

Wykorzystanie mikropłytkowego testu Amesa MPF™ do oceny mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza

Microplate Ames MPF™ test use in assessment of mutagenic properties of dust pollution

Agnieszka Kozłowska (a, b, c, d, e), *Elżbieta Olewińska* (b, c, e), *Natalia Pawlas* (a, d, e)

Zakład Szkodliwości Chemicznych i Toksykologii Genetycznej, Pracownia Toksykologii Genetycznej, Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego w Sosnowcu. Kierownik Zakładu: dr hab. n. med. A. Sobczak
Dyrektor IMPiZS: dr n. med. P.Z. Brewczyński

(a) opracowanie koncepcji i założeń

(b) przygotowanie materiału do badań

(c) badania laboratoryjne

(d) opracowanie statystyczne

(e) opracowanie tekstu i piśmiennictwa

Streszczenie

Wstęp: Teren o wysokim stopniu uprzemysłowienia jakim jest obszar Górnego Śląska, jest szczególnie zanieczyszczony przez pyły zawieszane pochodzenia antropogenicznego i naturalnego, które mogą pośrednio przyczyniać się do pojawiania negatywnych skutków zdrowotnych u ludzi.

Materiał i metody: Celem pracy było określenie potencjału mutagennego dla ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza, pobranych w sześciu miastach województwa śląskiego. Próbkę pyłowych zanieczyszczeń powietrza były pobierane na filtry z włókna szklanego przy użyciu aspiratora o przepływie powietrza wynoszącym ok. 1 m³/min. Ekstrakcję pyłów przeprowadzono przy użyciu chlorku metylenu, a testowane próbki przed analizą rozpuszczono w dimetylosulfotlenku (DMSO). Badania potencjału mutagennego przeprowadzono mikropłytkowym testem Amesa MPF™ z wykorzystaniem zmodyfikowanych szczepów testowych *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100.

Wyniki: W mikropłytkowym teście Amesa MPF™ zaobserwowano zależność liniową dawka – odpowiedź dla szczepu TA98 w obu wariantach aktywacji metabolicznej (\pm S9) szczepu TA100 w wariantach $+$ S9. Odpowiedź dla szczepu TA98 w obu wariantach aktywacji metabolicznej (\pm S9) 100% badanych próbek

wykazało wartości aktywności mutagennej >2 , co wskazuje na silnie właściwości mutagenne ekstraktów pyłów. W próbkach badanych przy użyciu szczepu TA100 – S9 – w wariantach bez aktywacji metabolicznej zaobserwowano brak aktywności mutagennej <1 . Natomiast przeprowadzenie testu w obecności frakcji mikrosomalnej ($+$ S9) wykazało odpowiedź ze strony szczepu TA100 w postaci aktywności mutagennej w zakresie od $AM = 1,16 \pm 0,15$ do $AM = 9,67 \pm 1,02$ w zależności od lokalizacji miejscowości.

Wnioski: Przeprowadzone badania wykazały, iż mikropłytkowy test Amesa MPF™ jest szybką i kompleksową metodą do określenia właściwości mutagennych substancji zanieczyszczających powietrze, a mających szkodliwy wpływ na organizmy żywe. Zastosowanie testu Amesa w formacie mikropłytkowym w połączeniu z badaniami chemicznymi może przyczynić się do określenia wartości lub poziomu wskaźników narażenia środowiskowego oraz umożliwić rzeczywistą ocenę narażenia populacji na czynniki mutagenne, toksyczne i cytotoksyczne, co z kolei może się przyczynić do bardziej precyzyjnej oceny ryzyka zdrowotnego.

Słowa kluczowe: mikropłytkowy test Amesa MPF™, pył zawieszony, aktywność mutagenna

Nadesłano: 15.05.2012

Zatwierdzono do druku: 21.05.2012

Abstract

Background: Highly industrialized Upper Silesia Region is particularly polluted by both anthropogenic and natural airborne particulate matters, which may lead to negative health effects in human.

Materials and methods: The aim of the study was to assess the mutagenic properties of dust extracts which were collected in six cities in the Silesian Voivodeship. Dust samples were collected on glass fiber filters by the aspirator with air flow ca. 1 m³/min. Extraction of pollution was carried out using dichlorometane. The extracted samples were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). The mutagenic properties were assessed using microplate Ames assay MPFTM with the use of bacteria *Salmonella typhimurium* strain TA98 and TA100.

Results: In microplate Ames assay MPFTM there was observed a linear dose-response relationship in both metabolic variants of TA98 strain. Similar relationship was observed for TA100 strain with metabolic activation

(+S9). Mutagenic activity (AM) of 100% extracts for TA98 strain in both metabolic variants (\pm S9) exceeded 2, what indicate highly mutagenic effects of dust extracts. There was no mutagenic activity observed in the assay with TA100 ($-$ S9), AM < 1. In the variant with exogenous metabolic activation (+S9) in TA100 strain AM values ranged from AM = 1,16 \pm 0,15 to AM = 9,67 \pm 1,02. Mutagenic activity varied between different cities.

Conclusions: The study demonstrated that microplate Ames assay MPFTM is fast and complex method of assessing the mutagenic properties of dust pollution, which exert toxic effect on organisms. The use of microplate Ames assay MPFTM together with chemical analyses of air dust pollution may evaluate the level of exposure in the environment and enable to perform health risk assessment in populations exposed to mutagenic, toxic and cytotoxic substances.

Key words: microplate Ames MPFTM test, air dust, mutagenic activity

Wstęp

Jeden z podstawowych komponentów środowiska – powietrze atmosferyczne – zanieczyszczone jest występującymi w fazie stałej cząstkami stanowiącymi mieszaninę węgla elementarnego oraz nieorganicznych tlenków i soli, pochodzenia naturalnego lub antropogenicznego, na powierzchni których adsorbują się związki o działaniu mutagennym. Koncentracja, skład chemiczny, ilość i rodzaj zanieczyszczeń uzależniony jest od szeregu czynników o charakterze lokalnym i globalnym [1–3]. Wiele z nich charakteryzuje się właściwościami toksycznymi powodującymi różnego rodzaju uszkodzenia materiału genetycznego komórki w postaci mutacji genowych, chromosomowych i genomowych. Terminem „mutacja” można określić szereg zmian ilościowych lub strukturalnych w materiale genetycznym, naruszania struktury DNA, jego funkcji lub systemu naprawy spowodowanych przez czynniki zewnętrzne, które powodują trwałe lub dziedziczne zmiany genetyczne [4]. Działanie mutagenne określonego czynnika (fizycznego, chemicznego, biologicznego) to zdolność do wywołania trwałego zaburzenia genetycznego w żywych komórkach. Ważną rolę odgrywają badania biologiczne *in vitro* z wykorzystaniem hodowli komórek, bakterii lub innych organizmów doświadczalnych. Obserwuje się wtedy zmiany w materiale genetycznym eksponowanych komórek, które są podstawą do prognozowania mutagennego działania próbki na komórki ludzkie. Można stwierdzić również wyraźną zależność między zdolnością do wywoływania mutacji a potencjałem rakotwórczym danego ksenobiotyku.

