

ADAM KROGULSKI, MARLA BORKOWSKA, ARTUR STRUSIŃSKI

OZNACZANIE AKTYWNOŚCI MUTAGENNEJ EKSTRAKTU  
CYKLOHEKSANOWEGO PYŁU POWIETRZA ATMOSFERYCZNEGO  
I WIELOPIERŚCIENIOWYCH WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH  
(WWA) PRZY UŻYCIU RÓŻNYCH SZCZEPÓW *DROSOPHILA*  
*MELANOGASTER*

DETERMINATION OF THE MUTAGENIC ACTIVITY OF CYCLOHEXANE  
EXTRACT OF ATMOSPHERIC AIR DUST AND POLYCYCLIC AROMATIC  
HYDROCARBONS ON VARIOUS STRAINS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

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

*Przedstawiono wyniki oznaczania aktywności mutagennej ekstraktu cykloheksanowego pyłu powietrza atmosferycznego oraz wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. W badaniach użyto różnych szczepów Drosophila melanogaster różniących się poziomem enzymów związanych z cytochromem P-450.*

Liczba substancji składających się na ekstrakt cykloheksanowy pyłów powietrza atmosferycznego – zwany dalej substancjami smołowymi – wynosi co najmniej kilkaset. Działają one jak mieszanina o zmiennym składzie [1, 2]. Wśród nich można wyróżnić substancje działające bezpośrednio mutagennie, jak i substancje wymagające uprzedniej aktywacji (promutageny). Enzymy związane z cytochromem P-450 w wielu przypadkach są konieczne do powstania metabolitów mutagennych z promutagenów. Wśród używanych do badań aktywności mutagennej testem somatycznej mutacji i rekombinacji (SMART) szczepów muszek owocowych (*Drosophila melanogaster*), znajdują się szczepy różniące się wielokrotnie aktywnością enzymów związanych z cytochromem P-450 [3, 4]. Bardzo niski poziom enzymów wymienionej grupy zawiera szczep flr<sup>3</sup>/TM3, Ser oraz jego krzyżówka ze szczepem mwh. Uniemożliwia to praktycznie wykazanie aktywności mutagennej w badaniach promutagenów. Wielokrotnie wyższy poziom enzymów aktywujących promutageny posiada szczep ORR;flr<sup>3</sup>/TM3, Ser oraz jego krzyżówka ze szczepem mwh.

Wykorzystując obydwie szczepy do badania tego samego materiału, podjęto próbę określenia: wpływu mutagenów i promutagenów na aktywność mutagenną substancji smołowych, oraz badania wpływu aktywacji wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) na wyniki testu SMART.

## MATERIAŁ I METODYKA

Do badań użyto krzyżówek trzech różnych szczepów muszki owocowej, samic szczepu mwh i samców szczepu flr<sup>3</sup>/TM3, Ser, o bardzo małej zdolności aktywacji promutagenów oraz samic szczepu mwh i samców szczepu ORR;flr<sup>3</sup>/TM3, Ser o wielokrotnie wyższej zawartości enzymów aktywujących promutageny. Powyższe szczepy pochodziły z Instytutu Toksykologii ETH i Uniwersytetu w Zurychu [3, 4]. Hodowlę muszek prowadzono i badania wykonywano w temperaturze 25°C i wilgotności 60%.

Użyte odczynniki: wzorce benzo(a)pirenu (BaP), benzo(k)fluorantenu (BkF), pirenu (P), fluorantenu (Fl), chryzenu (Ch), benzo(e)pirenu (BeP) i benzo(ghi)perylenu (B(ghi)Per) firmy Fluka, cykloheksan cz.d.a., chloroform do spektroskopii, stabilizowany etanolem firmy Merck, Tween 80 firmy Aldrich, etanol 96% cz.d.a., sucha pożywka dla *Drosophila melanogaster* – Instant Medium, firmy Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC, USA. Sposób pobierania próbek pyłu, ekstrakcji cykloheksanem i oznaczania aktywności mutagennej były zgodne z metodyką PZH [5, 6].

