



## PROMJENE U DIFERENCIJALNOJ KRVNOJ SLICI KOD PROFESIONALNO IZLOŽENIH OSOBA DJELOVANJU BENZENA

Esad Burgić

### SAŽETAK

Korištenjem diferencijalne krvne slike (DKS) – optička metoda, kao parametra u sistematskom pregledu radnika koji rade na proizvodnji benzena i njegovih homologa, možemo procijeniti napredovanje mijelosupresije uzrokovane benzenom i njegovim homolozima tokom određenog vremenskog perioda. Cilj rada je utvrditi prisustvo elemenata diseritocitopoeze, disgranulocitopoeze, distrombocitopoeze u perifernom razmazu krvi kod profesionalno izloženih osoba djelovanju benzena. Kao materijal za istraživanje je uzeta puna krv sa EDTA u laboratoriju JZU DZ Lukavac za vrijeme sistematskog pregleda radnika koji rade sa sirovim benzenom u Global Ispat koksnoj industriji Lukavac, i uzorci krvi nastavnog osoblja Javne ustanove Gimnazija Lukavac, kao kontrolni. Uzorcima krvi uzete sa EDTA po standardiziranom postupku je urađena optička diferencijalna krvna slika (periferni razmaz), bojena po metodi May Grüenvald – Giemsa i preparati analizirani na mikroskopu Leica 1000 pod povećanjem 100/1,25. Kod radnika u proizvodnji benzena su promjene u diferencijalnoj krvnoj slici signifikantno češće nego kod kontrolne grupe ispitanika, što dokazuje mielosupresivno dejstvo benzena i njegovih homologa. Promjene u DKS ispitivane grupe se registruju od najkraće do najduže ekspozicije, stim da je u skupini sa akspozicijom >20 godina broj najveći. Promjene u DKS ispitivane grupe u periodu 2008 – 2011, pokazuje veću učestalost u periodu 2011. 2008 je bilo 11 ili 27,5% patološki nalaza, a 2011 je bilo 32 ili 80% patoloških nalaza, što je dokaz postepenog mielosupresivnog dejstava benzena. Preporučuje se uvođenje optičke diferencijalne krvne slike u obavezni program pretraga prilikom sistematskog pregleda radnika koji rade na proizvodnji benzena i njegovih homologa.

### UVOD

Zbog dokazanog kancerogenog dejstva benzena, prvenstveno mielosupresivnog, radnici u proizvodnji koksa podliježu obaveznim sistematskim pregledima, a prema zakonima iz oblasti zaštite na radu u Bosni i Hercegovini, sistematski pregled podrazumjeva rad sljedećih testova: laboratorijski standard (krva slika, sedimentacija, glukoza u krvi, urea u krvi, urin), retikulocite, enzimatiski testovi za jetru, kreatinin, klirens kreatinina, vrijeme krvarenja i protrombinsko vrijeme (1,2,3). Među ovim, zakonom propisanim testovima, nije predviđena diferencijalna krvna slika (DKS). Benzen dijeluje mielosupresivno na koštanu srž te izaziva hiperplaziju, hipoplaziju i displazije. Studija koja je objavljena 2010 godine, a koju je radio Abdul Khalada i saradnici iz Insituta za medicinu rada i okoliša fakulteta Sveučilišta u Birminghamu u Velikoj Britaniji, a obuhvatala je sistematski pregled

**Autor za korespondenciju:**  
**Mr. sc. Esad Burgić, dipl.ing. MLD**  
**Privatni medicinsko biohemijski laboratorij**  
**EsoLab lukavac**  
**Tel. 38762/750-301**  
**Email: esadburgic@hotmail.com**



svih radova objavljenih na ovu temu od 1950 do Jula 2009 godine, u rezultatima između ostalog navode da u skladu izloženosti benzenu na radnom mjestu su prisutni svi mogući prelazi od teških hipoplazija do pojave ekstrapredularne hematopoeze. Mielosupresivni efekat benzena se manifestuje displastičnim promjenama na sve tri krvne loze, što se može ilustrirati promjenom odnosa broja i morfoloških promjena zrelih krvnih elemenata u perifernoj krvi. Diferencijalna krvna slika je brz i ekonomičan pregled koji daje uvid u promjene nastale u koštanoj srži.

Obzirom da benzen ima kumulativno dejstvo na hematopoezu te promjene koje prouzrokuje u hematopoezi karakteriše dug latentni period, te se simptomi bolesti mogu javiti čak godinama poslije prekida ekspozicije.

