

APLIKACE IN VITRO TESTŮ PRO HODNOCENÍ GENOTOXICITY KONTAMINANT V OVZDUŠÍ

Kotulová H.¹, Tarabová B.² a Jaskóová Z.³

¹*Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě,
Chittussiho 10, 710 00 Slezská Ostrava,*

¹p12040@student.osu.cz, ²p12044@student.osu.cz, ³Zuzana.Jaskoova@osu.cz

Abstrakt

Hlavním cílem práce bylo hodnocení genotoxického potenciálu vzorků ovzduší odebraných ČHMÚ v centru Ostravy na ulici Českobratrská. U jednotlivých vzorků byl stanoven obsah vybraných kovů a polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU). Hodnocení mutagenity bylo provedeno pomocí Amesova testu a SOS Chromotestu. K detekci poškození DNA byl použit mikroforézní test Comet assay. V Amesově testu byly využity bakteriální kmeny *Salmonella typhimurium* His⁻ TA98 a YG1041 a testování proběhlo bez metabolické aktivace (-S9) a s metabolickou aktivací (+S9). SOS Chromotestem ve variantě s i bez metabolické aktivace bylo provedeno in vitro testování pomocí bakteriálního kmene *Escherichia coli* K12 PQ37. U testovaných vzorků byly detekovány posunové mutace, prokázán toxický efekt i indukce SOS reparačního systému.

Klíčová slova: genotoxicita; ovzduší; Ames test; SOS Chromotest; Comet assay

Úvod

V dnešní době se chemické látky staly součástí našeho každodenního života a značně ovlivňují životní prostředí. Bylo prokázáno, že mnoho látek, které byly dříve považovány za relativně bezpečné, mohou po delším působení v organismu vyvolat poškození [1]. Látka může ve své původní nebo pozměněné formě reagovat s DNA a tím poškodit nebo pozměnit její genetickou informaci. Důsledkem tohoto působení může být například vznik mutací, karcinogeneze nebo letalita [2].

Ostravský region je díky dlouhodobé průmyslové výrobě a rostoucí automobilové dopravě stále více znečišťován emisemi [3]. Mezi exhaláty s genotoxickými účinky řadíme především v pyrolytických procesech vznikající PAU, jejich nitro-deriváty a těžké kovy (Ni, As, Cr, Pb), které jsou součástí emitovaného prachu. Tyto látky se do organismu dostávají inhalací [4].

Vhodnou metodou pro detekci mutagenů v environmentálních vzorcích a pro hodnocení jejich účinku na organismy jsou bakteriální detekční systémy. Umožňují screeningové hodnocení genotoxického potenciálu chemických látek [5].

Materiál a metody

Testované vzorky

Testované vzorky ovzduší byly odebrány v letech 2011-2013, a to 28.1.2011, 28.1.2012, 8.12.2012, 18.12.2012 a 3.1.2013. Kritériem výběru byla dosažená hodnota objemu částic PM10 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) vyskytujících se v ovzduší v daném dni a dle rozptylových podmínek v příslušném období. Vzorky pocházely z lokality Ostrava-Českobratrská (hot spot) z manuální měřicí stanice TOCBM provozované Českým hydrometeorologickým ústavem, pobočkou v Ostravě. Přípravu, zpracování a chemické analýzy odebraných vzorků provedla zkušební laboratoř, oddělení hydrochemie VÚV T.G.Masaryka, v.v.i., OstravaPro měření množství částic PM10 přítomných v ovzduší byla použita gravimetrie. Odběr vzorků byl proveden spojitou filtrací ovzduší přes

filtry Millipore (1,2 μm , průměr 47 mm). Průtok odebíraného vzduchu přitom činil 500 dm^3/min a čas odběru 24 hodin.

Příprava vzorků

Jednotlivé filtry byly rozpůleny a extrahovány dichlormethanem v ultrazvukové lázni. Extrakt byl filtrován vakuovým čerpadlem přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μm a zahuštěn dusíkem v přístroji TurboVap. Dichlormethanový extrakt z jedné poloviny filtru byl použit pro stanovení EOM a PAU. Zbytek extraktu byl v dusíkové atmosféře převeden do stejného objemu dimethylsulfoxidu pro stanovení genotoxicity. Stanovení hodnoty extrahovatelné organické hmoty (EOM) bylo provedeno vážkovou analýzou. Z rozdílu hmotnosti váženky s odpařeným extraktem a prázdné váženky byla vypočítána průměrná hodnota EOM v mg/ml extraktu. Extrakt z druhé poloviny filtru byl použit pro přípravu mineralizátu ke stanovení obsahu vybraných kovů. Charakteristika jednotlivých vzorků je uvedena v tabulce 1.