Badania biologiczne można prowadzić z wykorzystaniem testów krótkoterminowych, gdzie wyni-

ki otrzymujemy w krótkim czasie (kilka dni) od rozpoczęcia badań, testów długoterminowych, w których odpowiedź uzyskujemy po długoletnim okresie oczekiwania (kilka lat) lub/i badań epidemiologicznych przez obserwację odpowiednio licznej populacji narażonej na czynniki środowiskowe będące przyczyną chorób nowotworowych [4–8]. Testy krótkoterminowe są bardzo pomocne w badaniu próbek pobranych ze środowiska np. powietrza [9]. Niebezpieczne związki genotoksyczne posiadają zdolność do wiązania się z DNA komórki, mogą uszkadzać strukturę materiału genetycznego [8, 10]. Aby uzyskać wiarygodne wyniki najlepsze rozwiązanie to przeprowadzenie doświadczeń wielotestowych określających mutagenne, toksyczne czy cytotoksyczne działanie szkodliwego związku znajdującego się w powietrzu atmosferycznym [7, 8]. Zgodnie z wytycznymi OECD [11] polecany jest zestaw pięciu testów, wśród których najbardziej popularny jest test Ames (Test Salmonella) [4, 8, 10] od niedawna stosowany do badania mutagenności próbek środowiskowych również w wersji mikropłytkowej [12].

Badania na bakteriach

Testy z wykorzystaniem bakterii stanowią doskonałe narzędzie do oceny mutagennych właściwości różnych komponentów środowiska, w tym pyłów zawieszonych. Bakterie to jednokomórkowe organizmy charakteryzujące się bardzo prostą budową, posiadają pojedynczą okrągłą cząsteczkę DNA, którą łatwo uszkadzają związki chemiczne. Ulegają one częstym podziałom, i w ciągu kilku godzin można uzyskać dziesiątki milionów organizmów [4, 10].

Bakterie *Salmonella typhimurium* – pałeczki duru mysiego – w naturze szczepy dzikie potrzebują do swojego rozwoju zaledwie jednego związku organicznego, są prototrofami [7, 8, 10, 13]. Szczep *Salmonella typhimurium* jest stosowany na szeroką skalę do oceny pyłowych zanieczyszczeń powietrza na całym świecie [1, 2, 8, 14–20]. Testy bakteryjne przeprowadza się w obecności enzymów oksydacyjnych najczęściej zawartych w homogenacie wątroby szczurów określanych jako frakcja mikrosomalna S9, aby uzyskane wyniki mutacji wykrywanych w organizmach bakterii mogły być odniesione do organizmów wyższych [13].

Genotypy szczepów testowych

Szczepy *Salmonella typhimurium* zostały zmutowane w kilku miejscach genomu, co spowodowało że stały się bardziej czułe na działanie mutagenów. W wyniku mutacji w genie odpowiedzialnym za syntezę histydyny zostały one pozbawione zdolności do syntezy tego aminokwasu, którą mają szczepy nie zmutowane. Dlatego do swojego rozwoju potrzebują dwóch związków organicznych, między innymi histydyny (histydyno-zależne his –) czyli są tzw. auktotrofami. Pod wpływem czynnika mutagennego bakterie ulegają mutacji powrotnej, która przywraca im pierwotną zdolność do syntezy aminokwasu i umożliwia wzrost na podłożu bez tego związku. Są one wówczas histydyno-zależnymi prototrofami (his +) [6–8, 13]. Szczepy *Salmonella typhimurium*

posiadają mutacje *his* – oraz geny zwiększające ich wrażliwość w postaci materiału zwanego plazmidem pKM101, a także mutacje *rfa*, delecje $\Delta uvrB$ [14]. W tabeli I przedstawiono charakterystykę szczepów stosowanych w teście Ames. Mutacja *hisD3052* występuje w szczepie TA98 i polega na delecji 1 pary zasad –CG– w miejscu, które składa się z 8 kolejnych par zasad –CG– [14]. Mutacja *hisG46* występuje w szczepie TA100 i polega na transycji 1 pary zasad AT–GC [14]. Mutacja *rfa* wskutek zmiany składników liposacharydowych (LPS) ściany komórkowej bakterii powoduje zwiększenie jej przepuszczalności dla związków o dużych cząsteczkach, np. B[a]P [8]. Delecja $\Delta uvrB$ powoduje utratę genu kodującego enzymy wycinające dimery pirymidynowe, co zmniejsza zdolność naprawy DNA poprzez wycinanie. Z przyczyn technicznych oprócz genu *uvrB* wycięto również dwa geny: gen kodujący syntezę biotyny (gen *bio*), co spowodowało, że bakterie potrzebują do wzrostu także biotyny, oraz gen kodujący reduktazę azotanową (gen *chl*) [14, 16]. pKM101 (czynnik R) – warunkuje oporność bakterii na ampicylinę oraz zawiera gen *mucAB*, który powoduje stymulację systemu błędnej naprawy DNA [16]. Plazmid pKM101, znajdując się w materiale genetycznym bakterii *Salmonella typhimurium*, zwiększa ich czułość na wykrywanie mutacji indukowanych przez nitrowe i aminowe pochodne wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych [8, 14, 16, 18].

Tabela I. Charakterystyczne mutacje szczepu *Salmonella typhimurium* [14]
Table I. Mutations in *Salmonella typhimurium* strains [14]

| Szczep | Miejsce mutacji | Typ mutacji | Szczep dziki | Szczep zmutowany | Mutacje dodatkowe | | |
|--------|-----------------|----------------------------|----------------------|--------------------|-------------------|---------------|---------|
| | | | | | LPS | naprawa | plazmid |
| TA98 | <i>hisD3052</i> | przesunięcie ramki odczytu | CGCGCGCG GCGCGCGC | GCGCGCG CGCGCGC | <i>rfa</i> | $\Delta uvrB$ | pKM101 |
| TA100 | <i>hisG46</i> | podstawienie pary zasad | GAG CTC | GGG CCC | | | |