Hronična izloženost benzenu je u pogledu toksičnosti, sa aspekta hematopoeze usmjerena prema koštanoj srži i perifernim krvnim ćelijama. Izloženost benzenu je povezana sa aplastičnom anemijom, mijelodisplastičnim sindromom (MDS), leukemijom i non Hodgkinovim limfomom.(4,5,6,7). Profesionalno trovanje benzenom i njegovim homolozima javlja se kod svih radova gdje se u procesu proizvodnje dolazi u dodir sa štetnom materijom te zauzimaju značajno mjesto u profesionalnoj patologiji. (8,9,10)

**Materijal i metode:** Kao materijal za istraživanje je uzeta puna krv sa EDTA po standardiziranom postupku u laboratoriju JZU Dom zdravlja Lukavac u periodu od 01.03. – 31.03. 2008 i 01.03. – 31.03.2011 godine, za vrijeme sistematskog pregleda radnika koji rade sa sirovim benzenom i njegovim homolozima u Global Ispat koksnoj industriji – Lukavac, i uzorci krvi nastavnog osoblja Javne ustanove Gimnazija Lukavac, kao kontrolni. U istraživanje je uzeto 80 uzoraka krvi, koji su obrađeni u laboratoriju Doma zdravlja Lukavac. Uzorci su podijeljeni u dvije grupe prema vrsti posla koji rade: Grupa A, ispitivana grupa - radnici koji rade na poslovima sa sirovim benzenom i njegovim homolozima, 40 uzoraka. Grupa B, kontrolna grupa - nastavno osoblje koje radi u Gimnaziji Lukavac, 40 uzoraka. Prema vremenu analiza, istraživanje je sprovedeno u dva perioda: sa uzorcima podgrupa. *Podgrupa a:* uzorci iz 2008 godine. *Podgrupa b:* uzorci iz 2011 godine.

**Metode istraživanja:** Ispitanici su birani metodom slučajnog izbora, te su dobrovoljno učestvovali u analizi. Uzorci su bili, puna venska krv uzeta u vacuetu sa EDTA 3 ml po standardiziranom postupku, je urađena optička diferencijalna krvna slika (periferni razmaz), bojen po metodi May Grünvald – Giemsa i preparati analizirani na mikroskopu Leica 1000 pod povećanjem 100/1,25 (imerzija).

**Statistička obrada rezultata istraživanja:** Provedena je računalnim programom Statistical Package for Social Sciences for Windows, v.18.0 PASW-SPSS Inc., Chicago, IL, USA. Numerički podaci su prikazani putem mjera centralne tendence i odgovarajućih mjera disperzije. Za testiranje hipoteze između dvije grupe, koncept nezavisnih uzoraka, upotrebljen je T-test i Mann-Whitney-test, ako je uočena diskrepanca u distribuciji. Za testiranje razlike u ponavljanoj mjerenoj, koncept zavisnog uzorka urađen je parni T-test ili Wilcoxon test ovisno o normalnosti distribucije. Za analizu učestalosti upotrebljen je Hi-kvadrat test. Za ispitivanje uticaja dva faktora na rezultujuću varijablu urađena je dvofaktorska ANOVA. Rezultati su pregledno prikazani tabelarno i grafikonima. Za statističku značajnost vrijednosti "p" odabran je uobičajeni nivo značajnosti "p < 0,05".

**Tip istraživanja i etički aspekt:** Urađeno je retrospektivno prospektivno istraživanje kliničko epidemiološkog tipa. Za učesće ispitanika u istraživanju postoji suglasnost svih učesnika istraživanja.

### Rezultati istraživanja

U obje grupe je bilo po 40 istih ispitanika, odnosno njihovih uzoraka i to u trogodišnjem intervalu, 2008 i 2011 godine. Obje grupe su bile na redovnim sistematskim pregledima i bez tegoba. Dobna distribucija ispitanika i kontrolne grupe nije imala značajne razlike. Dužina radnog staža između ispitanika i kontrole je bila ujednačena. Ispitanici i kontrola se razlikuju prema spolu. Ispitanici su bili 36 muškaraca i 4 žene, a kontrolu su činili 24 muškarca i 16 žena. Ispitanici i kontrola nisu ujednačene po spolu. Razlog za ovakvu spolnu zastupljenost je u tome što muškarci uglavnom rade na proizvodnji benzena, a žene su zastupljene kao laboratorijski radnici koji svakod-



neveno uzimaju uzorke benzena za analize. Kontrola su uposlenici u javnoj ustanovi Gimnazija Lukavac, prosvjetni radnici, a poznato je da je u prosvjeti zastupljen veći broj žena nego muškaraca. Pošto spol ne utiče na mielosupresiju i promjene u hematološkom nalazu, ovaj podatak nije relevantan za studiju.

