. Itt röviden beszámolunk a kemoprevenció során kapott eredményekről.

Anyagok és módszerek

A vizsgálatokban 18 ötvös, 22 galvanizáló és 7, elsősorban szerves oldószerekkel, ill. lakkokkal exponált donor (összesen 47 fő) vett részt. Ezek közül 22 fő esetében került sor Humetta® kezelésre. (A kemoprevencióban résztvevők legfontosabb demográfiai adatait az 1. táblázat tartalmazza.) A kapott adatokat 87 (az immunológiai vizsgálatokban 25) ipari kontroll donor, ill. 25, a kezelésben részt nem vevő exponált személy adataihoz hasonlítottuk. A teljes körű klinikai laboratóriumi kivizsgálás mellett a következő geno- ill. immuntoxikológiai vizsgálatokat végeztük el a kemoprevenció előtt és után a vénásan vett vérmintából nyert perifériás fehérvérsejteken:

- Kromoszómaaberrációk (CA, 50 h) és sister-chromatid exchange (SCE, 72 h) gyakoriságának meghatározása teljes vérből a standard módszerrel (3, 11, 12)
- Lektinstimuláció (LI(PHA)) és HPRT mutációs gyakoriság (VF) meghatározása autoradiográfiával (11, 13)
- UV-indukált unscheduled DNS-szintézis (UDS) meghatározása szcintillometriával (11)
- S-fázis és apoptotikus sejtfrakció meghatározása citofluorimetriával (10)
- Limfocita-szubpopulációk arányának meghatározása citofluorimetriával (2)
- Limfocita-aktivációs markerek (CD25, CD56, CD71) meghatározása citofluorimetriával (2)
- Fehérvérsejtek reaktív oxigén-intermedier (ROI) termelésének mérése Phagoburst® teszt segítségével (2)

A statisztikai elemzéseket Student t-próbával, ill. a Mann-Whitney nem paraméteres teszttel végeztük ($p < 0,05$).

Eredmények

A kapott klinikai laboratóriumi értékek közül kiemelendő a csoport egészére vonatkozóan emelkedett anémia-incidencia, az emelkedett szérum-

glükóz-értékek és az eltérést mutató máj-, ill. vese-funkciós értékek magas gyakorisága (2. táblázat). A kemoprevencióra szoruló donorok kiválasztása éppen az eltérést mutató klinikai laboratóriumi, ill. genotoxikológiai értékek alapján történt. Három személynél már manifesztálódott II típusú diabetes mellitust észleltünk. A kezelés előtt a hematológiai paraméterekben, a májfunkciókban, a szérum-koleszterin, ill. -glükózsintekben respektíven a donorok 59%, 59%, 91%, ill. 55%-a mutatott eltérést a normális értékektől. Ezek a három hónapos kezelés után 41%, 50%, 86%, ill. 31%-ra csökkentek. Ha a tendenciákat vizsgáltuk, és a szignifikánsan javuló, de a normális tartományt még el nem érő értékeket is figyelembe vettük, a javulások még markánsabbak voltak. Rosszabbodás a kezelt csoportban egy esetben sem fordult elő, és a donorok szubjektíven is jobb közérzetről számoltak be a korábbi anamnéziszfelvételhez, ill. a kezeletlen munkatársakhoz képest.

A genotoxikológiai vizsgálatok során (3. táblázat) a kezeléseket előtt a csoport átlagában emelkedett UDS-értéket és egyes donoroknál egyénileg emelkedett CA-gyakoriságot találtunk (22) a kemoprevencióra kiválasztott személyek körében, amik a kezelése után normalizálódtak, így az 5, jelentősen emelkedett szérum-glükózsintet mutató donor közül 4 esetben is. Az apoptotikus sejtfrakció, párhuzamosan a CA gyakoriságok változásával, emelkedett volt a kezeléseket előtt, ám a kezeléseket után az ipari kontroll szintjére

1. táblázat.

