

ADAM KROGULSKI, MARLA BORKOWSKA

METODA OZNACZANIA AKTYWNOŚCI MUTAGENNEJ SUBSTANCJI
SMOŁOWYCH ZAWARTYCH W PYŁACH POWIETRZA
ATMOSFERYCZNEGO

THE METHOD OF TESTING OF THE MUTAGENIC ACTIVITY OF COAL TAR IN
ATMOSPHERIC DUST

Zakład Higieny Komunalnej, Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: doc. dr hab. S. Maziarka

W pracy przedstawiono metodę oznaczania aktywności mutagennej ekstraktu cykloheksanowego pyłów powietrza atmosferycznego. Użyto zmodyfikowanego testu somatycznej mutacji i re-kombinacji u muszki owocowej (SMART).

W środowisku znajduje się wiele tysięcy substancji wykazujących działanie mutagenne lub potencjalnie rakotwórcze [9]. Ich obecność jest najczęściej wynikiem działalności człowieka. Dla oceny zagrożenia zdrowia człowieka ważna jest ocena aktywności mutagennej zanieczyszczeń obecnych w środowisku. Jest to również bardzo istotne dla oceny szkodliwości poszczególnych źródeł emisji zanieczyszczeń.

Szczególnie ważne znaczenie mają zanieczyszczenia obecne w powietrzu atmosferycznym [2, 6, 10]. Liczne substancje zanieczyszczające powietrze zaabsorbowane są na pyłe. Stanowią one mieszaninę kilkuset związków chemicznych, spośród których pod kątem działania mutagennego i rakotwórczego przebadano tylko niewielką ich część. Działanie rakotwórcze udowodniono zaledwie dla kilkunastu z nich [5].

Wiele substancji obecnych w środowisku oddziałują synergicznie na organizmy ludzkie i zwierzęce, dlatego mieszaninę zanieczyszczeń występujących w powietrzu należy badać jako całość, a nie traktować jej jako sumę poszczególnych substancji.

Dotychczas dla oceny zagrożenia stosowano metody analizy chemicznej pozwalające na wykrycie obecności substancji o znanej aktywności mutagennej i rakotwórczej. Wykorzystywano również badania aktywności mutagennej przy użyciu testów bakteryjnych, najczęściej testu *Ames'a*. Jednak przy użyciu organizmów prokariotycznych, o porównywalnej z testem (SMART) cenie, ocena zagrożenia zdrowia człowieka jest mniej precyzyjna. Metody z użyciem innych organizmów eukariotycznych niż muszka owocowa lub hodowli tkankowych są znacznie droższe i wymagają bardziej skomplikowanego wyposażenia laboratorium.

Celem niniejszej pracy było opracowanie precyzyjnej metody oznaczania aktywności mutagennej mieszaniny zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego, łączącej zalety metod wyżej wymienionych przy równoczesnym wyeliminowaniu ich wad i ograniczeń.

MATERIAŁ I METODYKA

W pracy użyto muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*). Samice pochodziły ze szczepu mwh, a samce ze szczepów flr³/TM3, Ser oraz ORR; flr³/TM3, Ser. Ten ostatni szczep został specjalnie wyhodowany do badania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), np. benzo(a)pirenu B(a)P i benzo(a)atracenu B(a)A, będących promutagenami. Szczepy rodzicielskie pochodziły z Instytutu Toksykologii ETH i Uniwersytetu w Zurychu. Szersze informacje o wykorzystanych w pracy szczepach można znaleźć w pracach *Grafa i wsp.* [3,4]^{*)}.

Hodowle muszek prowadzono i doświadczenia wykonywano w temperaturze 25°C i przy wilgotności powietrza około 60%.

Użyte odczynniki: cykloheksan cz. d. a., chloroform do spektroskopii, stabilizowany etanolem f-my Merck, Tween 80 f-my Aldrich, etanol 96% cz. d. a., sucha pożywka dla *Drosophila melanogaster* – Instant Medium, f-my Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC, USA.

Sposób pobierania próbek oraz ekstrakcja substancji smołowych były zgodne z metodyką opracowaną w Państwowym Zakładzie Higieny dla laboratoriów Stacji Sanitarно-Epidemiologicznych [7].

