

Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica
Číslo 1/2007

**Metody biologického monitorování
genotoxických účinků faktorů prostředí**

Cytogenetická analýza periferních lymfocytů

Aktualizace platné standardní metodiky
(Příloha AHEM 20/1989, 5/2000)

Praha, červen 2007

Předseda redakční rady: doc. MUDr. L. Komárek, CSc.
Členové: prof. MUDr. V. Bencko, DrSc., MUDr. J. Mika,
RNDr. F. Rettich, CSc., Mgr. J. Veselá, MUDr. J. Volf, Ph.D.

Státní zdravotní ústav v Praze
ISSN 1804-9613

ACTA HYGIENICA, EPIDEMIOLOGICA ET MICROBIOLOGICA
Číslo 1/2007 - červen 2007

Cytogenetická analýza periferních lymfocytů
Aktualizace platné standardní metodiky

Autoři: D. Očadlíková, H. Bavorová, J. Šmíd - Národní referenční laboratoř
pro genetickou toxikologii, SZÚ

Vychází nepravidelně v elektronické podobě

Redakce:

Telefon: 267082288, e-mail: ahemszu@szu.cz

Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

Obsah

CYTOGENETICKÁ ANALÝZA LIDSKÝCH PERIFERNÍCH LYMFOCYTŮ	7
SKUPINOVÉ A INDIVIDUÁLNÍ HODNOCENÍ PROFESIONÁLNÍ EXPOZICE GENOTOXICKÝM LÁTKÁM	8
INTERPRETACE VÝSLEDKŮ CYTOGENETICKÉ ANALÝZY SKUPINOVÉ HODNOCENÍ	8
INDIVIDUÁLNÍ HODNOCENÍ	9
CYTOGENETICKÁ ANALÝZA V SYSTÉMU PREVENTIVNÍCH PROHLÍDEK.....	11
STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP	12
1. Předmět a vymezení působnosti	12
2. Definice	12
3. Princip metody	12
4. Bezpečnost práce.....	13
5. Chemikálie a spotřební materiál.....	13
Základní chemikálie	13
Roztoky	14
6. Přístroje a pomocná zařízení	15
7. Pracovní postup	15
Kultivace	16
Biologické monitorování.....	16
Testování genotoxicity	16
Zpracování kultur a příprava mikroskopických preparátů	17
Barvení preparátů	18
Mikroskopická analýza	18
8. Rušivé vlivy.....	20
9. Validace metody.....	20
10. Vyjadřování nejistot měření	Chyba! Záložka není definována.
11. Kontrola kvality.....	Chyba! Záložka není definována.
PRŮVODKA PRO CYTOGENETICKOU ANALÝZU PERIFERNÍCH LYMFOCYTŮ	21
PROTOKOL O ZKOUŠCE	23
PROTOKOL CYTOGENETICKÉ ANALÝZY	24
INTERVALY SPOLEHLIVOSTI	25
LITERATURA.....	26
GRAFY	29

Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů je jednou z genotoxikologických metod, vhodných pro biologické monitorování expozice a účinku klastogenních látek na člověka, jež jsou charakteristické svými časnými účinky. Počátky biomonitorování těchto genotoxických látek spadají do 70. let minulého století, kdy byla pozornost soustředěna především na expozici člověka mutagenním a karcinogenním látkám z pracovního prostředí. V ČR přibývá ročně přibližně 45 000 nádorových onemocnění a z tohoto počtu je zhruba 2 000 případů způsobeno profesionální expozicí chemickým látkám. Koncem 90. let bylo u nás asi 1,4 milionu osob profesionálně exponovaných prokázáným a podezřelým karcinogenům (1). Genetická toxikologie využívá metody biologického monitorování v oblasti prevence nádorovým onemocněním nejen u osob profesionálně exponovaných mutagenním a karcinogenním látkám, ale i u osob neexponovaných, ovlivněných těmito látkami z životního prostředí. Biologický monitoring slouží k určení expozice genotoxickým faktorům pracovního a životního prostředí a tím umožňuje posoudit míru rizika pro exponované i neexponované skupiny i jednotlivce. Vzhledem k tomu, že v průběhu uplynulých 30 let bylo vyhodnoceno cytogenetickou analýzou velké množství vzorků (2, 3, 4, 5, 6, 7), byly získány dostatečné zkušenosti k přijetí závěru, že je nutné považovat cytogenetickou analýzu periferních lymfocytů za biologický expoziční test vhodný pro skupiny i jednotlivce.

Konvenční metoda cytogenetické analýzy periferních lymfocytů je ve světě hodnocena jako biomarker expozice a časného biologického účinku mutagenních a karcinogenních látek (8, 9, 10). Vzhledem k úzkému vztahu mezi mutagenezí a karcinogenezí má významnou asociaci s rizikem vzniku nádorů při zvýšených hodnotách aberantních buněk (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17). Důkazy o tom přinesly prospektivní kohortové studie (18). Zvýšená incidence nádorů u osob s vysokou frekvencí chromozomových aberací byla prokázána v severské kohortě (12, 14), italské kohortě (13) a v nested case – control studii z Taiwanu (16). V mezinárodním projektu 5. rámcového programu EU, kterého se zúčastnilo 11 evropských států včetně České republiky v letech 2000 – 2004 byla provedena epidemiologická analýza výsledků cytogenetických vyšetření české kohorty. Prokázala signifikantní asociaci mezi výskytem různých typů nádorů a chromozomovým typem aberací. Nádory žaludku vykazovaly silnou asociaci se zvýšenou frekvencí všech typů chromozomových aberací. Rozsah české kohorty nemá ve světě srovnání co do velikosti a kvality použitých údajů. Z období 1975 – 2000 bylo vybráno téměř 12 000 osob, u kterých v době cytogenetického vyšetření nebylo diagnostikováno nádorové onemocnění. Bylo prokázáno signifikantně vyšší riziko vzniku všech typů nádorů u osob s vyšší

frekvencí aberantních buněk a profesionálně exponovaných polycyklickým aromatickým uhlovodíkům. Uplatňování preventivních opatření při zjištění vyšší frekvence chromozomových aberací u profesionálně exponovaných osob v 70. a 80. letech je pravděpodobně příčinou nižší incidence nádorových onemocnění ve srovnání s ostatními státy (2, 19, 20).