Szczepy TA98 i TA100 znalazły zastosowanie w mikropłytkowym formacie testu Ames MPF Fluctuation Assay [12, 21, 22]. Zgodnie z kontrolą jakości szczepów w laboratoriach producenta (Xenometrix) są one sprawdzane na obecność odpowiednich genotypów i certyfikowane. Cechą charakterystyczną każdego szczepu testowego stosowanego w mikropłytkowym teście Ames MPF oprócz wyżej wymienionych genotypów jest określona liczba pozytywnych dołków dla kontroli nega-

tywnej (zawierającej jedynie rozpuszczalnik bez substancji mutagennej). Dla TA98 wynosi ona < 8 pozytywnych dołków, a dla TA100 < 12 pozytywnych dołków. W celu potwierdzenia zdolności bakterii do rewersji czyli mutacji powrotnych, specyficzności każdego szczepu oraz wydajności mieszaniny S9 (stężenie końcowe w hodowli 4,5%), poza liczbą dołków pozytywnych dla rozpuszczalnika (kontrola negatywna) sprawdza się również liczbę pozytywnych dołków indukowanych przez

mutageny diagnostyczne (kontrola pozytywna). Dla szczepu TA98 i TA100 w wariancie z aktywacją metaboliczną oraz bez aktywacji metabolicznej liczba pozytywnych dołków powinna być ≥ 25 . Mutagenami diagnostycznymi stosowanymi w mikropłytkowej wersji testu Ames są: 2-nitrofluoren (stężenie końcowe 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) i N-tlenek-4-nitrochinoliny (stężenie końcowe 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) w wariancie bez aktywacji metabolicznej oraz 2-aminoantracen (stężenie końcowe 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) w wariancie z aktywacją metaboliczną. W formacie mikropłytkowym testu Ames stosuje się podłoża płynne zawierające minimalną ilość odpowiedniego aminokwasu (histydyny) w celu umożliwienia 1 lub 2 replikacji bakterii. W takim podłożu przeżywają i wzrastają tylko takie bakterie, w komórkach których następuje rewersja mutacji.

Cel pracy

Celem przeprowadzonych badań było określenie wykrywalności potencjału mutagennego pyłowych zanieczyszczeń powietrza przy zastosowaniu mikropłytkowego testu Ames MPF™. Zakres badań obejmował wykonanie ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza oraz określenie efektu mutagennego poszczególnych ekstraktów pyłów w wybranych miastach województwa śląskiego z wykorzystaniem zmodyfikowanych szczepów testowych *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100 w wersji mikropłytkowej testu Ames MPF™.

Materiały i metody

Obszar badań i metodyka przygotowania prób

Punkty pomiarowe zlokalizowano na zanieczyszczonym obszarze Górnego Śląska w sześciu miastach: Katowice, Bytom, Sosnowiec, Częstochowa, Bielsko-Biała, Racibórz. Próbkę pobierano przy użyciu aspiratora o przepływie powietrza wynoszącym ok. 1 m^3/min . na filtry z włókna szklanego w sezonie jesiennym w systemie 24-godzinny przez okres trzech miesięcy (wrzesień–listopad). W każdym miesiącu wykonano dziesięć 24-godzinnych pomiarów. Następnie przygotowano próbki zbiorcze z okresu 3 miesięcy dla każdego punktu pomiarowego. Filtry (10 sztuk \times 3 miesiące) z pyłowymi zanieczyszczeniami powietrza pobranymi na jednej stacji pomiarowej ekstrahowano w aparacie Soxhleta przy użyciu chlorku metylenu. Po wstępnym zagęszczeniu ekstraktu w wyparce próżniowej (UNIPAN-PRO) rozpuszczalnik odparowano w atmosferze azotu, a następnie suche ekstrakty rozpuszczono w dimetylosulfotlenku (DMSO) oraz przygotowano odpowiednie dawki testowanego materiału badawczego.

Metodyka badań mutagenności – mikropłytkowy test Ames

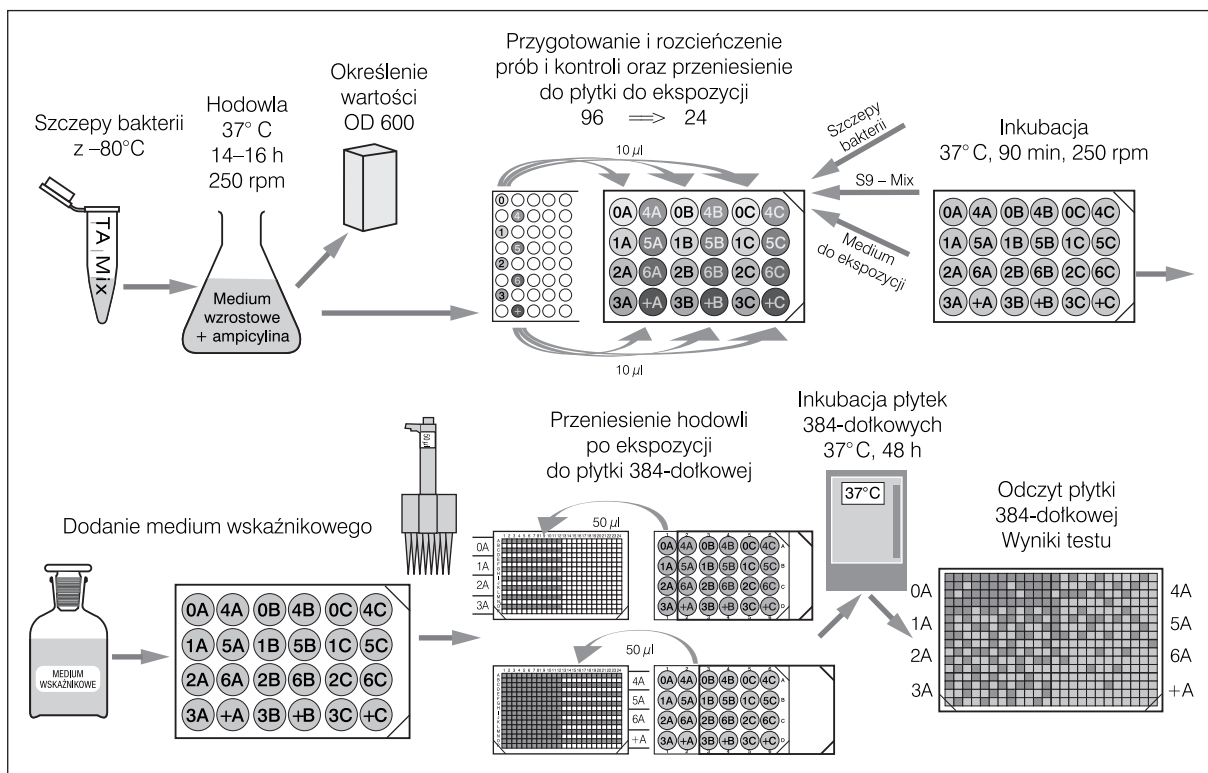
Do badania mutagenności organicznych ekstraktów z pyłów zawieszonych zastosowano mikropłytkową wersję testu Ames, opracowaną przez firmę Xenometrix (Szwajcaria) zgodnie z wytycznymi OECD 471 [11] z wykorzystaniem szczepu *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100. Zastosowanie standardowych metod jest podstawą do przygotowywania hodowli, przechowywania szczepów testowych oraz prawidłowego ich przygotowania do testu. Na podstawie badań wstępnych oraz własnych doświadczeń zastosowano szereg dawek ekstraktu pyłowych zanieczyszczeń powietrza (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 m^3) w trzech powtórzeniach i w dwóch wariantach bez aktywacji metabolicznej (–S9) oraz z aktywacją metaboliczną (+S9). Przemiany metaboliczne związków promutagennych do mutagenów przeprowadzono w obecności enzymów oksydacyjnych, zawartych w ekstrakcie z tkanek ssaków (wątroby) określanym jako post-mitochondrialny supernatant czyli frakcja mikrosomalna S9.