Prema podacima iz literature mielosupresija se ogleđa u pojavi leukopenije sa vrijednostima nižim od  $4,5 \times 10^9 / L$ , uz relativnu limfocitozu.(11,15,1,17) U granulocitima se mogu naći toksične granule, kako u koštanoj srži tako i u perifernoj krvi.(11,15,16,17) U početku može da se pojavi leukocitoza  $10-20 \times 10^9/L$  a tek kasnije leukopenija.(11,19,20,21) Neutropeniju prati često eozinofilija i limfocitoza. Metamijelociti i mijelociti se rijetko viđaju u perifernoj

krvi. Smanjenje polinukleara ide i do agranulocitoze.(11,20,21,22) Ovi literarni podaci su potpuno u skladu sa našim istraživanjem. U našim rezultatima kod ispitivane grupe, prisutne su vrijednosti broja leukocita koji spadaju u leukopenije, ali i vrijednosti broja leukocita koji spadaju u leukocitoze, koji su u ovom istraživanju više zastupljene.

U diferencijalnoj krvnoj slici odnosno perifernom razmazu koji je rađen po metodi May Grünvald Giemsi prisutne su bile značajne razlike između grupa i podgrupa. U ispitivanoj grupi u periodu uzorkovanja 2008 godina bilo je 29 uzoraka sa normalnim nalazom diferencijalne krvne slike i 11 uzoraka sa patološkim elementima diferencijalne krvne slike.

Tabela 1. Nalazi diferencijalne krvne slike grupe A i podgrupa

Grupa A			podgrupa a	podgrupa b	Ukupno	
DKS (Per. razm.)	normalan nalaz	N	29	8	37	
		% DKS	78,4%	21,6%	100,0%	
	atipični limfociti	N	2	14	16	
		% DKS	12,5%	87,5%	100,0%	
	tox.gr.u neut.granul.	N	4	4	8	
		% DKS	50,0%	50,0%	100,0%	
	anizocit., hipohrom.	N	1	2	3	
		% DKS	33,3%	66,7%	100,0%	
	atyp.limf., tox.gr.u neut.granul.	N	3	8	11	
		% DKS	27,3%	72,7%	100,0%	
	megatrombociti	N	1	2	3	
		% DKS	33,3%	66,7%	100,0%	
	tox.gr.u neut.granul.,mijelocit	N	0	2	2	
		% DKS	,0%	100,0%	100,0%	
	Ukupno		N	40	40	80



U kontrolnoj grupi u periodu uzorkovanja 2008 godina nije bilo patoloških nalaza u diferencijalnoj krvnoj slici. Svih 40 uzoraka je imalo normalan nalaz. Ispitivana grupa u ispitivanom periodu 2011 godine je im-

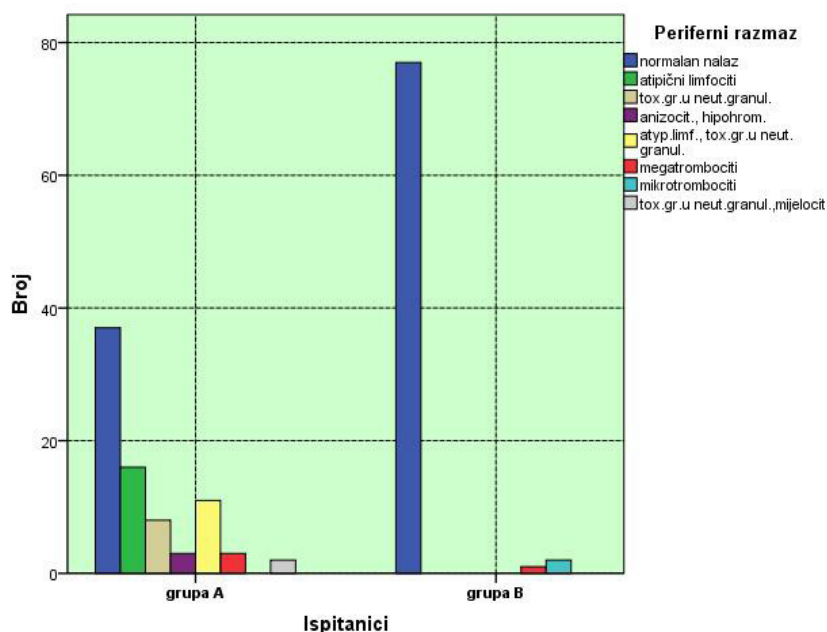
ala u 8 uzoraka normalan nalaz diferencijalne krvne slike, a u 32 uzorka su bile prisutne patološke promjene u diferencijalnoj krvnoj slici.

