

A karcinogén 1-nitropirén in vivo mutagenitása, egy potenciális azbesztexpozíció modellje

Varga Csaba, Szendi Katalin

Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Orvosi Népegészségtani Intézet,
Környezet-egészségtani Tanszék, Pécs

A főleg közlekedési eredetű karcinogén nitroarének képviselője, az 1-nitropirén genotoxicitását vizsgáltuk patkányokban, 30 mmol/kg dózis egyszeri orális illetve intraperitoneális adagolását követő 24 és 48 óra után. Az állatoktól gyűjtött vizelet mutagenitását Ames-tesztben, *Salmonella typhimurium* TA 98 és 100-as törzseivel teszteltük. A vizelet mutagenitási mintázata teljesen eltért az orális és az intraperitoneális expozíció esetében. Az első 24 órás vizeletmintákban frame-shift mutagén(ek)e)t mutattunk ki, de csak a vizeletminták dekonjugációs kezelése után, mely a metabolikus szulfát- és glükuronid-konjugáció genotoxicitást elfedő hatását szünteti meg. Bázispár-szubsztitúció típusú mutagenitást viszont kizárólag az intraperitoneálisan kezelt csoport vizelete jelzett. Minthogy ismert, hogy a környezeti azbesztexpozíció karcinogén hatását nagymértékben fokozzák a rostok felületén megkötött policiklusos aromás szénhidrogén molekulák, az ismertetett in vivo modell lehetőséget nyújt a rosthöz kötött nitroarének tanulmányozására is, mind a hatásmechanizmus, mind a kockázatbecslés szintjén. *Magyar Onkológia* 50:337-340, 2006

The environmental carcinogen 1-nitropyrene was orally and intraperitoneally administered to rats in a single dose of 30 mmol/kg. Mutagenicity of excreted urine was tested in *Salmonella typhimurium* TA 98 and 100 strains. The mutagenic pattern of urine in case of oral exposure proved to be completely different as compared to the intraperitoneal administration. Frame-shift mutagen(s) was/were detected only after enzymatic deconjugation of sulphate or glucuronide metabolites within the first 24 h. Base-pair substitution-type mutagenicity was only detected in the urine samples collected after intraperitoneal treatment. Since environmental asbestos exposure involves carcinogenic effects of adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons, this animal model provides a useful tool for testing fiber-associated nitroarenes, in both mechanistic and risk assessment studies. *Varga C, Szendi K. In vivo mutagenicity of the carcinogenic 1-nitropyrene. A model of a potential asbestos exposure. Hungarian Oncology* 50:337-340, 2006



Bevezetés

Az 1-nitropirén (1-NP) elsősorban közlekedési eredetű, valamint tökéletlen égéskor keletkező nitrocsoporttal rendelkező, policiklusos aromás szénhidrogén (8). Egy másik lényeges légszennyező anyag az azbeszt, melynek rostjai felületükön

megkötődnek és akkumulálhatják pl. az 1-NP molekulákat is. A belélegezhető rostok jelenléte az emberi környezetben több emittáló forrás működésének következménye. Ilyen az azbesztbányászat és -feldolgozóipar, vagy a rostok felszabadulása azbesztcement anyagú tetőfedő palákból és egyéb építő- ill. szigetelőanyagokból. További forrás le-

Közlésre érkezett: 2006. május 31.
Elfogadva: 2006. szeptember 13.

Levelező szerző: Dr. Varga Csaba, Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Orvosi Népegészségtani Intézet, Környezet-egészségtani Tanszék, 7643 Pécs, Szigeti út 12. Tel.: 72-536-394, Fax: 72-536-395, e-mail: chemsafety@freemail.hu

A kutatást finanszírozta: ETT 50188. Varga Cs. az MTA Bolyai-ösztöndíjasa.
Etikai engedély az állatkísérletekhez: Pécsi Tudományegyetem BA02/2000-23/2001

het, különösen Kelet- és Közép-Európában, a közlekedés és szállítás, a korszerűtlen azbeszt fékbrutókkal felszerelt veterán buszok és tehergépkocsik irreálisan hosszú használata. Alkalmanként az azbesztmentesítő programok és az épületbontások szintén hozzájárulnak a sokáig immobilis rostok környezetbe jutásához (7, 13, 14).