Optymalizacja procedury dla potrzeb oceny mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza została przeprowadzona w Pracowni Toksykologii Genetycznej Instytutu Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego na podstawie wytycznych OECD 471 [11], instrukcji dostarczonej wraz ze szczepami testowymi przez firmę Xenometrix oraz dostępnej literatury [12, 21, 22] i przebiegała zgodnie z poniższym opisem i schematem (ryc. 1).

1. Sterylizacja pomieszczenia i sprzętu.
2. Nastawienie całonocnej hodowli szczepów *Salmonella typhimurium* w podłożu wzrostowym (Growth Medium) z ampicyliną na 14–16 godzin.
3. Rozmrożenie i rozpuszczenie ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza w DMSO. Testowana próba pyłów – 25 razy stężona.
4. Po całonocnej hodowli określenie wartości OD600 (ang. Optical Density) dla szczepów TA98 i TA100 oraz kontroli negatywnej. Wartości akceptowalne do dalszych badań to: $< 0,05$ dla kontroli negatywnej oraz $> 2,0$ dla szczepów TA98 i TA100.
5. Przygotowanie mutagenów diagnostycznych: 2-AF (2-aminofluoren), 4-NQO (N –tlenek-4-nitrochinoliny), 2-AA (2-aminoantracen).
6. Sporządzenie mieszaniny S9-mix.
7. Wykonanie testu zgodnie z procedurą:
 - przygotowanie płytki 96-dołkowej z rozcieńczeniami pyłowych zanieczyszczeń powietrza oraz kontrolą pozytywną i negatywną,
 - przeniesienie do płytki 24-dołkowej,
 - uzupełnienie płytki 24-dołkowej medium do ekspozycji (Exposure Medium). W wariancie z aktywacją metaboliczną dodanie mieszaniny S9-mix zawierającą frakcję mikrosomalną S9,

- inkubacja płytki 24-dołkowej przez 90 minut w temp. 37°C przy 250 rpm (ang. revolutions per minute – obrotów/minutę),
- uzupełnienie płytki 24-dołkowej podłożem wskaźnikowym (Indicator Medium),)

- przeniesienie z płytki 24-dołkowej do płytki 384-dołkowej,
- 8. Inkubacja prób w płytkach 384-dołkowych w temp. 37°C przez 48 h,
- 9. Odczyt płytek 384-dołkowych.



Rycina 1. Schemat postępowania w mikropłytkowym teście Amesa
Figure 1. Microplate Ames test – an overview

Bakterie *Salmonella typhimurium his* – szczepu TA98 i TA100 w dwóch wariantach (5S9) poddano ekspozycji na 6 dawek ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza równocześnie z kontrolą negatywną i pozytywną przez 90 minut w podłożu zawierającym minimalną ilość histydyny (Exposure Medium) aby doprowadzić do około dwóch podziałów komórkowych. Po 90-minutowym czasie ekspozycji hodowle uzupełniono podłożem zawierającym wskaźnik pH (Indicator Medium) i podzielono w równych ilościach pomiędzy 48 dołków na płytce 384-dołkowej. Płytki 384-dołkowe poddano dwudniowej inkubacji. W tym czasie metabolizm kolonii bakteryjnych obniża pH podłoża, powodując zmianę koloru podłoża w dołku z fioletowego na żółty. W przypadku gdy nie dochodzi do mutacji powrotnej mała ilość histydyny uniemożliwia dalsze podziały bakteryjne, co skutkuje brakiem zmiany barwy w dołku. Po 48 godzinach inkubacji zliczano liczbę dołków zawierających kolonie z rewersją mutacji dla każdej dawki w trzech powtórzeniach

i porównywano z kontrolą negatywną (rozpuszczalnik). Wyniki poddano analizie statystycznej.

Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej uzyskanych wyników wykorzystano arkusz kalkulacyjny Ames Calculation Sheet Ver 2_02 Excel Xenometrix oraz program STATISTICA 9.0. W obliczeniach statystycznych wykorzystano test t Studenta oraz analizę regresji liniowej. Wartość $p < 0,05$ uznano jako poziom istotności statystycznej. Zgodnie z literaturą efekt mutageny dla niskich dawek pyłowych zanieczyszczeń powietrza stosowanych w teście Ames wykazuje zależność liniową. Uzyskane wyniki aktywności mutagennej próbki sklasyfikowano według następujących kryteriów:

- a) próba nie mutagenna $AM < 1$
- b) próba słabo mutagenna $1 \leq AM < 2$
- c) próba mutagenna $AM \geq 2$

Próbkę uznano za mutagenną, jeżeli AM jest równe lub większe od 2.

Wyniki

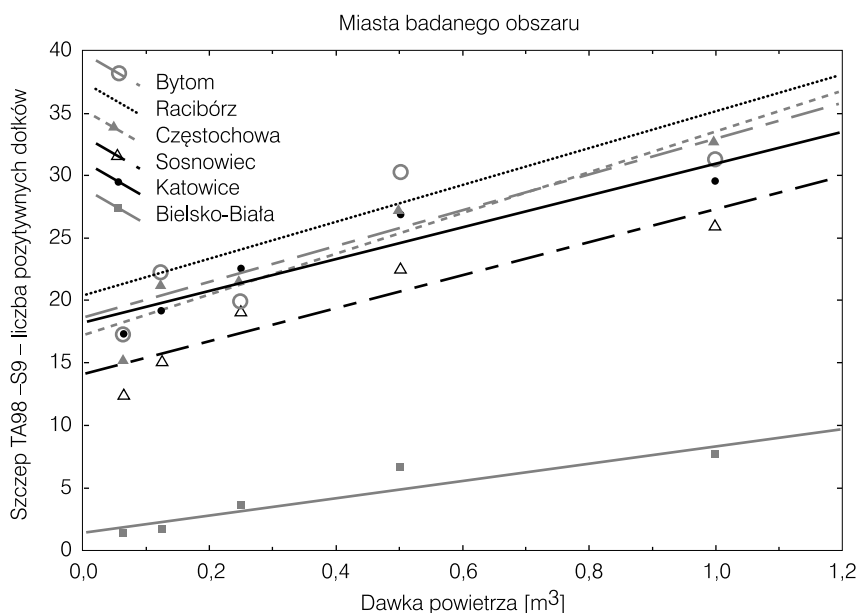
Porównanie zależności dawka – odpowiedź testowanej dawki powietrza i otrzymanej liczby pozytywnych dołków dla ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza badanych z wykorzystaniem szczepów *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100 dla poszczególnych miast konurbacji górnośląskiej przedstawiono na rycinach 2–5. Analizując pełen zakres stosowanych dawek (0,0625–2,0 m³) ekstraktów pyłów w mikroplątkowym teście Amesa zaobserwowano zależność liniową dawka – odpowiedź dla szczepu TA98 w obu wariantach aktywacji metabolicznej (\pm S9) dla dawek od 0,0625 m³ do 1 m³ (ryc. 2 i ryc. 3). Większa dawka (2 m³) ekstraktu pyłów stosowana w teście mikroplątkowym powoduje właściwości cytotoksyczne lub toksyczne dla bakterii *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100.