Frekvence buněk s chromozomovými aberacemi dospělé neexponované populace v ČR je odhadnuta na základě velkého množství údajů hygienické služby na 1,2 – 2,0 % aberantních buněk (21). Z analyzovaných údajů 1201 neexponovaných osob za období 1980 – 1988 (22) byla stanovena frekvence aberantních buněk na 1,75 %, v období 1989 – 1993 byla 1,87 % (339 osob) a v letech 1994 – 1999 došlo k poklesu na 1,10 % aberantních buněk (1801 osob). **Z výsledků cytogenetických analýz shromážděných za období 2000 – 2006 od 1998 neexponovaných osob byla stanovena frekvence aberantních buněk na 1,70 %. Tuto hodnotu lze v současné době považovat za referenční hodnotu pro profesionálně neexponovanou populaci.**

Zástupci České a slovenské společnosti pro mutagenезi zevním prostředím Československé biologické společnosti a Společnosti pracovního lékařství ČLS JEP v roce 2006 společně diskutovali otázku využití cytogenetické analýzy periferních lymfocytů pro monitorování expozice genotoxickým faktorům pracovního prostředí. Výsledkem jednání byla shoda v tom, že tato metoda je biologickým expozičním testem vhodným pro hodnocení expozice genotoxickým látkám, směsím těchto látek a pracovním procesům spojených s prokázanými genotoxickými účinky v pracovním prostředí. Její využití je nutno prosazovat zejména v případě směsných expozic a v případě expozic látkám, jejichž analýza v prostředí není v současné době uskutečnitelná. Značnou výhodou této metody je monitorování dlouhodobé expozice, na rozdíl od výsledků jednorázového měření parametrů prostředí, které nemohou přinést dostatečný důkaz o expozici mimo dobu měření. Fakt, že hodnoty chromozomových aberací vykazují tendenci individuální variability je nutné považovat za klad metody, neboť výsledky pre- a post-expoziční jsou schopny detekovat osoby se zvýšenou individuální vnímavostí ke genotoxické noxe.

Proto je zapotřebí zařadit cytogenetickou analýzu mezi biologické expoziční testy do vyhlášky 432/2003 Sb., kterou se stanoví podmínky pro zařazování prací do kategorií, limitní hodnoty ukazatelů biologických expozičních testů, podmínky odběru biologického materiálu pro provádění biologických expozičních testů a náležitosti hlášení prací s azbestem a biologickými činiteli, jako prováděcí vyhlášky k zákonu č. 258/2000 Sb.

o ochraně veřejného zdraví v platném znění, a to v rámci její novelizace s důrazem na to, aby provádění a interpretaci výsledků byly oprávněny vykonávat pouze laboratoře genetické toxikologie pracující v oblasti preventivní medicíny, zařazené do systému kontroly kvality NRL pro genetickou toxikologii SZÚ Praha. Do této vyhlášky je třeba zařadit příkladový seznam látek i procesů, u kterých je nutné cytogenetické vyšetření pravidelně provádět a uvést odkaz na jednotnou metodiku včetně systému kontroly kvality.

Předkládaná aktualizace stávající a platné Standardní metodiky (Příloha AHEM 20/1989 a AHEM 5/2000) se týká metody cytogenetické analýzy lidských periferních lymfocytů hlavně z hlediska referenčních hodnot za poslední období, biologického monitorování skupin i jednotlivců a interpretace výsledků.

RNDr. Dana Očadlíková
vedoucí NRL pro genetickou toxikologii
SZÚ Praha

CYTOGENETICKÁ ANALÝZA LIDSKÝCH PERIFERNÍCH LYMFOCYTŮ

- **Metoda** cytogenetické analýzy periferních lymfocytů umožňuje detekci, kvalitativní a kvantitativní analýzu chromozomových abnormalit (strukturálních a numerických aberací) v lidských somatických buňkách *in vitro* v optickém mikroskopu (6, 23, 24, 25, 26).
- **Poškození** genetického materiálu buňky (především jaderné DNA), analyzované jako chromozomové aberace, je projevem biologického efektu genotoxických faktorů (chemických, fyzikálních a biologických) prostředí (6, 7, 27).
- Metoda **přímo** prokazuje expozici člověka genotoxickým faktorům s klastogenním účinkem, jehož projevem je indukce chromozomových aberací v somatických buňkách. Zlomy a přestavby chromozomů představují riziko aktivace onkogenů a deaktivace tumor supresorových genů. Indukovaná poškození chromozomů somatických buněk prokazatelně zvyšují v lidské populaci riziko vzniku nádorových i degenerativních onemocnění, negativně ovlivňují funkci buněčných reparačních mechanismů a zasahují do procesů apoptózy (9, 12, 14, 15, 24, 26, 27, 28).
- Mnohaleté zkušenosti s využitím metody cytogenetické analýzy v rámci biologického monitorování profesionální i neprofesionální expozice v ČR potvrzují, že uvedený metodický přístup je zatím jediný s praktickým využitím pro objektivizaci vlivu faktorů pracovního i environmentálního prostředí na lidský organismus z hlediska pozdních účinků genotoxických faktorů na člověka (3, 5, 6, 9, 12, 13, 27, 29).
Hodnocení změn frekvence získaných chromozomových aberací ve vztahu k expozici genotoxickým faktorům v prostředí je v souladu se stanovisky expertních komisí EC, WHO a ILO, doporučujících rozšířit spektrum vyšetřovacích metod o metody molekulární cytogenetiky, např. FISH, Comet assay (30).
- Metoda cytogenetické analýzy je celosvětově rozšířena a používá se jako **biologický expoziční test** a jako **biomarker expozice** genotoxickým látkám v pracovním i environmentálním prostředí.
- Metoda slouží jako **biomarker účinku** genotoxických faktorů na organismus a jako biologický **indikátor časných efektů** expozice genotoxickým látkám.
- Metoda umožňuje **zhodnocení expozice jednotlivce** genotoxickým látkám.

SKUPINOVÉ A INDIVIDUÁLNÍ HODNOCENÍ PROFESIONÁLNÍ EXPOZICE GENOTOXICKÝM LÁTKÁM

- Cytogenetická analýza periferních lymfocytů se používá jako biologický expoziční test. Za nejmenší statisticky přijatelnou skupinu je považováno 20 osob. U těchto skupin se analyzuje minimálně 100 metafází/osobu – skupinový test.
- U skupin menších (v rozsahu 10 – 20 osob) je analyzováno minimálně 200 metafází/osobu.
Analýzu kolektivu menšího než 10 osob nelze považovat za skupinový test a každou osobu je třeba hodnotit individuálně. Analyzuje se 200 – 300 buněk/osobu, případně i více.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ CYTOGENETICKÉ ANALÝZY

SKUPINOVÉ HODNOCENÍ

Po zjištění průměrné hodnoty procenta chromozomových aberací celé skupiny jsou výsledky interpretovány takto:

- **Méně než 2 % AB. B.** hodnota je shodná se **spontánní frekvencí** aberací u běžné, profesionálně neexponované populace. Svědčí o biologicky neefektivní expozici genotoxickým látkám – je velmi nízká a lidským organismem pravděpodobně tolerovaná.

Významnou měrou se při tom uplatňují:

- a) genetický polymorfismus
- b) buněčné reparační mechanismy
- c) imunitní systém exponovaného jedince
- d) životní styl
- e) kvalita prostředí ve kterém osoba žije a další, dosud nepoznané faktory

(kontrola skupiny cytogenetickou analýzou za 1 – 2 roky a vždy při změně pracovních podmínek)

- **2 - 4 % AB. B.** - svědčí o **zvýšené expozici** genotoxickým látkám, organismem již netolerované, kdy se kromě vyšší expozice uplatňují faktory uvedené výše:

Viz. a) – e).