Próbki pyłu pobierano na filtry z włókna szklanego za pomocą aparatów „Staplex”, filtrowano około 2000m³ powietrza z szybkością ok. 1,5 m³/min. Czas poboru próbki wynosił 24 godziny. Filtry z pyłem poddawano ekstrakcji cykloheksanem w aparacie *Soxhleta* w temp. 80°C w ciągu 10 godzin. Po zakończonej ekstrakcji cykloheksan odparowywano w temperaturze pokojowej. Uzyskane substancje smołowe suszono do stałej masy w temp. 40°C, a następnie rozpuszczano w takiej ilości chloroformu, aby do jednego badania użyć 3 ml roztworu. Roztwór substancji badanych dodawano do wody z zawartością 4% Tweenu 80 i 8% etanolu, a następnie poddawano działaniu ultradźwięków w celu uzyskania emulsji. Badania biologiczne prowadzono po całkowitym odparowaniu chloroformu. Podłoże, na które nanoszono larwy muszek, stanowiła emulsja utarta ze stałym podłożem.

W jednej hodowli zawierającej około 80 larw znajdowało się 15 mg substancji smołowych w postaci 1,8 ml emulsji wymieszanej z 0,5 g stałego podłoża.

W hodowlach kontrolnych stosowano:

- wodę ze studni głębinowej 1,8 ml + 0,5 g suchego podłoża;
- wodę ze studni głębinowej 1,7 ml z dodatkiem 4% Tweenu 80 (około 0,07 ml) i 8% etanolu (około 0,14 ml);
- do naczynia, w którym odparowano 3 ml chloroformu dodawano 4% Tweenu 80 (około 0,07 ml) i 8% etanolu (około 0,14 ml);
- w hodowlach będących kontrolą pozytywną ekstrakt substancji smołowych zastępowano benzo(a)pirenem o stężeniu 0,2mM (około 0,085 mg w 1,8 ml).

Wszystkie próbki kontrolne, równoległe z próbkami badanymi, poddawano działaniu ultradźwięków. Larwy z krzyżówki mwh × flr³/TM3, Ser w wieku 48 godzin nanoszono na podłoże badane, larwy z krzyżówki mwh × ORR; flr³/TM3, Ser w wieku 72 godzin. Po uzyskaniu postaci imago, muchy usypiano i przechowywano w 70% etanolu. Ze skrzydeł osobników będących heterozygotami mwh+/flr (mających krój skrzydeł taki sam jak szczep mwh) wykonywano preparaty mikroskopowe. Analizy preparatów dokonywano zgodnie ze wskazówkami *Grafa i wsp.* (3). Za podstawę oceny aktywności mutagennej przyjęto ilość mutacji s – obejmujących jedną, dwie komórki. Do statystycznego opracowania wyników stosowano test χ^2 w wersji polecanej przez *Freia i Würglera* [1].

W serii badań wstępnych dobierano optymalne parametry testu obejmujące:

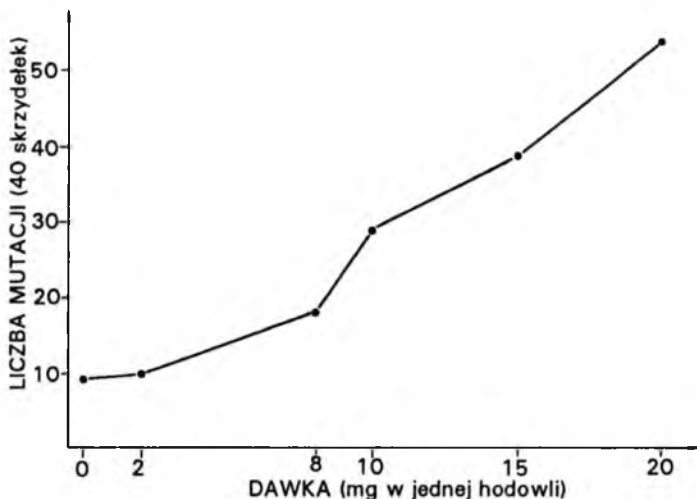
- stężenie ekstraktu cykloheksanowego z pyłu zawieszonego w powietrzu,
- zawartość emulgatorów w hodowli larw,
- wiek larw nanoszonych na podłoże z substancjami badanymi
- typ mutacji, pozwalający na uzyskanie maksymalnej czułości i precyzji badania.