W wariancie –S9 dla szczepu TA98 (ryc. 2) wszystkie próbki powietrza wykazały wysoki współczynnik korelacji $r=0,876$ (Bytom), $r=0,880$ (Racibórz), $r=0,949$ (Częstochowa), $r=0,935$ (Sosnowiec), $r=0,941$ (Katowice), $r=0,929$ (Bielsko-Biała) co potwierdziło iż analiza zależności dawka – odpowiedź daje wartości istotnie statystyczne $p < 0,05$.

Natomiast w wariancie +S9 dla szczepu TA98 (ryc. 3.) ekstrakty pyłowych zanieczyszczeń powietrza z czterech miast cechowały się wysokim współczynnikiem korelacji $r=0,899$ (Racibórz), $r=0,903$ (Częstochowa), $r=0,931$ (Sosnowiec), $r=0,885$ (Bielsko-Biała) co potwierdziło, że analiza zależno-

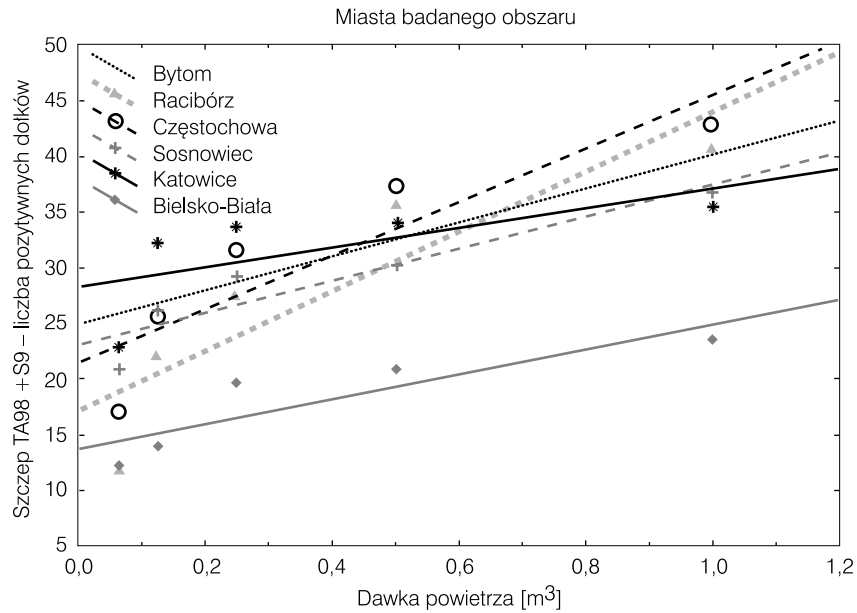
ści dawka – odpowiedź daje wartości istotne statystycznie (p). Poszczególne zależności dawki powietrza i otrzymanej liczby pozytywnych dołków w wybranych miastach wykazują różnicę istotną statystycznie dla: Raciborza i Częstochowy $p=0,03$ dla Sosnowca $p=0,02$. Natomiast ekstrakty z Bytomia i Katowic wykazały współczynnik korelacji nieistotny statystycznie.

W przypadku szczepu TA100 w wariancie bez aktywacji metabolicznej (–S9) nie zaobserwowano aktywności mutagennej analizowanych próbek (ryc. 4). Zależność liniową dawka – odpowiedź wystąpiła w przypadku szczepu TA100 w wariancie +S9 (ryc. 5) dla zakresu dawek od 0,0625 m³ do 1 m³. Ekstrakty pyłowych zanieczyszczeń powietrza z dwóch miast cechowały się bardzo wysokim współczynnikiem korelacji $r=0,978$ (Bytom) i $r=0,998$ (Racibórz), co potwierdziło, iż analiza zależności dawka – odpowiedź daje wartości istotnie statystyczne odpowiednio $p=0,02$ oraz $p < 0,01$. Efekt mutagenny ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza, reprezentujących każdą miejscowość, badany przy pomocy szczepów *Salmonella typhimurium* TA98 oraz TA100 (bez aktywacji i z aktywacją metaboliczną) wyrażono jako aktywność mutagenną (AM) na 1 m³ przepuszczonego przez filtr powietrza (ryc. 6 i ryc. 7). Zaprezentowanie wyników w postaci aktywności mutagennej w przeliczeniu na 1 m³ lepiej wyraża potencjał mutageny próbek powietrza.

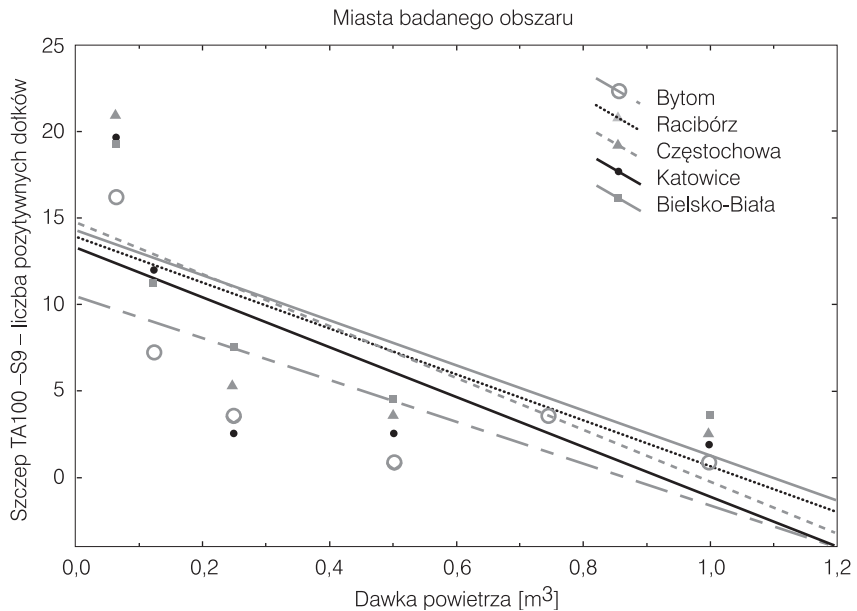


Rycina 2. Zależność dawka – odpowiedź uzyskana dla ekstraktu powietrza pyłów pobranych na terenie wybranych miast województwa śląskiego testowanych szczepem TA98 bez aktywacji metabolicznej