(kontrola skupiny cytogenetickou analýzou 1 x ročně a vždy při změně pracovních podmínek)

* Účelem každoroční kontroly není prosté konstatování zvýšené frekvence chromozomových aberací. Je nutné využít všech dostupných opatření ke snížení expozice celé skupiny. U osob s opakovaně vysokými hodnotami (5 a více % AB. B.) je vhodné doporučit přeřazení na pracoviště, kde nedochází k expozici genotoxickým látkám.

* pokud je to možné, je třeba přesně definovat expozici (např. pomocí personálních dozimetřů) v provozech s expozicí těm genotoxickým látkám, které lze stanovit kvalitativně a/nebo kvantitativně.

- **Více než 4 % AB. B.** - tento nálezn svědčí o **vysoké expozici** genotoxickým látkám; pravděpodobně představuje pro vnímavé jedince **zvýšené riziko** vzniku nádorového onemocnění a dalších projevů pozdních účinků genotoxických látek a/nebo zvýšený výskyt vrozených vad u potomků exponovaných jedinců.

Vyšetření skupiny je třeba opakovat za 2 - 4 měsíce; kontrola 1 x ročně. Je nutné monitorovat jedince s hodnotami 5 a více % AB. B. Při opakovaném nálezu těchto hodnot u konkrétní osoby je nutné vykonávanou práci považovat za **kontraindikovanou**.

Pokud je to možné, je třeba přesně definovat expozici genotoxickým látkám (personální dozimetrie).

Prvořadým úkolem je účinné snížení expozice genotoxickým látkám pro celou skupinu i jednotlivce.

INDIVIDUÁLNÍ HODNOCENÍ

Opakování cytogenetické analýzy stejné osoby několikrát za rok v období několika let ukázalo, že individuální průměrná frekvence chromozomových aberací je v průběhu let konstantní. Během roku hodnoty cytogenetické analýzy mohou kolísat v rozmezí 0 – 5 % AB. B. (výjimečně až 6 %), avšak tyto vysoké hodnoty se nachází jen ojediněle. Při určování spontánní frekvence AB. B. u jednotlivce je třeba cytogenetickou analýzu opakovat v průběhu 2 – 4 měsíců. Nalezne-li se opakovaně vysoká hodnota (5 a více % AB. B.), nejedná se pravděpodobně o statistický jev, ale o důsledek významné expozice genotoxickým faktorům nebo o osobní dispozici vyšetřované osoby. **Opakovaně zjištěnou frekvenci 5 a více % AB. B. je třeba považovat za kontraindikaci pro práci v riziku chemické karcinogenity.**

- 5 a více % AB. B. – ukazuje na vysokou expozici genotoxickým látkám a/nebo
 - sníženou kapacitu reparačních mechanismů
 - nedostatečnou aktivitu imunitního systému
 - zvýšenou vnímavost ke genotoxickým látkám (důsledek genetického polymorfismu)
 - další faktory

Jedinec vlivem některého z uvedených faktorů ztrácí schopnost tolerovat zátěž genotoxickým látkám z prostředí a je ohrožen:

- * urychleným stárnutím tkání a orgánů (progrese degenerativních onemocnění)
 - * vznikem nádorového procesu
 - * poškozením genetického materiálu zárodečných buněk (vrozené vady u jeho potomků)
- **Individuální hodnoty do 5 % AB. B.** (zjištění 0 – 5 %), nejsou-li zjišťovány opakovaně, nejsou považovány za zvýšené.
 - **Opakované zjištění 5 a více % AB. B.**, zejména je-li doprovázeno nálezem závažných typů aberací, např. chromozomových výměn (translokací, polycentrických chromozomů) je důvodem k okamžitému - možná jen dočasnému, vyřazení osoby z expozice. Tento nález opravňuje k opakované analýze po 2 - 4 měsících, včetně šetření z hlediska hygieny práce (možnost průkazu vysoké expozice) a dalších klinických vyšetření.
 - Pokud je to možné, je třeba vždy analyzovat expozici genotoxickým látkám jak kvalitativně, tak i kvantitativně. Pro většinu látek, se kterými přicházejí exponované osoby do styku, však nejsou k dispozici vhodné analytické metody. Zde se projevuje výhoda nespecifičnosti metody cytogenetické analýzy. V případech, a těch je většina, kdy nelze provést cílenou (specifickou) analýzu genotoxických látek v pracovním prostředí, je zvýšená frekvence chromozomových aberací jediným důkazem jak jejich přítomnosti v prostředí, tak i vzájemné interakce genotoxinů a genetického materiálu buňky. Zvýšená frekvence chromozomových aberací svědčí také o tom, že v organismu exponovaného jedince vzniklo poškození genetického materiálu, které nebylo opraveno a které může perzistovat s různě dlouhou latencí se všemi důsledky souvisejícími s procesem mutagenese a karcinogeneze.

CYTOGENETICKÁ ANALÝZA V SYSTÉMU PREVENTIVNÍCH PROHLÍDEK

- **Při vstupní prohlídce:**
obligatorní - vždy, jedná-li se o pracoviště s rizikem expozice genotoxickým látkám (mutageny, karcinogeny). Cílem je zabránit práci v riziku predisponovaným jedincům vzhledem k zvýšenému riziku poškození zdraví. Při zjištění 5 a více % AB. B. vyšetření opakovat po 2 – 4 měsících. Potvrdí-li se výsledek, nezařadit do rizika, event. vyřadit z rizika expozice genotoxickým látkám

- **Při periodické prohlídce:**
obligatorní - vždy, jedná-li se o pracoviště s rizikem expozice genotoxickým látkám (mutageny, karcinogeny). Kontrola skupiny za 2 měsíce – 2 roky podle výsledku analýzy a vždy při změnách technologie nebo organizace práce na pracovišti. Jedince s hodnotou 5 a více % AB. B. opakovaně vyšetřit po 2 – 4 měsících a hledat příčiny vysokých hodnot. Při opakovaně zjištěných vysokých hodnotách AB. B. pracovníka přeradit a dále klinicky vyšetřovat

- **Při výstupních prohlídkách:**
provádět vždy – zjištěné hodnoty mohou mít s odstupem času značný význam při posuzování event. poškození zdraví z práce na pracovišti s rizikem genotoxických látek

- **Následné prohlídky**
podle možností pracoviště genetické toxikologie

STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP

Název: Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů

Část: Konvenční technika

Původ metody: Hungerford, D.A. (1965) Leucocytes cultured from small inocula of whole blood and preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. Stain Technol. 40, 333-338.

Zpracoval: RNDr. Hana Bavorová, RNDr. Dana Očadlíková

1. Předmět a vymezení působnosti

Metoda umožňuje detekci, kvalitativní a kvantitativní analýzu chromozomových abnormalit (strukturálních a numerických aberací) v savčích (lidských) buňkách *in vitro* pomocí optického mikroskopu.

2. Definice

Poškození genetického materiálu buňky (DNA), analyzované jako chromozomové aberace, je projevem biologického efektu genotoxických faktorů.