^{*)} Autorzy składają serdeczne podziękowania prof. dr U. Grafowi z Instytutu Toksykologii ETH i Uniwersytetu w Zurychu za udostępnienie wykorzystanych w pracy szczepów muszek.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

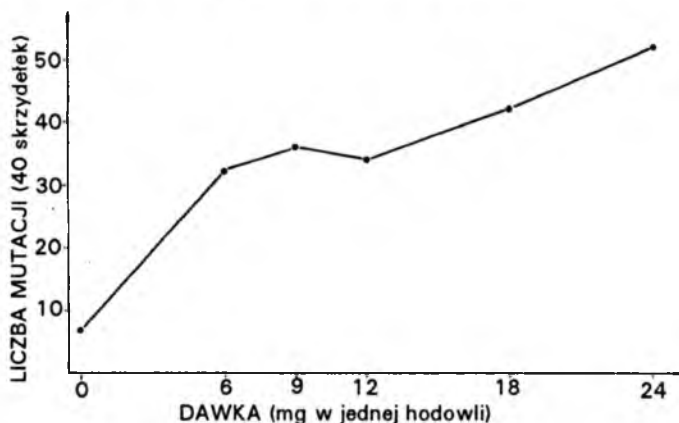
Wyniki badań przedstawiające zależność liczby mutacji od stężenia substancji smołowych w pożywce larw przedstawiono na ryc. 1 i 2.

Do dalszych badań wybrano dawkę 15 mg ekstraktu cykloheksanowego w 1,8 ml emulsji. W hodowli o takim stężeniu substancji badanych ponad 90% larw ulega przekształceniu w postać imago, przy większych stężeniach (ponad 20–25 mg/1,8 ml emulsji) procent wylęgających się muszek maleje.



Ryc. 1. Larwy 72 godzinne ($mwh \times ORR; flr^3$) na pożywce z różną zawartością substancji smołowych. Zakres istotnych zmian 8–20 mg.

The larvae in age 72 hour ($mwh \times ORR; flr^3$) on medium contents different quantity coal tar. The range 8–20 mg results of test was positiv.



Ryc. 2. Larwy 48 godzinne ($mwh \times flr^3$) na pożywce z różną zawartością substancji smołowych. Zakres zmian istotnych 6–24 mg.

The larvae in age 48 hour ($mwh \times flr^3$) on medium contents different quantity coal tar. The range 6–24 mg results of test was positiv.

Dla 30–40 mg/1,8 ml emulsji tylko około 20–30% larw osiąga postać imago. Ilość mutacji dla tak wysokich stężeń ekstraktu cykloheksanowego wahała się w granicach 55–65 na 40 skrzydełek i nie wykazywała istotnej statystycznie zależności od stężenia substancji badanych. Ponieważ giną muszki u których zachodzi najwięcej mutacji, funkcja opisująca zależność dawka-odpowiedź dąży asymptotycznie do linii poziomej. Zmniejsza to możliwość zróżnicowania aktywności mutagennej między próbami. Równocześnie rozrzut wyników dla równych dawek rośnie. Również przy niższych dawkach substancji badanych (poniżej 10–12 mg/1,8 ml emulsji) powtarzalność wyników maleje. W przypadku obu szczepów dawka 15 mg ekstraktu znajduje się na liniowym odcinku funkcji dawka-odpowiedź, co daje maksymalną możliwość uzyskania wyników istotnie różnych dla kolejnych próbek badanych.

W przypadku dawki 15 mg substancji smołowych liczba mutacji w czterech kolejnych powtórzeniach z tej samej próbki wynosiła: 39, 36, 41, 42, $\bar{x} = 39,5 \pm 2,3$

W zależności od ilości mutacji (20 – 60) w preparacie z 40 skrzydełek, aby różnica była istotna, musi wynosić od 15 do 20 mutacji. Do wybranej dawki 15 mg substancji smołowych w wyniku licznych prób dobrano doświadczalnie ilość dodawanych do wody emulgatorów (4% Tween-u 80 i 8% etanolu). Ilość ta pozwala na całkowity i stosunkowo szybki przebieg mutacji, a równocześnie ilość mutacji w próbkach kontrolnych pozostaje na stosunkowo niskim poziomie.

Wiek używanych w badaniu larw wiąże się z czasem ekspozycji na substancje badane. Dla larw 72 i 48 godzinnych przybliżony czas ekspozycji wynosi odpowiednio 2 i 3 doby. Między innymi od czasu ekspozycji zależy ilość mutacji w próbkach kontrolnych (bez mutagenów) i w próbkach badanych. Wzajemny stosunek mutacji w tych próbkach ma wpływ na czułość metody i istotność różnic między pomiarami.