Tabela 2. Nalazi diferencijalne krvne slike grupe B i podgrupa

Grupa B			podgrupa a	podgrupa b	Ukupno
DKS (Per. razm.)	normalan nalaz	N	40	37	77
		% DKS	51,9%	48,1%	100,0%
	megatrombociti	N	0	1	1
		% DKS	0%	33,3%	100,0%
	mikrotrombociti	N	0	2	2
		% DKS	,0%	100,0%	100,0%
Ukupno		N	40	40	80

U kontrolnoj grupi je u ispitivanom periodu 2011 godine je bilo 37 uzoraka sa normalnim nalazom difer-

encijalne krvne slike, a 3 uzorka su imali patološke promjene u diferencijalnoj krvnoj slici.



Grafikon 1. Diferencijalna krvna slika (periferni razmaz) grupa A i B



Pearsonov Hi kvadrat test je pokazao za ispitivanu grupu vrijednost 25,85 što je statistički značajno za  $p < 0,0001$  u odnosu na izloženost i vrijeme uzorkovanja te razliku između grupa i podgrupa. Primjetne su značajne razlike u nalazima diferencijalne krvne slike u periodu uzorkovanja.

U ispitivanoj grupi je u periodu uzorkovanja 2008 godine bilo 72,5 % normalnih nalaza u diferencijalnoj krvnoj slici i 27,5 % patoloških, a u kontrolnoj grupi u istom periodu uzorkovanja je svih 40 uzoraka ili 100 % bilo normalnih nalaza diferencijalne krvne slike.

U drugom periodu uzorkovanja, 2011 godine je u ispitivanoj grupi bilo 20,6 % normalnih nalaza u diferencijalnoj krvnoj slici i 79,4 % patoloških nalaza, dok je u kontrolnoj grupi u istom periodu uzorkovanja bilo 92,5 % normalnih nalaza i 7,5 % patoloških.

U diferencijalnoj krvnoj slici odnosno u perifernom razmazu se na najočigledniji način očituju promjene uzrokovane štetnim dejstvom benzena i njegovih homologa. Literarni podaci govore da se najčešće promjene prikazuju kao karakteristika smanjene hematopoeze. (22,24,25,27,30) Prisutna je anizocitoza, leukopenija sa pojavom toksičnih granulacija u neutrofilnim granulocitima te promjene u trombocitima kao što su mega i mikrotrombociti. Široki spektar genotoksičnih efekata u limfocitima, kod radnika izloženih dejstvu benzena je dobro dokumentirana, kao što je i uloga kromosomskih efekata u karcinogenezi. Tu je i sve više dokaza o bliskom odnosu između limfoidnih tumora i vrsta tumora mieloidnog porijekla poznato da je uzrokovano benzenom. (29,30,31) Nekoliko studija koje su rađene da se utvrdi odnos između izloženosti benzenu i odgovor organizma, a koji se odnosi na hematološke efekte je utvrdilo da je veći pad u perifernoj krvnoj slici stanica bijele loze na nižim razinama izloženosti ( $< 1\text{ppm}$ ), nego na višim razinama. (18,19,32,38,39,40,41). Ovi literarni podaci su potpuno u skladu sa našim istraživanjem, stim da je u ovom istraživanju najkarakterističnija promjena bila u prisutvu atipičnih limfocita u perifernom razmazu. Nije bilo izraženog pada stanica ni jedne loze u perifernoj krvnoj slici i nego na protiv bilo je izraženo povećanje broja leukocita u odnosu na period izloženosti, te pojavu svih patoloških elemenata

u diferencijalnoj krvnoj slici koje i literatura opisuje. Upoređujući rezultate ispitivane i kontrolne grupe, te promjene hematološkog nalaza: diferencijalne krvne slike, registrovane u ispitivanoj grupi, ukazuju da se ove promjene mogu povezati sa mielosupresivnim djelovanjem benzena, pošto iste promjene nisu registrovane kod kontrolne grupe.