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Ze względu na znaczne różnice w wynikach badań przeprowadzonych z użyciem szczepu flr<sup>3</sup> i ORR;flr<sup>3</sup>, osobnego przedstawienia wymagają wyniki badań benzo(a)pirenu.

W badaniach benzo(a)pirenu w zakresie stężeń od 0,2 do 15,0 mmoli przeprowadzonych z użyciem krzyżówki mwh x flr<sup>3</sup> nie uzyskano istotnych wyników aktywności mutagennej (górną granicę przyjęto ze względu na działanie toksyczne).

W zakresie stężeń do 5,0 mmoli wyniki były negatywne, a od 5,0 do 15,0 mmoli część wyników była negatywna, a część niepewna.

Używając do badań krzyżówki mwh x ORR;flr<sup>3</sup>, uzyskano wyniki istotne w zakresie stężeń 0,1–2,0 mmole, z wyraźnie zaznaczoną zależnością dawka – odpowiedź.

Wyniki jednej serii badań przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Aktywność mutagenna benzo(a)pirenu.  
Mutagenic activity of the benzo(a)piren.

Lp.	Mutacje	Stężenie w mg/5 ml pożywki						
		0	0,033	0,063	0,125	0,25	1,26	2,52
1	E	7	9	7	15	25	43	54
2	S	9	14	9	19	25	55	72

1 mmol – 1,26 mg/5ml,

E – suma wszystkich mutacji,

S – mutacje obejmujące 1 lub 2 komórki.

Przy wyższych stężeniach wyniki dla określonego stężenia znacznie różniły się, a więc trudno mówić o zależności dawka – odpowiedź.

BkF, B(ghi)Per, P, BeP, Fl, Ch wykazywały aktywność mutagenną w zakresie od 5,0 do 10,0 mmoli. Liczba mutacji przy użyciu szczepu ORR;flr<sup>3</sup> w porównaniu ze szczepem flr<sup>3</sup> wzrastała nie więcej niż dwukrotnie.

Wyniki badań tylko z użyciem szczepu ORR;flr<sup>3</sup> są zgodne z danymi piśmiennictwa [7]. Porównanie wyników badań uzyskanych z użyciem obu szczepów przedstawiono w tabeli II.

Tabela II. Aktywność mutagenna wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.

Mutagenic activity of the some polycyclic aromatic hydrocarbons.

Substancja badana	mwh x ORR; FLR <sup>3</sup>	mwh x flr <sup>3</sup>	Własności substancji (Lewis (7))
B (k) F	x x	x / 0	kancerogen
B (ghi) Per	x x	x / 0	mutagen
P	0	0	brak własności mutagennych
F1	x x	x / 0	mutagen*
Ch	x	0	kancerogen
B (e) P	x	x	mutagen*
B (a) P	x x	x / 0	kancerogen

x – aktywny,

xx – silnie aktywny,

0 – brak własności mutagennych,

\* – wykazuje własności mutagenne dla człowieka.

Tabela III. Liczba mutacji obejmujących 1 lub 2 komórki w badaniach aktywności mutagennej substancji smołowych.

Number of mutations containing 1 or 2 cells in the investigations of the mutagenic activity of coal tar.

Lp.	Krzyżówka	Substancje smołowe w mg/5ml pożywki										
		0	2	6	8	9	10	12	15	18	20	24
1	mwh x flr <sup>3</sup>	8	10	31	–	34	–	33	–	42	–	52
2	mwh x ORR; flr <sup>3</sup>	9	10	–	18	–	28	–	38	–	53	–

Czas ekspozycji dla komórki mwh x flr<sup>3</sup> – 72 godz.Czas ekspozycji dla komórki mwh x ORR; flr<sup>3</sup> – 48 godz.

W badaniach substancji smołowych z użyciem obu krzyżówek uzyskano zbliżone wyniki.

W tabeli III przedstawiono wyniki dwóch serii badań ze szczepem flr<sup>3</sup> i ORR;flr<sup>3</sup>. Czas ekspozycji przy użyciu szczepu ORR;flr<sup>3</sup> był krótszy. Czynniki to badania łatwiejszymi do wykonania a uzyskane wyniki dla tej samej masy substancji smołowych mają mniejszy rozrzut.