Figure 2. Dose-response relationship between dust extracts and number of coloured wells in cities in Silesian Voivodship in the test with TA98 strain without metabolic activation



Rycina 3. Zależność dawka – odpowiedź uzyskana dla ekstraktu powietrza pyłów pobranych na terenie wybranych miast województwa śląskiego testowanych szczepem TA98 z udziałem aktywacji metabolicznej
Figure 3. Dose-response relationship between dust extracts and number of coloured wells in cities in Silesian Voivodship in the test with TA98 strain with metabolic activation



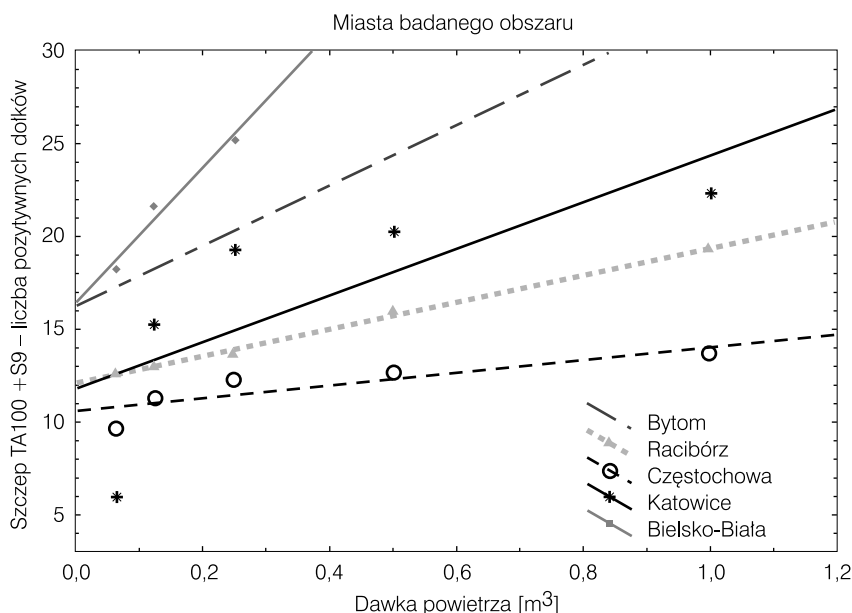
Rycina 4. Zależność dawka – odpowiedź uzyskana dla ekstraktu powietrza pyłów pobranych na terenie wybranych miast województwa śląskiego testowanych szczepem TA100 bez aktywacji metabolicznej
Figure 4. Dose-response relationship between dust extracts and number of coloured wells in cities in Silesian Voivodship in the test with TA100 strain without metabolic activation

Wartości aktywności mutagennej (AM) dla szczepu TA98 (ryc. 6) w wariantach bez aktywacji metabolicznej (-S9) wahały się w granicach $AM = 3,83 \pm 0,58$ do $AM = 10,4 \pm 51,20$. Po zastosowaniu egzogenego systemu aktywacji (+S9)

zaobserwowano wartości aktywności mutagennej od $AM = 8,39 \pm 0,73$ do $AM = 19,7 \pm 0,45$. W obu wariantach 100% badanych próbek wykazało $AM > 2$, co wskazuje na silne właściwości mutagenne ekstraktów pyłów.

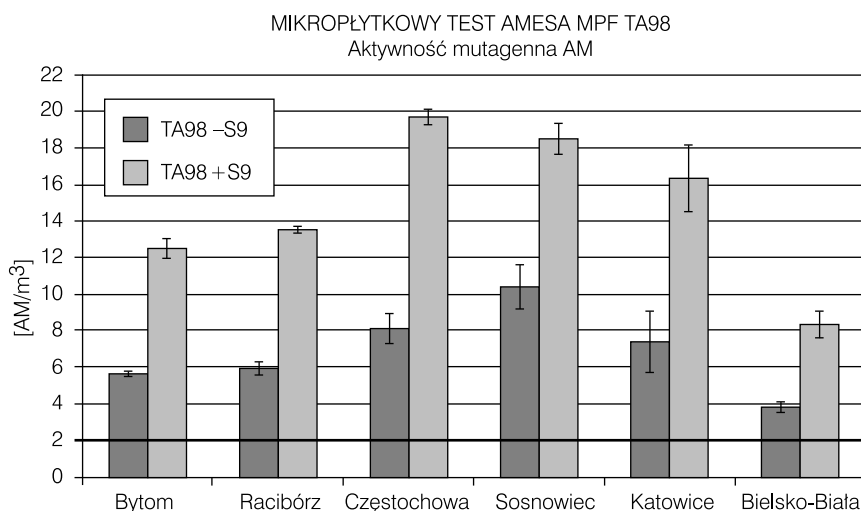
Natomiast w ekstraktach (-S9) badanych przy zastosowaniu szczepu TA100 (ryc. 7) próbki wykazały się brakiem aktywności mutagennej $AM < 1$ i kształtowały się na poziomie od $AM = 0,34 \pm 0,29$ do $AM = 0,86 \pm 0,49$. Szczep TA100 w teście mikroplątkowym okazał się mało efektywny w wykrywaniu substancji mutagennych o działaniu bezpośrednim. Przeprowadzenie testu w obecności +S9

wykazało odpowiedź ze strony szczepu TA100 w postaci aktywności mutagennej w granicach od $AM = 1,16 \pm 0,15$ do $AM = 9,67 \pm 1,02$. W badanym materiale zaobserwowano przewagę mutagenów działających pośrednio (wymagających aktywacji metabolicznej) zarówno w przypadku szczepu TA98 i TA100.



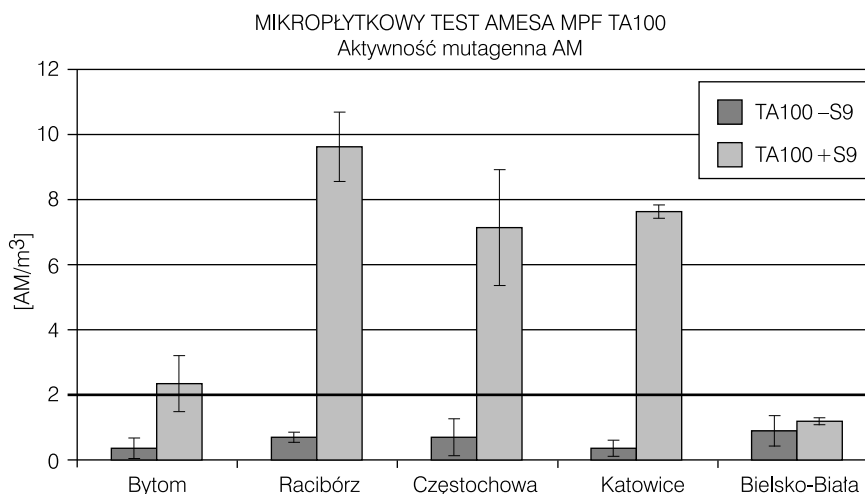
Rycina 5. Zależność dawka – odpowiedź uzyskana dla ekstraktu powietrza pyłów pobranych na terenie wybranych miast województwa śląskiego testowanych szczepem TA100 z udziałem aktywacji metabolicznej