Több korábbi vizsgálat is jelezte, hogy a benz[a]pirén és más policiklusos aromás vegyületek mind vizes, mind apoláros közegből hatékonyan kötődnek az azbesztrostok viszonylag nagy felszínéhez. Humán toxikológiai szempontból a belégzést tekintik a fő expozíciós útnak, azonban a nem munkahelyi, hanem elsősorban a közlekedési eredetű rostokhoz kötött molekulák gyakran kerülnek a gasztrointesztinális rendszerbe (15, 16). A radioaktív 1-NP-vel jelzett belégzett részecskék csillóshám segítségével történő eliminálását az exponált patkányok gyomrában mérhető magas radioaktivitás is bizonyítja (2). A metabolitok a székllettel és a vizelettel választódnak ki.

1. táblázat.

1-NP-vel intraperitoneálisan vagy per os kezelt F-344 patkányok vizeletmintáinak mutagenitási vizsgálatai Salmonella Ames-tesztben TA 98-as törzsben

Csoportok	TA 98 (-DE), telepszám (átlag±SD)	p (kontroll vs. kezelt)	TA 98 (+DE), telepszám (átlag±SD)	p (kontroll vs. kezelt)	p (-DE vs. +DE)
ip. 1-NP (24 h)	155,9±29,9	0,024 *	219,4±38,4	0,024 *	0,080
Kontroll	18,9±7,1		17,9±3,9		
ip. 1-NP (48 h)	25,6±10,1	0,295	79,2±56,0	0,383	0,321
Kontroll	15±3,5		35±7,0		
po. 1-NP (24 h)	41,6±8,0	0,120	35,9±2,7	0,031 *	0,443
Kontroll	72,5±14,6		16,3±4,2		
po. 1-NP (48 h)	63,9±11,6	0,194	618,0±291,3	0,195	0,115
Kontroll	99,6±23,4		154,0±178		

*szignifikáns különbség (p<0,05)

2. táblázat. 1-NP-vel intraperitoneálisan vagy per os kezelt F-344 patkányok vizeletmintáinak mutagenitási vizsgálatai Salmonella Ames-tesztben TA 100-as törzsben

Csoportok	TA 100 (-DE), telepszám (átlag±SD)	p (kontroll vs. kezelt)	TA 100 (+DE), telepszám (átlag±SD)	p (kontroll vs. kezelt)	p (-DE vs. +DE)
ip. 1-NP (24 h)	808,5±27,2	0,002 *	1168,5±2,7	0,010*	0,003 *
Kontroll	325,3±4,1		677,0±74,9		
ip. 1-NP (48 h)	471,6±91,6	0,282	1011,2±418	0,335	0,212
Kontroll	362,5±53,0		640,5±59,4		
po. 1-NP (24 h)	359,5±13,4	0,364	269,4±28,0	0,829	0,055
Kontroll	317,5±49,2		236,3±108,6		
po. 1-NP (48 h)	377,0±61,2	0,379	302,8±20,4	0,071	0,245
Kontroll	310,5±57,3		492,5±72,8		

*szignifikáns különbség (p<0,05)

Korábbi tanulmányainkban (4, 5) a génexpresszió szintjén hatékonyan bizonyult egyszeri 1-NP dózissal kezelt állatok vizeletének mutagenitását vizsgáltuk. Mind a hatás mechanizmusának megismerése, mind a kockázatbecslés lehetőségét tekintve lényeges a komutagenitás (más mutagénnel történő együtthatás), vagy egyéb lehetséges kémiai ill. fizikai interakciók tanulmányozása. Ez pedig lehetetlen az azbesztrosthoz kötött 1-NP orális expozíció hatására keletkező, potenciálisan mutagén metabolitok kiválasztási kinetikájának megismerése nélkül.