Na osnovu učinjene analize može se dati preporuka da se diferencijalna krvna slika i to optička metoda, uvede kao obavezan parametar prilikom sistematskog pregleda radnika koji rade na proizvodnji benzena i njegovih homologa, što dosadadašnje zakonodavstvo nije uvrstilo kao obavezu.





## LITERATURA

1. Uredba o ratifikaciji konvencije o zaštiti od opasnosti od trovanja benzenom (MOR br. 136), Službeni list SFRJ 16/76.
2. Zakon o zaštiti na radu, Službeni list SRBiH, broj 22/90.
3. Pravilnik o uslovima za utvrđivanje radnih mjesta sa posebnim uslovima rada i ljekarskim pregledima radnika na tim radnim mjestima, Službeni list SRBiH, broj 2/91.
4. Heilbronner E, Jacques J, Havrez P., Benzolformel u: *Chemie in unserer Zeit*. 32.1998,5, 256-264.
5. Šišović A., Policiklički aromatski ugljikovodici u nas. *Arh.Hig toksikol* 2000;51:89-101
6. Rožina B, *Organska hemija*. Zagreb: skripta Fakulteta poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu, 2007:34-43.
7. Nježić Z., Ačanski M. Mirjana: Ekološka crna tačka, *Hem.ind.* 2009;63(2), 75-78.
8. [www.datoteka.com/medicinski\\_leksikon/b/Benzol.html](http://www.datoteka.com/medicinski_leksikon/b/Benzol.html)
9. [www.gikil.ba](http://www.gikil.ba)
10. Arandelović M, Jovanović J. *Medicina rada, Niš: Medicinski fakultet*, 2009, str.134-137
11. Pyatt D, Hays S., A review of the potential association between childhood leukemia and benzene., *Chem Biol Interact.* 2010 Mar 19;184(1-2):151-64.
12. Berbić – Fazlagić J., *Hematologija, IP „Svjetlost“*, Sarajevo, 2006 ; str 48.
13. Bras J., *Harvardski priručnik za stil, Savremeni stavovi u dijagnostici i liječenju mijelodisplastičnog sindroma*, Harvard, 2007; volumen 35, br, 4; str 195 – 208.
14. Labar B, Hauptman E, *Hematologija*. Zagreb: Školska knjiga, 1998:75-9
15. Bennett JM, et al. Proposal for the classification of myelodysplastic syndromes (FAB cooperative group). *Br J Haematol* 1982; 51:189-99.
16. Swerlow SH, et al. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008:89.
17. Khalade A, et al. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis, *Environ Health.* 2010, 9: 31.
18. Ljubić N, Uloga adhezijskih molekula i izvanstanične potke u mijelodisplastičnom sindromu. *Doktorska disertacija*, Sveučilište u Zagrebu, 2010; 14-17.
19. Bennett JM, et al. *The myelodysplastic syndromes. Pathobiology and Clinical Management*. New York: Marcel Decker, 2002;124.
20. List AF, et al. Myelodysplastic syndromes. *Haematology Am Soc Hematolo Educ Program* 2004;297-314.
21. Heaney ML, Golde DW. Myelodysplasia. *N Engl J Med* 1999;340:1649-60.
22. Le Beau MM, Olney HJ. The cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:479-95.
23. Ibrulj S., i sar. *Citogenetičke metode, primjena u medicini*, Ingeb, Sarajevo, 2008;98-108.
24. Ibrulj S, Haverić S, Haverić A. Chromosome aberrations as boindicators of environmental Genotoxicity. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 7 (4), 2007:311-316.
25. Ibrulj S, Haverić S, Haverić A. Complementarity of standard citogenetic assays. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 8 (1), 2008:27-33.
26. Kasim B, i sar. *Uvod u genetičko inženjerstvo*, Ingeb, Sarajevo, 2005:121-136.
27. Rosenfeld C, List A. A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastics syndromes: implications for new therapies. *Leukemia* 2008;14:2-8.
28. Nolte F, Hoffman WK. Myelodysplastics syn-