Figure 5. Dose-response relationship between dust extracts and number of coloured wells in cities in Silesian Voivodship in the test with TA100 strain with metabolic activation



Rycina 6. Aktywność mutagenna ekstraktów pyłu zawieszono określona przy pomocy szczepu TA98 w poszczególnych miastach – bez aktywacji (-S9) i z aktywacją metaboliczną (+S9) w teście mikroplątkowym

Figure 6. Mutagenic activity of dust extracts in TA98 – without metabolic activation (-S9) and with metabolic activation (+S9) in microplate Ames test



Rycina 7. Aktywność mutagenna ekstraktów pyłu zawieszonego określona przy pomocy szczepu TA100 w poszczególnych miastach – bez aktywacji (–S9) i z aktywacją metaboliczną (+S9) w teście mikroplytkowym

Figure 7. Mutagenic activity of dust extracts in TA100 – without metabolic activation (–S9) and with metabolic activation (+S9) in microplate Ames test

Dyskusja

Związki i substancje chemiczne zanieczyszczające powietrze atmosferyczne charakteryzują się w większości właściwościami toksycznymi powodując uszkodzenia DNA, które są związane z ryzykiem zachorowalności na nowotwory. Świadomość istnienia tych zagrożeń powoduje zwiększone poszukiwania, możliwie jak najlepszych rozwiązań w kontroli jakości powietrza, w którym występują często niezidentyfikowane pod względem chemicznym substancje o dużej aktywności biologicznej, mogące oddziaływać ze sobą, a także działać antagonistycznie i synergistycznie [5]. W związku z tym prowadzi się poszukiwania nowych metod badania zanieczyszczeń środowiska, których zastosowanie ułatwi ocenę narażenia na substancje mutagenne, genotoksyczne i cytotoksyczne. Jedną z nich może być wprowadzenie do rutynowych badań mikroplytkowego testu Amesa pozwalającego na określenie efektu mutagennego pyłów zawieszonych. Określenia efektu mutagennego dokonało już wielu badaczy w Polsce i na świecie, lecz były to badania z zastosowaniem tradycyjnego (plytkowego) testu Amesa. Udowodnili oni, iż otaczające nas powietrze atmosferyczne, szczególnie na zanieczyszczonym terenie, charakteryzuje się wysokimi współczynnikami mutagenności [1–3, 6–8, 13–20].

Mikroplytkowy format testu Amesa do określenia właściwości mutagennych pyłowych zanieczyszczeń powietrza zastosowali jedynie badacze z Brazylii [12] udowadniając, że prostsza metodyka i automatyzacja testu mogą dostarczyć niezbędnego narzędzia

do badania efektu mutagennego próbek środowiskowych. Przeprowadzone dotychczas badania, z zastosowaniem nowej metody testu Amesa w formacie mikroplytkowym pozwalają sądzić, że może on być stosowany zarówno do oceny próbek środowiskowych [12], jak i badania właściwości mutagennych wielu związków chemicznych [21, 22].

W zaprezentowanych w pracy badaniach zaobserwowano zróżnicowanie aktywności mutagennej zanieczyszczeń pyłowych między zastosowanymi szczepami oraz miejscowościami na terenie województwa śląskiego. Podobnie jak miało to miejsce w Brazylii [12]. Poza przykładem zaprezentowanym w tej pracy brak jest doniesień literaturowych na temat badania zanieczyszczeń powietrza prowadzonych w Polsce z wykorzystaniem testu Ames MPF w formacie mikroplytkowym.

Zaprezentowane przykładowe badania mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza w wersji mikroplytkowej wskazują na możliwość stosowania tego testu jako bardzo dobrej, szybkiej metody pozwalającej na wykorzystanie niewielkiej ilości ekstraktu dającej wiarygodne wyniki.

Mutageny zawarte w ekstraktach pyłów zawieszonych w powietrzu, wywoływały istotną odpowiedź ze strony szczepu TA98, co oznacza, że były to głównie związki wywołujące mutacje typu zmiany fazy odczytu. Wyniki przeprowadzonych badań przy zastosowaniu mikroplytkowego formatu testu Ames wykazały, że aktywacja przy pomocy enzymów mikrosomalnych pochodzących z homogenatu wątroby ssaka powodowała istotny wzrost odp-

wiedzi mutagennej zarówno szczepu TA98 jak i TA100 w odniesieniu do wszystkich testowanych ekstraktów. Stąd też można przypuszczać, że w powietrzu atmosferycznym na zanieczyszczonym obszarze występowała przewaga mutagenów działających pośrednio. Bezpośrednie działanie mutagenów takich jak aminy aromatyczne, hydroksyloaminy, tlenowe pochodne wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) [1] dały odpowiedź aktywności mutagennej tylko w przypadku szczepu TA98 w teście mikroplątkowym we wszystkich miastach badanego obszaru. W rutynowym monitoringu zanieczyszczeń atmosfery określane są stężenia wybranych zanieczyszczeń wskaźnikowych, między innymi pyłu zawieszonego PM₁₀, benzo(a)pirenu czy sumy WWA, co pozwala jedynie na przybliżoną ocenę zagrożenia dla zdrowia ludzi. Z powyższych analiz można wnioskować, że do określenia efektu mutagennego pyłów bardzo przydatny jest mikroplątkowy test Ames.

Taka metoda oceny szkodliwości zanieczyszczenia powietrza jest szczególnie ważna dla bardzo skażonych regionów. Mikroplątkowy bakteryjny test Ames MPF jest szybką i kompleksową, ekonomiczną i dającą wiarygodne wyniki metodą *in vitro* stosowaną do wykrywania właściwości mutagennych przy pomocy dobrze scharakteryzowanych organizmów testowych. Metoda ta pozwala na określenie właściwości mutagennych mających szkodliwy wpływ na organizmy żywe wynikających z zanieczyszczenia powietrza. Zastosowanie testu Ames w formacie mikroplątkowym wraz z badaniami chemicznymi zanieczyszczenia powietrza może w znaczący sposób przyczynić się do określenia wartości lub poziomu wskaźników narażenia środowiskowego, umożliwi rzeczywistą ocenę narażenia populacji na czynniki mutagenne, toksyczne i cytotoksyczne, a także pozwoli na dokładniejsze szacowanie ryzyka zdrowotnego.