Badając dwie lub więcej substancji, z pośród wybranych WWA, podanych razem, z użyciem szczepu ORR;flr<sup>3</sup> nie stwierdzono działania synergicznego ani sumowania ich aktywności mutagennych. Przeciwnie, w przypadku BaP podanego z innym aktywnym mutagenem spośród WWA zdarzało się, że ilość mutacji była niższa niż dla samego BaP, w tym samym stężeniu. Nasuwa to przypuszczenie o "konkurencji" w dostępie do enzymów aktywujących promutageny. Może to być wytłumaczeniem stosunkowo małej

różnicy w aktywności mutagennej substancji smołowych badanych z użyciem obu szczepów. Nie wyjaśnia jednak, jakie substancje wykazują aktywność mutagenną w warunkach braku aktywacji promutagenów.

### WNIOSKI

1. Wiarygodne wyniki określania aktywności mutagennej poszczególnych WWA dają zastosowanie tylko szczepu o wysokiej aktywności enzymów aktywizujących promutageny czyli szczepu ORR;flr<sup>3</sup>/TM3,Ser.

2. Mieszanki promutagenów w stężeniach kilku mmoli, mogą wykazywać niższą aktywność mutagenną niż najbardziej mutagenny z nich, podany osobno. Może to być przyczyną zahamowania wzrostu krzywej dawka – odpowiedź.

3. Przeważająca część mutacji w badaniach substancji smołowych nie jest efektem działania silnie aktywnych promutagenów z pośród badanych WWA, w tym BaP.

A. Krogulski, M. Borkowska, A. Strusiński

### DETERMINATION OF THE MUTAGENIC ACTIVITY OF CYCLOHEXANE EXTRACT OF ATMOSPHERIC AIR DUST AND POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS ON VARIOUS STRAINS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

#### Summary

Using the test of somatic mutation and recombination (SMART) the mutagenic activity was studied in two cross-breed *Drosophila melanogaster* strains. In the strain mwh x ORR;flr<sup>3</sup>/TM3, Ser the concentration of cytochrome P-450-associated enzymes necessary for activation of many promutagens, e.g. benzo(a)pyrene is many times higher.

Cyclohexane extracts of atmospheric dust and certain polycyclic aromatic hydrocarbons were studied separately or in combination of two different ones. The study showed that:

– reliable results of the determinations of the mutagenicity of various polycyclic aromatic hydrocarbons were obtained only with the strain with high activity of enzymes activating promutagens, that is strain OR;flr<sup>3</sup>/TM3,Ser;

– mixtures of promutagens in concentrations of several mmols can show lower mutagenicity than the most mutagenic component of the mixture given separately. This could be the cause of stopped rise of the dose-response curve;

– an overwhelming majority of mutations in studies of tar substances is not due to the action of strongly acting promutagens among the polycyclic aromatic hydrocarbons studied here, including BaP.

#### PIŚMIENNICTWO

1. De Flora S., Camoirano A., Izzotti A., D'Agostini F., Bennicelli C.: Photoactivation of mutagens. *Carcinogenesis* 1989, 10, 1089.
2. Fernandez M., L'Haridon J.: Influence of light conditions on toxicity and genotoxicity of various PAH in the newt in vivo., *Mutation Res.*, 1992, 298, 31.
3. Graf U., Katz A., Frei A., Junon H., Kale P.: Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 1984, 153, 6.

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. Just J. (red): Metody sanitarnego badania powietrza atmosferycznego. Biuletyn Służby Sanitarnej-Epidemiologicznej Województwa Katowickiego, Rok XX lipiec-wrzesień 1976, Zeszyt Nr 3 (84).
6. Krogulski A., Borkowska M.: Metoda oznaczania aktywności mutagennej substancji smołowych zawartych w pyłach powietrza atmosferycznego. Roczn. PZH 1996, 47, 175.
7. Lewis R.: Carcinogenically active chemicals. A Reference Guide. Van Nostrand Reinhold 1991.

Otrzymano: 1997.11.14