3. Princip metody

Tento cytogenetický test *in vitro* je krátkodobý test mutagenity pro detekci strukturálních a numerických aberací v kultivovaných savčích buňkách. Lze použít jak kultury stabilizovaných buněčných linií, tak primárních buněk, např. buňky čínské křečka nebo lidské lymfocyty. Po expozici testované látky s použitím i bez použití vhodného metabolického aktivačního systému se na buněčné kultury působí mitotickým jedem, např. kolchicinem, aby došlo ke kumulaci dělících se buněk (C-metafáze). Buňky jsou ve vhodné době zpracovány a jsou z nich připraveny mikroskopické preparáty. Preparáty jsou obarveny vhodným barvivem. Metafázické buňky jsou analyzovány z hlediska chromozomových abnormalit.

4. Bezpečnost práce

Metodika vyžaduje práci s:

- a) žiravinami (kyselina octová konc., chromsírová směs)
- b) ostatními jedy (kolchicin)
- c) nebezpečnými jedy (metanol)
- d) karcinogeny a mutageny (např. thiotepa cyklofosfamid, N-nitrosodimethylamin)

Dodržování zásad běžných pro práci v chemické a mikrobiologické laboratoři.

Kontakt s chemickými látkami typu mutagenů a karcinogenů.

Používání pomůcek osobní ochrany - ochranný oděv, rukavice, roušky.

Dbát na zamezení kontaminace osob i prostředí při práci s rozpouštědly, s nebezpečnými chemickými látkami, s infekcí, včetně likvidace odpadu.

5. Chemikálie a spotřební materiál

Pro použité chemikálie je požadována kvalita čistoty p.a. nebo reagent grade.

• **Základní chemikálie**

Metanol	p.a., Lachema, Brno
Kyselina octová, 99 %	p.a., Lachema, Brno
Chlorid draselný	p.a., Merck
Glutamin, 3 %	p.a., Sevapharma
Colchicin pulv.	reagent gr., Calbiochem, USA
Phytohaemagglutinin HA 15	reagent gr., Murex, GB
Kyselý uhličitan sodný, 7.5 %	reagent gr., Sevapharma
Thiotepa, 15 mg	injekce, Lederle, Německo
Cyklofosfamid, 200 mg	injekce, Orion, Finland
N-Nitrosodimethylamin	reagent gr., Merck, USA
Deionizovaná voda	SZÚ, Millipore
Chromsírová směs	SZÚ
Kofaktory pro MAS (viz dále):	
NADP	Sigma
G-6-P Sigma	Lachema
MgCl ₂	Lachema
KCl	Lachema
Na ₂ PO ₄	Lachema

• Roztoky

Médium pro kultivaci buněk - RPMI 1640 - 5x konc. Sevapharma	uchovávat při 4°C – 10°C
Bovinní sérum pro TK Bioveta Ivanovice	uchovávat při minim. –20°C, po rozmražení spotřebovat do 1 měsíce
glutamin 3 %	uchovávat při 4°C – 10°C po naředění spotřebovat do 1 měsíce
NaHCO ₃ 7.5 %	uchovávat při 4°C – 10°C otevřenou ampuli neuchovávat
PHA - HA 15	uchovávat při 4°C – 10°C po naředění spotřebovat do 1 měsíce
zásobní roztok kolchicinu	10 mg rozpustit v 10 ml fyziol. roztoku, uchovávat při 4°C – 10°C uchovávat do spotřebování
pracovní roztok kolchicinu	0,05 ml zásobního roztoku do 10 ml fyziol. roztoku, neuchovávat
0.55 % roztok chloridu draselného (hypotonizační roztok)	0,55 g KCl rozpustit ve 100 ml deionizované vody, při 37°C uchovávat do spotřebování
H ₂ O : kys. octová : metanol (fixační roztok č. 1)	92 ml : 5 ml : 3 ml neuchovávat
metanol : kys. octová (fixační roztok č. 2)	3 díly : 1 dílu neuchovávat
Sörensenův pufr, pH 6.8 SZÚ	roztok A: 1,376 g KH ₂ PO ₄ do 400 ml deionizované vody
	roztok B: 5,52 g Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O do 600 ml deionizované vody
	roztoky slít a uchovávat 4° – 10°C
5 % roztok Giemsa-Romanovski Merck	Giemsa.....5 ml Sörensenův pufr.....15 ml H ₂ O deionizovaná.....80 ml

6. Přístroje a pomocná zařízení

- Přístroje

- chladnička (4°C až 10°C)
- mraznička (od - 20°C)
- centrifuga (od 1 000 ot/min)
- termostat (37°C ± 1°C)
- třepačky
- mikroskopy (vysoká rozlišovací schopnost při zvětšení 1000 x):
 - Olympus BX 60 F; Olympus BX 40 F;
 - Olympus CHS-G-CH-2; Axiolab (Zeiss);

- Pomocná zařízení

- automatické pipety
- laboratorní sklo a plast (kultivační lahve Falcon, pipety, apod.)
- odběrové zkumavky Vacuette (Greiner) s lithium heparinem
- plynové kahany
- germicidní zářivky
- analytické váhy

7. Pracovní postup

a) odběr krve

- dezinfikovat loketní jamku Septonexem nebo Jodisolem
- do odběrové zkumavky s heparinem odebrat požadované množství krve
- jehlu na stříkačce kryt sterilním krytem a **ihned** několikrát převrátit, aby se krev dobře promíchala s heparinem a nedošlo ke sražení
- uložit do chladničky při teplotě 4°C – 10°C.

Pozor! Krev nesmí zmrznout.

pro každou osobu je vyplněna „Cytogenetická průvodka“, která je do laboratoře předána spolu s příslušnou krví a dále archivována

b) transport krve

pokud se krev transportuje z místa odběru do laboratoře, je třeba použít transportních chlazených tašek, kde je krev po dobu mezi odběrem a předáním v laboratoři udržována při teplotě 4°C – 10°C.

Kultivace

- **Biologické monitorování**

Kultivace začíná do 24 hodin po odběru krve, v mimořádných případech lze krev použít do 72 hodin po odběru. Kultivace probíhá v kultivačních nádobách v poměru 7,5 ml média a $0,6 \pm 0,2$ ml krve.

Kultivační médium pro 1 kulturu :

RPMI 1640	1,06 ml
bovinní sérum	1,80 ml
H ₂ O	4,24 ml
glutamin	0,10 ml
NaHCO ₃ 7,5%	0,16 ml
PHA HA 15	0,10 ml

Lahvičky musí být pevně uzavřeny a obsah dobře promíchán. Kultury se umístí do termostatu při teplotě $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Celková doba kultivace je 50 hodin. Dvě hodiny před koncem kultivace se přidá 0,8 ml pracovního roztoku kolchicinu, kultura se dobře promíchá a dále kultivuje v termostatu.

- **Testování genotoxicity** (OECD Guideline for the testing of chemicals, 473, July 1997)

Lidské periferní lymfocyty jsou exponovány testované látky v přítomnosti i za absence metabolického aktivačního systému (MAS)

MAS je připraven z S9 frakce jaterního homogenátu potkanů doplněného směsí kofaktorů.

Roztok testované látky a MAS se sterilizuje filtrací Milliporovým filtrem $0,45 \mu\text{m}$ nebo $0,22 \mu\text{m}$.