Tabulka 1.: Charakteristika vzorků ovzduší vzhledem k hodnotám PM_{10} , EOM, těžkých kovů a PAU

Vzorek (datum odběru)	EOM [$\mu\text{g/ml}$]	PM_{10} [$\mu\text{g/m}^3$]	Obsah těžkých kovů [μg]			Σ PAU [ng]	Σ B(a)P [ng]
			As	Cr	Pb		
28.1.2011	$0,33 \cdot 10^3$	94	3,75	11,35	3,45	7754,7	671,5
28.1.2012	$3,46 \cdot 10^3$	26	6,4	13,15	7,1	129982	11203
8.12.2012	$4,13 \cdot 10^3$	101	9,5	14,75	7,55	186348	19246
18.12.2012	$0,27 \cdot 10^3$	17,5	2,33	5,15	5,65	8779,8	898,5
3.1.2013	$0,27 \cdot 10^3$	N/A	2,24	6,25	2,65	2844,5	129

Metodika

Amesův test je založen na indukci reverzních mutací u auxotrofních indikátorových kmenů *Salmonella typhimurium* His⁻ TA 98 a YG 1041 detekující posunové mutace [6, 7, 8, 9]. Test byl proveden ve variantách s i bez metabolické aktivace *in vitro*. Index mutagenity byl stanoven jako $\text{IM} = R_t/R_c$ vypočítaného z celkového počtu revertant pro danou koncentraci testované látky (R_t) vztaheného ke kontrole (R_c). Jako pozitivní byly hodnoceny výsledky, kdy byl počet revertujících kolonií průkazně zvýšen, tj. minimálně dvakrát oproti kontrole [1]. Stanovený mutační potenciál MP charakterizuje zvýšení indukčního potenciálu IM v závislosti na koncentraci vzorku. Výsledky byly následně vyhodnoceny pomocí statistického softwaru SALM [7, 10].

SOS Chromotest umožňuje hodnotit mutageny indukující SOS reparace. Byl proveden v miniaturizované verzi ve variantách s a bez metabolické aktivace *in vitro* na kmeni *E. coli* K12 PQ37 [11, 12]. Za signifikantní je považováno zvýšení indukčního faktoru I_c o hodnotu 0,5 oproti kontrole. Hodnota SOS indukčního potenciálu SOSIP charakterizuje lineární závislost indukčního faktoru I_c na množství testované látky c [1].

Kometový test (Comet assay - Single cell gel electrophoresis, SCGE) umožňuje detekci a kvantifikaci poškození a/nebo reparaci jaderné DNA na úrovni jednotlivých buněk. Lze sledovat přímé i přechodné jednořetězcové (SSBs) a dvouřetězcové zlomy (DSBs), křížové vazby (crosslinks), alkali- labilní polohy (ALSs), oxidační a alkylační poškození bazí případně poškození související s apoptózou. Zkouška byla realizována na eukaryotických buněčných

liniích. Jako parametr pro hodnocení vznikajících komet byl vybrán Olive tail moment (OTM), který kombinuje dvě významné charakteristiky korelující s DNA poškozením-délku a procento DNA v ocasu komety ($OTM = \text{délka ocasu} \times \% \text{ DNA v ocasu}/100$) [13]. Variabilita odpovědí byla tedy testována analýzou variance (Kruskal-Wallisův test).

Výsledky a diskuse

Výsledky Amesova testu a SOS Chromotestu jsou shrnuty v tabulce 4. Z výsledků vyplývá, že v Amesově testu všechny zkoumané vzorky vykazovaly mutagenitu. Experimenty byly, s ohledem na výsledky chemické analýzy poukazující na vysoký obsah PAU, provedeny pouze na kmenech TA98 a YG1041. Tyto kmeny slouží k detekci posunových mutací a jsou doporučovány pro hodnocení mutagenity PAU a jejich dusíkatých derivátů. Získaná data ukazují, že mutagenitu indukují nejen PAU řadící se k nepřímým mutagenům (varianta testu s metabolickou aktivací), ale také deriváty PAU vznikající fotochemickou degradací a reakcí s NO_x (testy na YG1041 bez metabolické aktivace). Tento závěr je při hodnocení ekologického a zdravotního rizika kontaminace ovzduší významný.

SOS Chromotestu bylo zjištěno, že tři vzorky (28. 1. 2011, 28. 1. 2012, 8. 12. 2012) indukují poškození vyžadující aktivaci reparačních SOS funkcí. Protože tento efekt byl vyvolán v testech s i bez metabolické aktivace, nelze jej jednoznačně přisoudit určité složce ve směsi kontaminant.