A Humettával kezelt donorok legfontosabb expozíciós és demográfiai adatai

	Donorok		Expozíció
	n	%	
Kezelt (összes)	22	100,0	
Galvanizálók	17	72,7	Ag, Au, Cu, Cr,Cd, Fe,Ni, Sn, Zn, cianidok, savak, lúgok
Ötvösök	5	22,7	Au, Ag, Cu, Zn, Al
Dohányzó	8	45,4*	
Ex-dohányzó	2		
Átlagos expozíció (év)	18,9 ± 1,7		
Átlagéletkor (év)	50,2 ± 1,6		

*Aktív és ex-dohányzó együtt

2. táblázat. A klinikai laboratóriumi paraméterek változásai

Csoport	Donor n	Eltérések gyakorisága				
		Hematológiai paraméterek %	Máj-funkció %	Vese-funkció %	Szérum-koleszterin %	Szérum-glükóz %
Kezeletlen donorok						
0. hónap	22	24	35	24	88	59
3. hónap	18	24	41	59	88	35
Kezelt donorok						
0. hónap	22	59	59	45	91	55
3. hónap	22	41	50	59	86	31

csökkent. A lektinstimulációra adott válasz (LI(PHA)) és az S-fázisok gyakorisága a kezelések előtt alacsonyabb volt az ipari kontroll értékénél; ezek az értékek és az ismételt vizsgálat során mindkét csoportban rendeződtek.

Az immunológiai vizsgálatok (4. táblázat) eredményei szerint a kemoprevenzióra kiválasztottak körében a helper T-limfociták százaléka és a Th/Tc arány szignifikánsan magasabb a kontroll csoport adataihoz viszonyítva. Ezt a jelenséget a kezelés nem befolyásolta. A fémexponáltaknál a B-limfociták CD71-expressziója és a leukociták ROI-termelése alacsonyabb volt a kontrollokénál, 3 hónap után a kezelt és a kezeletlen csoportban egyaránt emelkedett mindkét paraméter.

Megbeszélés

A Humetta[®] kelátképzővel végzett három hónapos kezelés után jelentős javulás mutatkozott a kezeletlen kontrollokhoz képest az anémiák és az emelkedett szérum-glükózsintek gyakoriságában. Kevésbé markáns, de érzékelhető javulást észleltünk a szérum-koleszterinszintekben és a májfunkciós paraméterekben. Emellett a CA és az apoptotikus sejtfraekciók gyakoriságában is normalizálódást figyeltünk meg.

Véleményünk szerint a kemoprevenziós kezelések legfontosabb jótékony hatása a vashiá-

nyos anémia gyakoriságának várt csökkenése volt. Egy másik jelentékeny hatás a szérum-glükózsintek csökkenése a korábban magas értékeket mutató donorokban. Ismert, hogy a fémexpozíció következtében létrejövő oxidatív stressz károsíthatja a hasnyálmirigyben a Langerhans-sejtek DNS-állományát, ami a II. típusú diabetes mellitus kialakulásának egyik oki tényezője (5). Inzulinfüggő cukorbetegségben, még kielégítő glikémiás kontroll mellett is (7) a DNS-károsodás fokozott lehet az XPD típusú repair enzimeknek az inzulinreceptorokon keresztül történő down-regulálása miatt (9). A perifériás limfocitákban észlelt DNS-károsodás mértéke jól korrelál a Langerhans-sejtekben létrejövő károsodással (6), következőképpen magyarázhatja a vizsgált donorokban nagy gyakorisággal észlelt magas szérum-glükózsinteket (4). A kelátképzők adásával a fémexpozíció következtében létrejött oxidatív stressz csökkenthető (13). A 22, kemoprevenzióra kiválasztott személy közül 5 esetben találtunk jelentősen emelkedett szérum-glükózsinteket, akik közül 4 donornál a kezelések előtt emelkedett UDS értékeket észleltünk, amik a kezeléseket után mind rendeződtek. A fémexpozíció következtében egyes excíziós repairek gátlása lehetséges, amire a sejtek gyakran reagálhatnak fokozott teljes excíziós repairkapacitás-emelkedéssel (8).

3. táblázat.