Pro každý experimentální bod se použijí dvě paralelní kultury. Hodnotí se 200 metafází. I když účelem testu je zjistit strukturální chromozomové aberace, je také důležité zaznamenat případné polyploidie a endoreduplikace. Současně je třeba zaznamenávat také zjištěnou cytotoxicitu v experimentálních i kontrolních kulturách.

Jako **negativní kontrola** se použije: ředidlo (H₂O, fyziol. roztok, DMSO)
metabol. aktivační systém (MAS)
neovlivněná kultura

Jako **pozitivní kontrola** se použije: přímo působící klastogen (thiotepa)
nepřímo působící klastogen
(cyklofosfamid) s MAS a bez MAS

- **koncentrace testované látky:** použijí se nejméně tři analyzovatelné koncentrace testované látky. Dochází-li k cytotoxicitě, tyto koncentrace musí pokrývat rozsah od maximální do nízké nebo nulové toxicity. To obvykle znamená, že se jednotlivé koncentrace neliší více než násobkem, který leží mezi hodnotami 2 až 3.

Nejvyšší použitá koncentrace testované látky musí inhibovat mitotickou aktivitu minimálně o 50 %. U relativně necytotoxických látek činí maximální koncentrace 5 mg/ml, 5 µl/ml nebo 0,01M.

- **doba expozice:** na proliferující buňky se působí testovanou látkou za přítomnosti i nepřítomnosti MAS. Na lymfocyty je třeba začít působit 48 hodin po stimulaci mitogenem. V hlavním experimentu se buňky vystaví testované látce s MAS i bez ní po dobu 3 – 6 hodin a vzorky se odebírají v čase, který odpovídá zhruba 1,5 násobku normální délky buněčného cyklu od začátku expozice. Pokud jsou při použití aktivačního systému i bez něho výsledky negativní, provádí se další pokus bez aktivace po dobu 1,5 násobku normálního buněčného cyklu.

- **Zpracování kultur a příprava mikroskopických preparátů**

1. Centrifugace kultury 3 min při 2 000 ot/min
2. Přidat cca 10 ml hypotonizačního roztoku, nechat stát 10 min při lab. teplotě
3. Centrifugace 3 min při 2 000 ot/min
4. Přidat cca 5 ml fixačního roztoku č. 1
5. Centrifugace 3 min při 2 000 ot/min
6. Přidat cca 5 ml metanolu
7. Centrifugace 3 min při 2 000 ot/min
8. Přidat cca 5 ml fixačního roztoku č. 2
9. Centrifugace 3 min při 2 000 ot/min
10. Po slítí supernatantu sediment dobře promíchat a nakapat 4 – 6 kapek na mokré vychlazené podložní sklo. Od každé kultury kapat 2 skla

Po každé centrifugaci supernatant slít a sediment důkladně resuspendovat.

- **Barvení preparátů**

Po usušení skel volně na vzduchu barvíme preparáty 5 % roztokem Giemsa - Romanovski :

Giemsa	5 ml
dest. H ₂ O	80 ml
Sörensenův pufr	15 ml

Doba barvení je 4 – 5 minut, poté preparáty důkladně opláchneme pod tekoucí vodou.

Předmytá podložní skla jsou uchovávána v chromsírové směsi. Před použitím jsou skla jednotlivě promyta pod tekoucí vodou , naložena do destilované vody a vychlazena v chladničce.

- **Mikroskopická analýza**

Chromozomové aberace se hodnotí v mikroskopu při zvětšení 1 000x pod imerzním olejem pro fluorescenci. Hodnotí se mitosy s 46 ± 2 centromerami.

- **gap:** jako gap je hodnoceno porušení kontinuity jedné nebo obou chromatid, je-li mezera přerušené chromatidy stejná nebo menší než je šířka dané chromatidy. *Různě intenzivní projasnění chromatid se objevuje v případech sekundární konstriktce u chromozomů č. 1, 9 a 16. Při použití teplého (více než 20⁰ C) Sörensenova pufru.se mohou objevovat světlé proužky.*
- **zlom:** jako zlom je hodnoceno porušení kontinuity jedné nebo obou chromatid, nastane-li některý z těchto případů:
 - mezera přerušené chromatidy je větší než její šířka
 - fragment dislokovaný mimo osu chromatidy
 - výrazně kratší jedna chromatida (delece)
- **fragment (zlom):** jednoduchý nebo dvojité, část chromozomu bez centromery
- **kruhový fragment:** je kulovitá část chromatidy (o průměru stejném nebo větším než je šířka chromatidy).
- **minute:** je kulovitá část chromatidy (o průměru menším než je šířka chromatidy).
- **chromatidové výměny** (symetrické, asymetrické)
- **chromozomové výměny:**

- **dicentrický chromozom** plus 0-2 dvojité fragmenty
- **translokace**
- **prsténčitý chromozom (ring)**
- **endoreduplikace:** homologní chromozomy leží těsně u sebe
- **polyploidní buňka:** počet centromer je vyšší než 3 a vícenásobek haploidní sady (23 chromozomů)
- **aneuploidní buňka:** metafáze, kde je vyšší nebo nižší počet chromozomů než 46.

Neanalyzují se:

- nedostatečně nebo nestejně obarvené a přebarvené metafáze
- metafáze s nedostatečně oddělenými chromatidami
- prometafázické chromozomy
- pozdní metafáze (chromatidy jsou v centromeře od sebe odděleny)
- nedostatečně rozprostřené metafáze (chromozomy se překrývají)
- splývající metafáze (nelze odlišit který chromozom patří do které metafáze)
- mechanické poškození chromozomů (vzniklé při zpracování nebo poškrábáním nátěru)
- metafáze, které mají jiný počet centromer než 46 ± 2

Kategorie poškození chromozomů:

G1, Z1, V1: chromatidový gap, zlom, výměna (symetrická nebo asymetrická)

G2, Z2, V2: chromozomový (isochromatidový) gap, zlom, výměna (polycentrické chromozomy, translokace, ringy)

Aberantní buňky: buňky obsahující Z1, Z2, V1, V2

fragmentace jednoho nebo více chromozomů

Gapy: nezapočítávají se do aberantních buněk

Endoreduplikace: nezapočítávají se do aberantních buněk

Zásady pro výpočet počtu zlomů na buňku (Z/B):

- Z1, Z2 = 1 zlom
- V1, V2 = 2 zlomy
- 1 – 2 párové fragmenty v buňce s dicentrickým chromozomem se nezapočítávají do Z/B
- fragmentace se nezapočítávají do Z/B

8. Rušivé vlivy

kontaminace vzorků, médií a laboratorního nádobí

sražená krev

možný výpadek elektrické energie během kultivace

lidský faktor

9. Validace metody

Používá se standardní metoda odvozená od mezinárodně normované a používané více než 30 let laboratořemi celého světa a ověřované mezilaboratorním porovnáváním.

Hungerford, D.A.: Leukocyte cultured from small inculla of whole blood and preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. *Stain. Technol.*, 40, 1965, 333-338

Savage J.R.K.: Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.*, 13, 1976, 103-122

Evans, H.J. Cytological methods for detecting chemical mutagens. *Chemical mutagens, principles and methods for their detection*, Vol. 4, Ed. A. Hollaender Plenum, New York, London (1976) pp. 1-29.