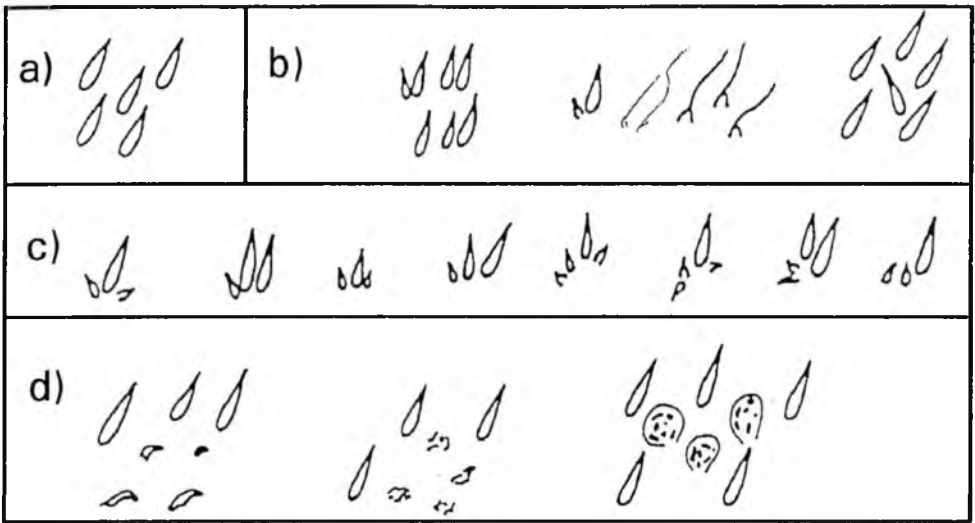
U muszek owocowych używanych w teście somatycznej mutacji i rekombinacji (SMART) występują trzy rodzaje mutacji typowych dla użytych krzyżówek (ryc. 3).

Można liczyć wszystkie mutacje razem, lub osobno mutacje s – obejmujące jedną lub dwie komórki, mutacje l – obejmujące więcej niż dwie komórki oraz mutacje tw – mutacje mwh i flr występujące obok siebie (3). Po zestawieniu wyników uzyskanych w dotychczas przeprowadzonych badaniach z substancjami smołowymi stwierdzono, że liczba mutacji s jest wystarczająco duża do opracowania wyników metodami statystycznymi. Ulega ona najmniejszym zmianom w kolejnych powtórzeniach z tego samego materiału, a odcinek liniowej zależności dawka-odpowiedź dla mutacji s jest najdłuższy.

Z podanych powyżej powodów ocenę aktywności mutagennej substancji smołowych postanowiono oprzeć na analizie liczby mutacji s.

Potwierdzeniem słuszności przyjętych parametrów są wyniki wykonanych badań. Wyniki z wszystkich próbek pobieranych w lecie i w zimie były zawsze istotne. Ilość uzyskanych mutacji, dla obu krzyżówek mieściła się w zakresie liniowych zmian zależności dawka-odpowiedź (oceny dokonano w oparciu o badania, wyniki których przedstawiono na ryc. 1 i 2).

Korzystnie jest wykonać całe badanie (np. porównanie aktywności mutagennej zanieczyszczeń pobranych z dwóch, trzech punktów w lecie i w zimie) w jednej serii oznaczeń. Pozwala to uniknąć problemów z błędem międzyseryjnym. Do kontroli zmian czułości muszek na działanie mutagenów w różnych seriach badań służą kontrole dodatnie (np. B(a)P w stężeniu 0,2 mM). W badaniach autorów w takich kontrolach



Ryc. 3. Rodzaje włosków na powierzchni skrzydeł *Drosophila melanogaster*

a) normalne; b) zmienione ale nie zaliczane do typów mutacji mwh lub flr; c) w układach określanych jako mutacja mwh; d) zmienione w sposób charakterystyczny dla mutacji flr. Rycina wg. *Grafa i wsp.* (3).

Types of hairs on the wings of *Drosophila melanogaster*

a) norma; b) changed but not included in mwh or flr mutations; c) in arrangements called mwh mutation; d) changes characteristic of the flr mutation. Fig after *Graf et al* (3).

dla krzyżówki $mwh \times ORR flr^3$ uzyskiwano około 30 mutacji s (małych) na preparacie zawierającym 40 skrzydełek. Dzięki prowadzonej trzy razy w roku selekcji muszek, w ciągu ostatnich dwóch lat istotnych zmian w czułości na substancje mutagenne u wykorzystywanych szczepów nie stwierdzono.