- dromes; molecular pathogenesis and genomic changes. *Am Hematol* 2008;87:777-95.
29. Zhiying Ji, et al. The benzene metabolite, hydroquinone and etoposide both induce endoreduplication in human lymphoblastoid TK6 cells, *Mutagenesis*. 2009 ; 24(4): 367–372.
- 30 Smith MT., Advances in understanding benzene health effects and susceptibility., *Rev Public Health*. 2010 Apr 21;31:133-48 2.
31. David B, Temporal Variation in the Association between Benzene and Leukemia Mortality, *Health Perspect*. 2008 March; 116(3): 370–374.
32. Cliona M. McHale, et al. Changes in the Peripheral Blood Transcriptome Associated with Occupational Benzene Exposure Identified by Cross-Comparison on Two Microarray Platforms, *Genomics*. 2009 April; 93(4): 343–349.
33. Kawasaki Y, et al. Benzene-Induced Hematopoietic Neoplasms Including Myeloid Leukemia in Trp53-Deficient C57BL/6 and C3H/He Mice, *Toxicol Sci*. 2009 August; 110(2): 293–306.
34. Matthew S, et al. Biomarkers by Microarray Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cell Gene Expression in Benzene-Exposed Workers, *Environ Health Perspect*. 2005 June; 113(6): 801–807.
35. Khan HA, Short Review: Benzenes toxicity: a consolidated short review of human and animal studies, *Human and Experimental Toxicology*, September 1, 2007; 26(9):677-685
36. Vassilios M., Evangelos C., Case report: hydroquinone and/or glutaraldehyde induced acute myeloid leukaemia, *Occup Med Toxicol*. 2006; 1: 19.
37. Duraković Z., Krvotvorni organi u: *Medicina rada i okoliša*, Medicinska naklada, Zagreb 2002. str. 498-506.
38. Gun RT, et al., Update of mortality and cancer incidence in the Australian petroleum industry cohort, *Occup Environ Med*. 2006 July; 63(7): 476–481.
39. Zhiying Ji, Luoping Zhang, 2009, The benzene metabolite, hydroquinone and etoposide both induce endoreduplication in human lymphoblastoid TK6 cells, *Mutagenesis*. 2009 July; 24(4): 367–372.
40. Codispoti K., Depalma L., Myelodysplastic syndrome in elderly patients: correlation of CBC with cytogenetic and FISH analysis, *Int J Lab Hematol*. 2010 August 1;32(4):443-448.
41. Nakić M. Citologija-dijagnostičke i prognostičke mogućnosti u malignim oboljenjima djece, *Pediatr. Croat*. 2006;50(Supl 1):167-175.



## **CHANGES IN THE DIFFERENTIAL BLOOD PICTURE IN PERSONS OCCUPATIONALLY EXPOSED TO BENZENE**

Burgić E.

### **ABSTRACT**

By using the differential blood count (DKS) - an optical method, as a parameter in a systematic examination of workers working on the production of benzene and its homologues, we can assess the progression of myelosuppression caused by benzene and its homologues over a certain period of time. Aim fo the study was to determinethepresenceofelements of dyserythrocytopoiesis, dysgranulocytopoiesis, and dysthrombocytopoiesis in the peripheral blood smear of persons professionally exposed to the effects of benzene. As material for research, whole blood with EDTA was taken in the laboratory of JZU DZ Lukavac during a systematic examination of workers who work with raw benzene in the Global Ispat coke industry Lukavac, and blood samples from the teaching staff of the Public Institution Gimnazija Lukavac, as a control. Blood samples taken with EDTA according to a standardized procedure were subjected to an optical differential blood count (peripheral smear), stained according to the May Grünvald - Giemsa method, and the preparations were analyzed on a Leica 1000 microscope under a magnification of 100/1.25. Among workers in the production of benzene, changes in the differential blood count are significantly more frequent than in the control group of subjects, which proves the myelosuppressive effect of benzene and its homologues. Changes in the DKS of the examined group are registered from the shortest to the longest exposure, with the largest number in the group with exposure >20 years. Changes in the DKS of the examined group in the period 2008 - 2011, shows a higher frequency in the period of 2011. In 2008, there were 11 or 27 .5% of pathological findings, and in 2011 there were 32 or 80% of pathological findings, which is evidence of the gradual myelosuppressive effect of benzene. It is recommended to introduce the optical differential blood count in the mandatory examination program during the systematic examination of workers who work on the production of benzene and its homologues.

### **Corresponding author:**

**Esad Burgić**

**Private medical biochemical laboratory**

**EsoLab Lukavac**

**Tel. 38762/750-301**

**Email: esadburgic@hotmail.com**