Preston, R.J. et al. Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of the Gene-Tox Program. *Mutation Research* 87:143-188 (1981).

Carrano A.V., Natarajan A.T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Res.*, 1988, 204, 379 – 406

OECD 473 Genetic Toxicology (1997): In Vitro Mammalian Cytogenetic Test

- **specifičnost** – metoda je specifická pro detekci strukturálních a numerických chromozomových aberací v savčích somatických buňkách *in vitro* a není ovlivněna žádnými ostatními složkami
- **kladná odchylka** – k odlišení falešně pozitivního výsledku slouží použití pozitivní a negativní kontroly
- **negativní odchylka** – falešně negativní výsledek hrozí při analýze technicky nekvalitních preparátů, které se ale podle Standardní metodiky nemají analyzovat
- **mez stanovitelnosti** – je dána detekcí 1 aberace
- **opakovatelnost** – těsnost shody mezi výsledky získanými opakovaným měřením za neměnných podmínek je variabilní, způsobená stochastickou distribucí buněk na mikroskopickém preparátu a nízkou frekvencí analyzovaných změn k celkovému počtu buněk (cca 1 : 10²)
- **reprodukovatelnost** - těsnost shody mezi výsledky získanými opakovaným měřením za různých podmínek je vysoká

10. Kontrola kvality a vyjadřování nejistot

Výsledky mikrobiologických vyšetření se již tradičně uvádějí bez jakýchkoli údajů o nejistotě. Hlavním důvodem je nedostupnost výsledků zkoušek na standardních materiálech. U těchto metod lze z běžně používaných charakteristik (citlivost, správnost, pravdivost, přesnost, opakovatelnost a reprodukovatelnost) s určitou spolehlivostí hodnotit pouze opakovatelnost. Tím je myšlena těsnost shody mezi výsledky opakovaných nezávislých analýz provedených stejným analytikem, na stejném vzorku, za stejných podmínek měření. Jedním z hlavních problémů při standardizování metod je nedostatek použitelných referenčních materiálů. (Kvalimetrie, Doškářová a kol., 13. Odhad nejistot chemických a mikrobiologických měření, str. 36). Komerčně vyráběný referenční materiál pro metody genetické toxikologie neexistuje. Místo něj se při hodnocení chromozomových aberací zařazuje **kontrolní vzorek Thiotepa**, který se hodnotí spolu s hodnocenými vzorky.

PRŮVODKA PRO CYTOGENETICKOU ANALÝZU PERIFERNÍCH LYMFOCYTŮ

Pořadové číslo:

Příjmení:

Rok narození:

Jméno:

Rodné číslo:

Bydliště:

Datum odběru:

pracoviště v době odběru:.....

v riziku:

ano – ne

virové onemocnění v posledních 3 měsících:

ano – ne

jiná onemocnění (jaká):.....

léky před odběrem:

ano – ne

jaké:

pravidelné, dlouhodobé užívání léků:

ano – ne

jaké:

hormonální antikoncepce:

ano – ne

alkohol 24 h před odběrem:

ano – ne

pivo, víno, tvrdý – kolik:.....

nekuřák (jak dlouho):

ano – ne

kuřák (kolik denně):

ano – ne

rtg vyšetření v posledních 3 měsících:

ano – ne

radioterapie (kdy):

ano – ne

expozice chemickým látkám v zaměstnání:

ano – ne

kdy a jakým:

práce s chemikáliemi mimo zaměstnání (barvy, postřiky):

ano – ne

kdy a s jakými:

očkování v posledních 3 měsících (jaké):

ano – ne

jiné okolnosti v posledních 3 měsících:.....

Nehodící se škrtněte

PROTOKOL O ZKOUŠCE

č.:

**CYTOGENETICKÁ ANALÝZA LIDSKÝCH PERIFERNÍCH
LYMFOCYTŮ**

KONVENČNÍ TECHNIKA

Souhrnný protokol

Pracoviště: Zadavatel:	Předmět zkoušení: Lidské periferní lymfocyty
Datum odběru:	Datum analýzy:
Druh rizika:	
Počet vyšetřených osob	
Počet analyzovaných buněk/osobu	
Průměrné % AB.B. pro skupinu	
Průměr Z/B pro skupinu	
Jiné:	
Poznámka:	
Dne:	
vedoucí laboratoře genetické toxikologie	

PROTOKOL CYTOGENETICKÉ ANALÝZY

Jméno.....	Počet G'
Datum odběru.....	Počet G''
Číslo preparátu.....	Počet Z'
Datum analýzy.....	Počet Z''
Mikroskop.....	Počet V'
Analyzoval.....	Počet V''
Počet analyzovaných buněk.....	Počet buněk s 5 a více aberacemi.....
Počet AB.B. (%).....	Počet aneuploidních buněk.....
Počet Z/B.....	Fragmentace chromozomů.....
Počet SCE/B.....	Jiné.....

Intervaly spolehlivosti

ve vztahu k rozsahu analyzovaného souboru

pro skupinové hodnocení souborů dospělých (18 - 54 r.)

[průměrná hodnota AB. B. v letech 2000 - 2006: 1.70 %, $\sigma = 1.32$, N = 1998]

Počet osob v souboru - N	95% spolehlivost	99% spolehlivost
10	0 - 2.52	0 - 2.78
20	0 - 2.28	0 - 2.46
30	0 - 2.17	0 - 2.32
40	0 - 2.11	0 - 2.24
50	0 - 2.06	0 - 2.18
60	0 - 2.03	0 - 2.14
70	0 - 2.01	0 - 2.10
80	0 - 1.99	0 - 2.08
90	0 - 1.97	0 - 2.06
100	0 - 1.96	0 - 2.04
120	0 - 1.93	0 - 2.01
140	0 - 1.92	0 - 1.99
160	0 - 1.90	0 - 1.97
180	0 - 1.89	0 - 1.95
200	0 - 1.88	0 - 1.94

Pokud zjištěná průměrná hodnota procenta AB. B. vyšetřované skupiny kritickou hodnotu přesáhne, lze prohlásit, že % AB. B. vyšetřované skupiny je významně zvýšeno na příslušné hladině statistické významnosti oproti "Referenční kontrole".