A genotoxikológiai biomarkerek változásai (átlag ± SE)

Csoport	Donor n	CA %	SCE 1/mitózis	VF x10 ⁻⁶	UDS rel. egység	LI(PHA) %	S-fázis	Apoptotikus sejtfraekció
Ipari kontroll	87	1,60±0,26	5,71±0,13	5,68±0,64	7,11±0,37	17,45±1,01	14,89±1,16	6,13±0,67
Kezeletlen donorok								
0. hónap	22	0,68±0,25	5,98±0,13	7,08±0,79	9,50±0,64	7,49±0,90*	6,73±0,85*	7,92±1,06
3. hónap	18	1,67±0,49	5,97±0,11	5,50±1,13	4,95±0,48*	13,61±1,26	22,91±1,81*	5,46±0,42
Kezelt donorok								
0. hónap	22	2,00±0,58	5,74±0,10	5,91±1,14	8,63±0,61	8,09±0,87*	8,29±0,78*	15,19±1,25*
3. hónap	22	1,78±0,38	6,16±0,14	5,16±0,84	5,29±0,57	13,70±1,20	23,28±0,08	4,82±0,34

* Szignifikáns (P<0,05) az ipari kontrollhoz képest
 CA Szerkezeti kromoszómaaberráció (gap nélkül)
 SCE Sister chromatid exchange
 VF HPRT variáns frekvencia
 UDS UV-indukált „unscheduled” DNS-szintézis
 LI(PHA) Lektinstimuláció utáni jelölődési index

4. táblázat. Az immuntoxikológiai paraméterek változásai (átlag ± SE)

Csoport	Donor n	T-sejt %	Th %	Tc %	Th/Tc %	B-sejt %	NK-sejt %	CD25+ T T sejt%	CD25+ Th Th sejt %	CD71+ B B sejt%
Kontroll	25	72,6±1,4	40,8±1,3	28,4±1,3	1,5±0,1	10,0±0,8	13,4±1,4	11,6±1,7	19,5±2,8	46,6±7,6
Kezeletlen										
0. hónap	22	70,9±1,4	41,6±1,9	26,3±1,4	1,7±0,1	10,5±0,8	15,0±1,4	11,8±2,3	19,5±3,8	32,4±6,3
3. hónap	18	73,5±1,8	45,7±2,6	25,2±1,5	2,0±0,2	10,1±0,8	12,0±1,5	12,1±2,3	20,7±4,4	40,4±7,1
Kezelt										
0. hónap	21	72,8±1,5	47,3±2,0*	25,5±2,3	2,1±0,2*	10,9±0,9	12,5±1,3	12,8±2,3	20,0±3,8	33,2±6,7
3. hónap	21	73,2±1,5	48,1±1,7*	22,6±1,1	2,2±0,1*	11,5±1,1	11,8±1,6	13,2±1,7	23,6±3,5	43,0±8,2

* Szignifikáns (P<0,05) a kontrollhoz képest
 Th Helper T-sejt
 Tc Citotoxikus T-sejt
 NK Természetes ölósejt

Az apoptotizáló sejtfrakció gyakoriságának normalizálódása valószínűleg szintén összefügg a kelátképzővel végzett méregtelenítéssel. A lek-tinstimulációban és az immunológiai paraméterekben bekövetkezett javulás valószínűleg független a Humettával végzett kemoprevenziós kezeléstől.

Következtetések

A fémexponáltak között szembetűnően magas volt az anémia, a magas szérumb-glükózsintek, és vesefunkció-eltérések előfordulása. A kemoprevenziós kezeléseket követően ezek az értékek szembetűnően javultak. A kezelések következtében bekövetkezett változásokat a komplex klinikai laboratóriumi vizsgálatokkal, ill. a többvégpontos geno- és immuntoxikológiai monitorral eredményesen lehetett detektálni. A kapott eredmények arra utalnak, hogy fémexponáltak körében a Humetta[®] kezelés sok esetben megfelelő lehet az expozíció káros hatásainak kivédésében. Ez azonban nem helyettesítheti a munkahelyeken az expozíció teljes megszüntetésére irányuló törekvéseket.