Data také naznačují, že intenzitu a charakter mutagenity nelze odhadovat pouze dle hodnoty EOM nebo dle chemického složení vzorků. Např. zjištěný mutagenní efekt vzorků z 8. 12. 2012 a 18. 12. 2012 neodpovídá skutečnosti, že vzorky pocházejí ze dnů, kdy naměřená hodnota PM₁₀ byla nejvyšší a nejnižší (Tabulka 2). V Amesově testu byly výsledky vzorků z 8. 12. a 18. 12. 2012 pozitivní ve všech provedených variantách a na kmeni YG 1041 byla mutagenita u méně znečištěného vzorku (18. 12. 2012) dokonce více jak 2,5x vyšší než u vzorku z 8. 12. 2012, který obsahoval relativně větší zastoupení částic PM₁₀. Lze tedy konstatovat, že výsledný genotoxický efekt závisí pravděpodobně na větším počtu faktorů a nejen na obsahu prachových částic (PM₁₀ a PM_{2,5}) a objemu extrahovatelné organické hmoty (EOM), ale spíše na přítomnosti konkrétních kontaminant a celkovém stavu ovzduší a počasí, na kterých závisí intenzita a rychlost degradace kontaminant.

Tabulka 4. Výsledky mutagenity hodnocené Amesovým testem a SOS Chromotestem

Datum odběru	Mutační Potenciál MP				SOSIP	
	TA98		YG1041		PQ37	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
28.1.2011	+	+	+	+	-	+
28.1.2012	+	+	+	+	+	-
8.12.2012	+	+	+	+	+	-
18.12.2012	+	+	+	+	-	-
3.1.2013	+	PM	+	+	-	-

+ pozitivní v testu mutagenity; - negativní v testu mutagenity; PM potenciálně mutagenní

Závěr

Na základě našich výsledků hodnocení genotoxicity vybraných vzorků ovzduší pomocí sreeningových bakteriálních testů bylo zjištěno, že u vzorků můžeme detekovat posunové

mutace, toxický efekt a indukce SOS reparačního systému. Výsledky z Comet assay, které doplňují informace o poškození DNA, jsou v současné době vyhodnocovány.

Literatura

- [1] MALACHOVÁ, K. Mutagenita a karcinogenita kontaminantů životního prostředí. Spisy prací přírodovědecké fakulty Ostravské university, Ostrava, 1993. ISBN: 80-7042-707-8
- [2] QUILLARDET, P et al. Use of the terms mutagenicity and genotoxicity. Mutation Research, 132, 141 –142, 1984. ISSN: 0027-5107
- [3] MALACHOVÁ, K. et al. Genotoxicita ovzduší v centru města Ostravy. Ochrana ovzduší, 2012, 3: 22-25. ISSN 1211-0337 [10] AMES, B. N. et al. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Research, 31: 347-364, 1975. ISSN: 0027-5107
- [4] ANDEĚL, P. Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring. Liberec: Evernia, 2011. ISBN 978-80-903787-9-7
- [5] HOLOUBEK, I. Využití testů genotoxicity pro kontrolu kontaminace zemědělských produktů, potravin a vzorků životního prostředí [online]. Tocoen s.r.o., 2004 [cit. 20.3.2014]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2003/vvf-06-03.pdf>
- [6] MORTELMANS, K. et al. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mutation Research, 455:29-60, 2000. ISSN: 0027-5107
- [7] MARGOLIN, B. H. et al. Statistical analysis of the Ames Salmonella/microsome test. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70:2281-2285, 1981. ISSN: 0027-8424
- [8] MARON, D. M. et al. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research, 113: 173-215, 1983. ISSN: 0027-5107
- [9] AMES, B. N. et al. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Research, 31: 347-364, 1975. ISSN: 0027-5107
- [10] BROEKHOVEN, L. H. et al. Statistical analysis of the Salmonella mutagenicity assay. In Statistics in Toxicology. Amsterdam: Gordon & Breach, 1991, pp. 28-34.
- [11] QUILLARDET, P. et al. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. Mutation Research, 147: 79-95, 1985. ISSN: 0027-5107
- [12] HOFNUNG, M. et al. Use of the terms mutagenicity and genotoxicity. Mutation Research, 132: 141-142, 1984. ISSN: 0027-5107
- [13] DHAWAN, A. & ANDERSON, D. The comet assay in toxicology. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2009. ISBN 978-0-200985404-199-2

Abstract

The aim of this work was to evaluate the genotoxic potential of air samples collected by ČHMU Institute in Ostrava, on the street Českobratrská. For each sample was determined content of selected metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Mutagenicity was evaluated by Ames test and SOS Chromotest. For detection of DNA damage was used electrophoretic test Comet assay. In the Ames test were used bacterial strains *Salmonella typhimurium* His⁻ TA98 and YG1041 and testing was carried out without metabolic activation (-S9) and with metabolic activation (+ S9). With SOS Chromotest, in variant with and without metabolic activation, was performed *in vitro* testing using a bacterial strain *Escherichia coli* K12 PQ37. For the tested samples were detected frameshift mutations, demonstrated toxic effect and induction of SOS reparations system.