Dzięki użyciu równocześnie dwóch krzyżówek muszek różniących się ponad 100-krotnie czułością na działanie promutagenów np. benzo(a)pirenu-B(a)P możemy ocenić i rozróżnić aktywność mutagenów i promutagenów wymagających aktywizacji w obecności cytochromu P450. Ma to duże znaczenie, znamy bowiem dość dokładnie działanie B(a)P jak i źródła jego emisji. Jest on jedynym związkiem spośród WWA, którego stężenie w powietrzu jest w Polsce normowane.

W badaniach użyto organizmu eukariotycznego (*Drosophila melanogaster*) o działaniu funkcjonalnym enzymów zbliżonym do ludzkich [3]. W badaniu zmiany mutagenne obserwuje się na dużej liczbie (około 2500) komórek u jednego osobnika. Pozwala to na wiarygodną ocenę zagrożenia stwarzanego dla zdrowia ludzkiego przez badane zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego.

W ciągu jednego dnia można wykonać doświadczenie na które składa się około 20 próbek. Czas potrzebny na wykonanie z każdej z nich preparatu (40 skrzydełek) i jego analizę wynosi ok. 4–7 godz.

WNIOSKI

1. Przedstawiona metoda oznaczania aktywności mutagennej zanieczyszczeń powietrza nie wymaga specjalistycznego i drogiego sprzętu, dzięki czemu może być zastosowana w większości istniejących laboratoriów.

2. Przy zachowaniu zalet badania na organizmie eukariotycznym koszty z nim związane porównywalne są z kosztami testów bakteryjnych.

3. Metoda ta umożliwia ocenę wpływu wybranych źródeł zanieczyszczeń (np. pojazdy mechaniczne, elektrociepłownie, zakłady przemysłowe) oraz intensywności promieniowania słonecznego na aktywność mutagenną zanieczyszczeń powietrza.

A. Krogulski, M. Borkowska

THE METHOD OF TESTING OF THE MUTAGENIC ACTIVITY OF COAL TAR IN ATMOSPHERIC DUST

Summary

For assessing of the environmental contamination with potentially carcinogenic mutagens the possibility of the measurement of the mutagenic activity of the substances absorbed on dust suspended in air would be important. These substances include at least several hundreds of organic compounds. Only a small part of them have been studied in detail, and, on the other hand, it is known that at least a score of them are carcinogenic. Additionally, the presence of some of them can change significantly the action of other ones. Because of that, the effects of a mixture of these substances should be studied as a whole. The fact that the discussed contaminants are present in the air and can be transported over great distances causes that they are dangerous to man both directly (when inhaled) and through contamination of water, soil and food. Parallel use in the described method of two cross-bred strains of fruit flies made possible separate assessment of the activity of mutagens and promutagens requiring activation in presence of cytochrome P 450. The use of the eukaryotic organism in which mutations are observed in many cells in one individual (about 2500) enables reliable data to be obtained about the degree of human health risk.

PIŚMIENNICTWO

1. *Frei H., Würgler F.*: Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Res.*, 1988, 203, 297. – 2. *Folinsbee L.*: Human health effects of air pollution. *Environ Health Perspect.*, 1992, 100, 45. – 3. *Graf U., Würgler F., Katz A., Frei A., Junon H., Kale P.*: Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 1992, 271, 59. – 4. *Graf U., Schaik N.*: Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 1992, 271, 59. – 5. IARC (1987) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Supplement 7. Lyon. – 6. *Jędrzychowski W., Becher H., Wahredorf J., Basa-Cierpielek Z.*: A case-control study of lung cancer with special reference to the effect of air pollution in Poland. *Epidemiol Community Health.*, 1990, 44, 114. – 7. *Just J.* (red.): Metody sanitarnego badania powietrza atmosferycznego. *Biuletyn Służby Sanitarno-Epidemiologicznej Województwa Katowickiego.*, Rok XX lipiec-wrzesień 1976. Zeszyt Nr 3 (84). – 8. *Kilbey B., MacDonald D., Auerbach C., Sobels F., Vogel E.*: The use of *Drosophila melanogaster* in tests for environmental mutagens. *Mutation Res.*, 1981, 85, 141. – 9. *Lave L., Omenn G.*: Cost-effectiveness of short-term tests for carcinogenicity. *Nature*, 1986, 324, 29. – 10. *Wojtyniak B., Goryński P.*: Air pollution and population health in Poland – selected issues. *Zbl. Bact.*, 1994, 281, 317.