Irodalom

- Barboudi A, Doulias PT, Zhu BZ, et al. Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med* 31:490-498, 2001
- Biró A, Pállinger E, Major J, et al. Lymphocyte phenotype analysis and chromosome aberration frequency of workers occupationally exposed to styrene, benzene, polycyclic aromatic hydrocarbons or mixed solvents. *Immunol Lett* 81:133-140, 2002
- Carrano AV, Natarajan AT. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *ICPEMC Publ. No. 14. Mutat Res* 204:379-406, 1988
- Collins AR, Raslova K, Somorovska M, et al. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic Biol Med* 25:373-377, 1998
- Delaney CA, Green MH, Love JE, Green IC. Endogenous nitric oxide induced by interleukin-1 beta in rat islets of Langerhans and HIT-T15 cells causes significant DNA damage as measured by the 'comet' assay. *FEBS Letters* 333:291-295, 1993
- Dincer Y, Akcay T, Alademir Z, Ilkova H. Assessment of DNA base oxidation and glutathione level in patients with type 2 diabetes. *Mutat Res* 505:75-81, 2002
- Hannon-Fletcher MP, O'Kane MJ, Moles KW, et al. Levels of peripheral blood cell DNA damage in insulin dependent diabetes mellitus human subjects. *Mutat Res* 460:53-60, 2000
- Hartwig A, Asmuss M, Ehleben I, et al. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. *Environ Health Perspect* 110(Suppl) 5:797-799, 2002
- Merkel P, Khoury N, Bertolotto C, Perfetti R. Insulin and glucose regulate the expression of the DNA repair enzyme XPD. *Mol Cell Endocrinol* 201:75-85, 2003
- Tompa A, Jakab MG, Major J, et al. The somatostatin analogue peptide TT-232 induces apoptosis and chromosome breakage in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 465:61-68, 2000
- Tompa A, Major J. Genotoxikus ágenssel exponált humán populációk genotoxikológiai (citogenetikai) monitorozása. OKK-OKBI Módszertani Közleményei. No. 1. OKK-OKBI, Budapest 2000
- Tompa A, Major J, Jakab M. A perifériás limfocita genotoxikológiai markereinek változása a vegyipari expozíciók kapcsán. (Genotoxikológiai monitor). *Magyar Onkológia* 37:169-180, 1993
- Tompa A, Sápi É. Detection of 6-thioguanine resistance in human peripheral blood lymphocytes (PBL) of industrial workers and lung cancer patients. *Mutat Res* 210:345-351, 1989
- Tompa A, Szende B. Megelőző orvostudomány: biomonitorozás és kemoprevenció. *Magyar Onkológia* 46:147-153, 2002

HIRDETMÉNY

A MAGYAR PATHOLOGUSOK TÁRSASÁGA ÉS
A MAGYAR ONKOLÓGUSOK TÁRSASÁGA

KROMPECHER ÖDÖN

Pályamunka díjazására **120 000.- Ft** pályadíjat tűz ki az orvostanhallgatók és a fogorvostanhallgatók számára.

A pályamunka címe: „**Terápia-célpontú daganatdiagnosztika**”

A pályamunka terjedelme az irodalommal és dokumentációval együtt maximum 80 oldal lehet.

A **munkán csak a jelige szerepelhet**, melyhez mellékelni kell egy borítékot, rajta a jeligével, s a lezárt borítékban a nevet, évfolyamot, pontos lakcímet, telefonszámot, e-mailt kell feltüntetni.

A pályamunka beadási határideje: 2004. november 30.

Helye: Semmelweis Egyetem, II. sz. Patológiai Intézet, 1091 Budapest, Üllői út 93.

Díjazást elért pályázat esetén a Társaságok javaslatot tesznek a pályamunka szakdolgozatként való elfogadására.

Budapest, 2004. április

**MAGYAR PATHOLOGUSOK TÁRSASÁGA és
MAGYAR ONKOLÓGUSOK TÁRSASÁGA VEZETŐSÉGE**