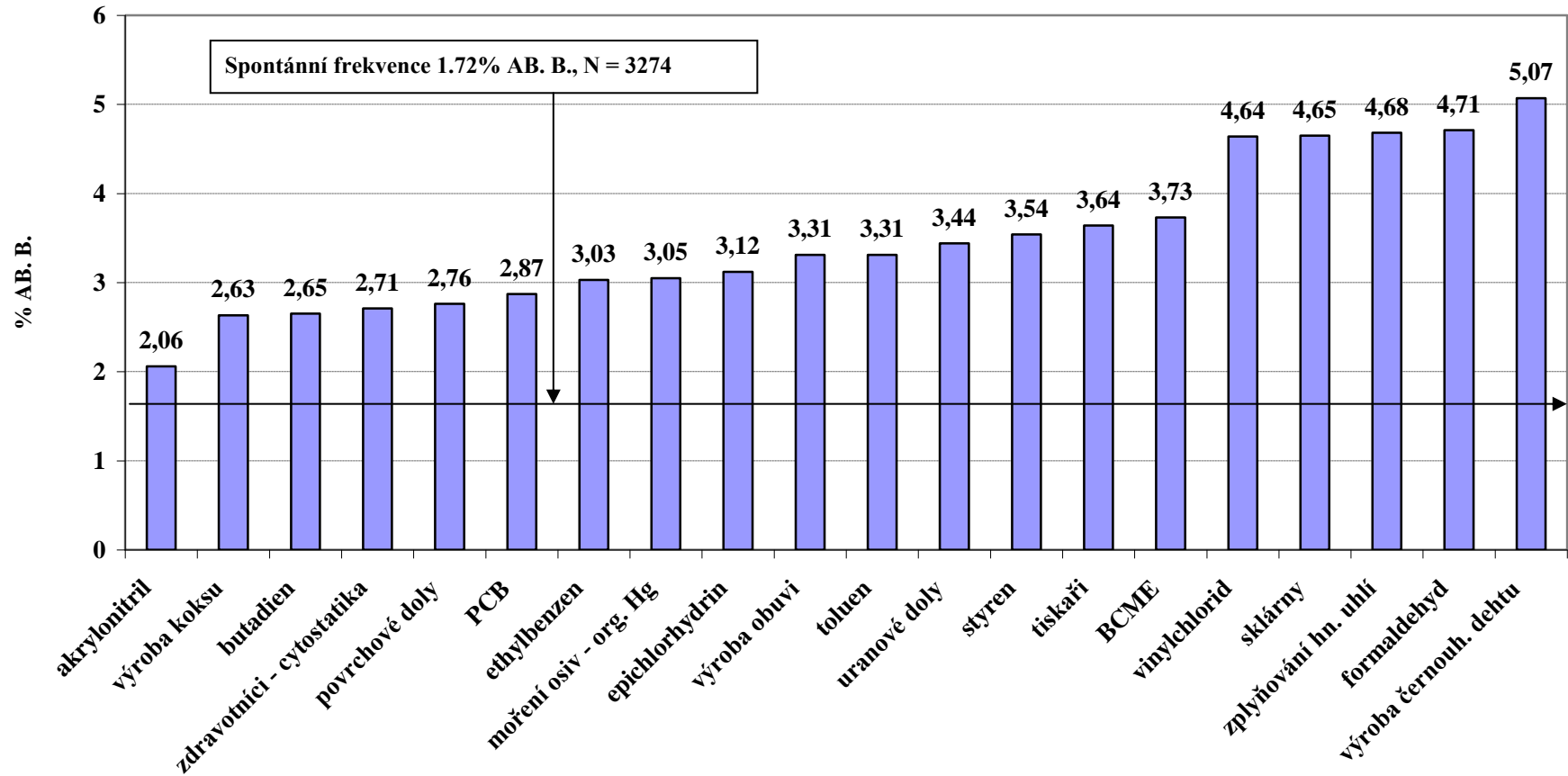
Příklad: U 28 exponovaných osob byla zjištěna průměrná hodnota 2.3 % AB. B. Od "Referenční" kontrolní hodnoty se statisticky významně liší (je vyšší) na 5% hladině významnosti (2.17 vs. 2.3), neliší se však (je nižší) na 1% hladině významnosti (2.32 vs. 2.3).

LITERATURA

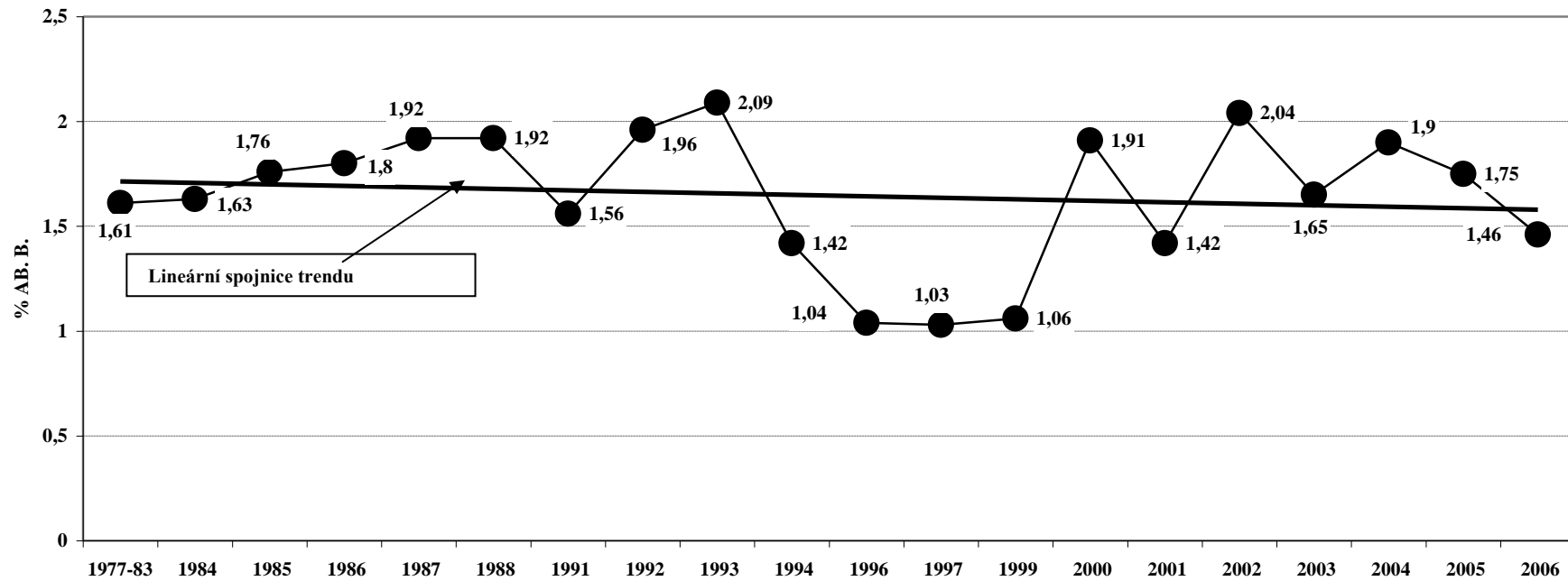
1. Šmerhovský, Z., Kauppinen, T.: CAREX – International information system on occupational exposure to carcinogens: Occupational exposure to carcinogens in the Czech Republic, Report of Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki,(2000).
2. Šmerhovský, Z., Landa, K., Rössner, P., Jůzová, D., Brabec, M., Zudová, Z., Holá, N., Pokorná, Z., Marečková, J., Hurychová, D.: Risk of cancer in an occupationally exposed cohort with increased level of chromosomal aberrations. *Environ. Health Perspect.* 109 (2001) 41-45.
3. Černá, M., Rössner, P.: Využití krátkodobých metod k monitorování genotoxických účinků faktorů životního a pracovního prostředí. *Čs. Hyg.* 33, 1988, 105-109.
4. Rössner, P., Černá, M.: Monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí. Příloha *Acta Hyg. Epidem. Microbiol.* 14, 1988, 120-127.
5. Rössner, P., Černá, M., Bavorová, H., Pastorková, A., Očadlíková, D.: Monitoring of human exposure to occupational genotoxicants. *Centr. Europ. J. Hlth.* 3, 1995, 219-223.
6. Rössner, P.: Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů v systému biologického monitorování expozice osob genotoxinům. *Hygiena* 41, 1996, č. 3, 159-166.
7. Šrám, R. J., Rössner, P., Černá, M., Koudela, K., Landa, K., Samková, I., Dobiáš, L., Paulíková, H., Janča, L.: Genetické poškození při profesionální expozici mutageny. Příloha *Acta Hyg. Epidem. Microbiol.* 1, 1981, 1-14.
8. Carrano, A. V., Natarajan, A. T.: Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat. Res.* 204, 1988, 379-406.
9. Sorsa, M., Wilbourn, J., Vainio, H.: Human cytogenetic damage as a predictor of cancer risk. Mechanism of carcinogenesis in risk identification. *IARC Scientific Publ.*, No.16, 1992, 543-554.
10. Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A. T., Norppa, H., Shuker, D. E., Tice, R., Waters, M.D., Aitton, A.: IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.* 463, 2000, 111-172
11. Brogger, A., Hagmar, L., Hansteen, I. L., Heim, S., Högstedt, B., Knudsen, L., Lambert, B., Linainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., et al. An inter-Nordic prospective study on cytogenetic endpoints and cancer risk: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. *Cancer Genet. Cytogenet.* 45, 1990, 85-92
12. Hagmar, L., Brogger, A., Hansteen, I. L., Heim, S., Högstedt, B., Knudsen, L., Lambert, B., Linainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., Reuterwall, C., Salomaa, S., Skerfving, S., Sorsa, M.: Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosome aberrations in lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage Study. *Cancer Res.* 54, 1994, 2919-2922.
13. Bonassi, S., Abbondandolo, A., Camurri, L., Dal Pra, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., Forni, A., Lamberti, L., Lando, C., Padovani, P., et al. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Genet. Cytogenet.* 79, 1995, 133-135.
14. Hagmar, L., Bonassi, S., Strömberg, U., Brogger, A., Knudsen, L., Norppa, H., Reuterwall, C.: Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res.* 58, 1998, 4117-4121.
15. Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Mikoczy, Z., Lando, C., Hansteen, I. L., Montagud, A. H., Knudsen, L., Norppa, H., Reuterwall, C., Tinnenberg, H., Brogger,