Na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować szereg wniosków istotnych ze względu na mutagenne działanie pyłowych zanieczyszczeń powietrza oraz zastosowanie mikroplątkowego testu Ames do oceny efektu mutagennego powietrza atmosferycznego.

1. Test mikroplątkowy jest bardzo czuły w wykrywaniu właściwości mutagennych pyłowych zanieczyszczeń powietrza.
2. W teście mikroplątkowym stwierdzono mniejsze zużycie odczynników i materiałów, a co za tym idzie mniejszą ilość odpadów, mniejszy nakład pracy i mniejsze narażenie na substancje mutagenne personelu.
3. W teście mikroplątkowym można stosować 10 razy mniejszą ilość badanego ekstraktu pyłowych zanieczyszczeń powietrza.

4. Najwyższą bezpieczną dawką w teście mikroplątkowym jest 1 m³ ekstraktu pyłowych zanieczyszczeń powietrza.

Praca zrealizowana w ramach działalności statutowej (numer tematu ZTG-4) Instytutu Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego

Wykaz piśmiennictwa

1. Kozłowska A., Pawlas N., Zaciera M., Kapka-Skrzypczak L., Jasiński R.: Zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych a mutagenne właściwości pyłowych zanieczyszczeń powietrza na obszarze województwa śląskiego. *Medycyna Środowiskowa*, 14:3, 28-38, Sosnowiec 2011.
2. Kozłowska A., Olewińska E., Kowalska-Pawlak A., Pawlas N.: Obecność zanieczyszczeń mutagennych i cytotoksycznych we frakcjach PM₁₀ i PM_{2,5} aerozolu atmosferycznego na terenie miasta Sosnowca. *Medycyna Środowiskowa*, 14:4, 21-33, Sosnowiec 2011.
3. Piekarska K., Zaciera M., Czarny A., Zaczyńska E.: Właściwości mutagenne i cytotoksyczne ekstraktów pyłu zawieszonego pobranego na terenie Wrocławia. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Barbary Kołwzan i Kazimierza Grabasa: *Ekotoksykologia w ochronie środowiska*. PZITS, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 303-312, Wrocław 2008.
4. Traczewska T.M.: Biologiczne metody oceny skażenia środowiska. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2011.
5. Kapka L., Zemła B.F., Kozłowska A., Olewińska E., Pawlas N.: Jakość powietrza atmosferycznego a zapadalność na nowotwory płuc w wybranych miejscowościach i powiatach województwa śląskiego. *PZH, Przegląd Epidemiologiczny*, 63, 3: 437-442, Warszawa 2009.
6. Jadczyk P.: Mutagenność pyłowych zanieczyszczeń powietrza w środowisku miejskim. Rozprawa doktorska. Politechnika Wrocławska, Wrocław 2000.
7. Kołwzan B., Pawlaczyk-Szpilowa M., Adamiak W.: Bioindykacja zanieczyszczeń mutagennych i rakotwórczych w próbach środowiskowych. Cytowane w pracy zbiorowej pod redakcją Jerzego Zwoździaka: *Człowiek, środowisko, zagrożenie*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 165-181, Wrocław 2002.
8. Piekarska K.: Modyfikacja testu Salmonella do oceny mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza. Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Monografia 52: 16-179, Wrocław 2008.
9. Kapka L., Pawlas N., Olewińska E., Kozłowska A., Górny R.L.: Analiza właściwości cytotoksycznych pyłów zawieszonych pobranych w wybranych miejscowościach województwa śląskiego badanych z wykorzystaniem linii makrofagów mysich RAW264.7. *Medycyna Środowiskowa*, 11, 1: 19-26, Sosnowiec 2008.
10. Sadowska A., Obidowska G., Rumowska M.: *Ekotoksykologia. Toksyczne czynniki środowiskowe i metody ich wykrywania*. Wydawnictwo SGGW, 43-112, Warszawa 2000.
11. Wytyczna OECD 471 do badań substancji chemicznych, 1997.
12. Umbuzeiro G., Rech C.M., Correia S., Bergamasco A.M., Cardenatte G.H.L., Flückiger-Isler S., Kamber M.: Comparison of the Salmonella/Microsome microsuspension assay with the new microplate fluctuation protocol for testing the mutagenicity of environmental samples. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51, 31-38, 2010.

13. Kozłowska A., Kapka L., Jasiński R.: Analiza efektu mutagennego przechowywanych ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza w wybranych miastach województwa śląskiego. *Medycyna Środowiskowa*, 10, 2: 68-75, Sosnowiec 2007.
14. Mielżyńska D., Siwińska., Kapka L.: Efekt mutageny pyłów zawieszonych jako wskaźnik jakości powietrza. Wydawnictwo IMPiZŚ, Sosnowiec 2002.
15. Kapka L., Mielżyńska D., Siwińska E.: Ocena sezonowej i przestrzennej zmienności stężeń PM10 oraz wybranych WWA w powietrzu atmosferycznym województwa śląskiego. *Medycyna Środowiskowa*, 7, 1, 25-31, Sosnowiec 2004.
16. Maron D.M., Ames B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, 113: 173-215, 1983.
17. Mertelmans K., Zeiger E.: The Ames Salmonella/microsome mutagenicity test. *Mutation Research* 455, 29-60, 2000.
18. Claxton L.D., Matthews P.P., Warren S.H.: The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity. *Mutation Research*, 567: 347-399, 2004.
19. Traversi D., Degan R., De Marco R., Gilli G., Pignata C., Villani S., Bono R.: Mutagenic properties of PM2.5 urban pollution in the Northern Italy: The nitro-compounds contribution. *Environment International*, 35: 905-910, 2009.
20. Abou Chakara O.R., Joyeux M., Nerrie're E., Strub M.P., Zmirou-Navier D.: Genotoxicity of organic extracts of urban airborne particulate matter: An assessment within a personal exposure study. *Chemosphere*, 66, 1375-1381, 2007.
21. Flückiger-Isler S., Baumeister M., Braun K., Gervais V., Hasler-Nguyen N., Reimann R., Van Gompel J., Wunderlich H.G., Engelhardt G.: Assessment of the performance of the Ames IITM assay: A collaborative study with 19 coded compounds. *Mutation Research* 558, 181-197, 2004.
22. Flückiger-Isler S., Kamber M.: The Ames MPF 98/100 Assay: Novel mutagenicity testing in liquid microplate format using S. typhimurium TA98 and TA100. European Environmental Mutagen Society, 36th Annual Meeting, Prague, 2006.

Adres do korespondencji:

*Agnieszka Kozłowska
Zakład Szkodliwości Chemicznych
i Toksykologii Genetycznej
Pracownia Toksykologii Genetycznej
Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego
ul. Kościelna 13, 41-200 Sosnowiec
tel: +48 32 6341194; fax: +48 32 2661124
e-mail: a.kozłowska@imp.sosnowiec.pl*