- A., Forni, A., Högstedt, B., Lambert, B., Mitelman, F., Nordenson, I., Salomaa, S., Skerfving, S.: Cancer predictive value of cytogenetic markers used in occupational health surveillance programs: a report from an ongoing study by the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Mutat. Res.* 405, 1998, 171-178.
16. Liou, S. H., Lung, J. C., Chen, Y., H., Yang, T., Hsieh, L. L., Chen, C. J., Wu, T. N.: Increased chromosome-type chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in blackfoot endemic area. *Cancer Res.* 59, 1999, 1481-1484.
 17. Bonassi, S., Hagmar, L., Strömberg, U., Huisi Montagud, A., Tinnerberg, H., Forni, A., Heikkila, P., Wanders, S., Wilhardt, P., Hansteen, I. L., Knudsen, L., Norppa, H.: Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Res.* 60, 2000, 1619-1625.
 18. Bonassi, S., Znaor, A., Norppa, H., Hagmar, L., Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Cytogenet. Genome Res.* 104, 2004, 376-382.
 19. Rössner, P., Boffeta, P., Ceppi, M., Bonassi, S., Smerhovsky, Z., Kanda, K., Juzova, D., Sram, R. J.: Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environ. Health Perspect.* 113, 2005, 517-520.
 20. Smerhovsky, Z., Landa, K., Rössner, P., Juzova, D., Brabec, M., Zudova, Z., Hola, N., Zarska, H., Nevsimalova, E.: Increased risk of cancer in radone exposed miners with elevated frequency of chromosomal aberrations. *Mutat Res.* 514, 2002, 165-176.
 21. Sram, R. J., Kuleshov, N. P.: Monitoring of the occupational exposure to mutagens by the cytogenetic analysis of human peripheral lymphocytes in vivo. *Arch. Toxicol. Suppl.* 4, 1980, 11-18.
 22. Svandova, E., Rössner, P.: The contribution to the assessment of spontaneous level of chromosomal aberration in Czechoslovak population. *Prac. Léč.* 41, 1989, 216-219.
 23. Bucton, K. E., Evans, H. J.: Methods for the analysis of human chromosome aberrations. WHO, Geneva, 1973, p.66.
 24. Carrano, A.V., Natarajan, A. T.: Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Res.* 204, 1988, 379-406.
 25. Hungerford, D. A.: Leucocyte cultured from small inocula of whole blood and preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. *Stain Technol.* 40, 1965, 333-338.
 26. Savage, R. J. K.: Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.* 13, 1976, 103-122.
 27. IPCS – Biomarkers and risk assessment: Concepts and Principles. *Environmental Health Criteria* 155, WHO, Geneva, 1993.
 28. Albertini, R. J., Nicklas, J. A., O'Neill, J. P.: Future research directions for evaluating human genetic and cancer risk from environmental exposures. *Environ. Health Perspect.* 104, suppl. 3, 1996, 503-510.
 29. Černá, M., Spěváčková, V., Čejchanová, M., Beneš, B., Rössner, P., Bavorová, H., Očadlíková, D., Šmíd, J., Kubínová, R.: Population-based biomonitoring in the Czech Republic – the system and selected results. *The Science of the Total Environment* 204, 1997, 263-270.
 30. Methods and testing strategies for evaluating the genotoxic properties of chemicals. (EUR 15945EN) Luxembourg, 1995.

FREKVENCE CHROMOZOMOVÝCH ABERACÍ PŘI PROFESIONÁLNÍ EXPOZICI
GENOTOXICKÝM LÁTKÁM V LETECH 1977 - 2006



SPONTÁNNÍ FREKVENCE CHROMOZOMOVÝCH ABERACÍ U DOSPĚLÉ POPULACE (18 - 59 r.) V LETECH 1977 - 2006



**Spontánní frekvence chromozomových aberací u populace České republiky
v letech 1977 – 2006 (% AB.B.)**

	pupečníky	5 - 6 r.	7 - 15 r.	16 - 18 r.	19 - 54 r.
1977 - 83	-	-	-	-	1.61 N = 209
1984 - 88	-	1.12 N = 24	1.81 N = 34	2.38 N = 42	1.81 N = 1096
1989 - 93	1.11 N = 129	-	1.46 N = 162	1.29 N = 120	1.87 N = 339
1994 - 99	1.11 N = 634	0.59 N = 110	1.14 N = 1882	1.19 N = 228	1.1 N = 1801
2000 - 06	-	-	1.23 N = 693	-	1.7 N = 1998