Anyag és módszer

Kezelések, a minták gyűjtése és előkészítése

Beltenyészett nőstény, kb. 100 g tömegű F-344 patkányokat hatosával négy csoportba rendeztünk. Az állatokat egyenként helyeztük el vizeletgyűjtésre alkalmas metabolikus ketrecekben. Az egyik kezelendő csoport egyszeri 30 mmol/kg 1-NP-t (CAS No. 5522-43-0, Aldrich) kapott kukoricacsíra-olajban gyomorszájban keresztül (po.), míg a másik kezelt csoport ugyanezt a dózist intraperitoneálisan (ip.) kapta. A két kontroll csoportot csak az oldószerrel kezeltük po. illetve ip. (corn-oil, Sigma-Aldrich). A vizeletmintákat hűtés mellett, elkülönítve gyűjtöttük az első és a második 24 óra során, majd csoportonként és mintavételi idő szerint egyesítettük az oszlopokromatográfiás technikához szükséges nagyobb térfogat eléréséhez. Meghatároztuk a vizeletek kreatininkoncentrációját, majd a mintákat makroretikuláris műgyantával töltött oszlopokon töményítettük (17). A preparálás eredményeként 10x-es töménységű, dimetil-szulfoxidos eluátumokat kaptunk.

Salmonella Ames mutagenitási teszt

A Salmonella typhimurium TA törzseivel, melyek nem képesek a hisztidin szintézisére, környezeti és biológiai minták mutagenitását lehet vizsgálni. (Ha a minta mutagén, a kvázi hisztidinmentes táptalajon a reverz mutációt szenvedett baktériumok ún. „revertáns” telepeket hoznak létre 48 óra alatt, a telepszámok pedig a mutagenitás erősségével növekszenek.) A konvencionális lemezinkorporációs változatot alkalmaztuk a vizeletek mutagenitásának vizsgálatára (10). A vizelet-koncentrátumok 100 µl-es dózisait adagoltuk a Salmonella TA 98 ill. 100-as törzset tartalmazó két-két lemezhez.

A tesztet elvégeztük a β-glükuronidázt (250 U/lemez) és szulfatázt (100 U/lemez) tartalmazó standard dekonjugációs enzimpreparátum jelenlétében (+DE), mely a genotoxicitást esetleg elfedő kötéstől felszabadítja a metabolitokat, ill. annak hiányában (-DE) is. A revertáns telepszámokat átlagoltuk és az eredeti kreatininkoncentráció 1 mmol/l-ére standardizáltuk. A statisztikai szignifikancia vizsgálatát Student-féle t-próbával végeztük az SPSS for Windows 11.0 program segítségével.

Eredmények

Szignifikanciavizsgálat történt a kezelt és a kezeletlen csoport mintái, valamint az enzimikus (+DE) és enzim nélküli (-DE) minták között. Statisztikailag szignifikáns ($p < 0.05$) mutagenitást a TA 98-as törzsben mind az ip., mind a po. kezelt csoportból származó mintában tudtunk kimutatni, de csak az első 24 órában begyűjtött vizeletmintában. Azonban, míg az előbbi (ip.) csoportban az enzimatis bontás (dekonjugáció) nem befolyásolta az eredményt, addig a po. kezelt csoportnál csak a dekonjugáló enzimek jelenlétében jelentkezett mutagenitás.

A TA 100-as törzsben viszont csak az ip. kezelés okozott erősen szignifikáns ($p = 0,002$; $0,010$) mutagén hatást az első 24 órás mintáknál. Ez a mutagenitás mind az enzimek jelenlétében, mind hiányában jelentkezett (+DE vs. -DE), de a dekonjugáció szignifikánsan tovább fokozta a megjelenő mutagenitás erősségét ($p = 0,003$). Viszont sem a 48 órás ip. minta, sem a 24- és 48 órás po. minták nem mutattak pozitívítást a TA 100-as törzsben. (Részletesen lásd az 1. és 2. táblázatban.)

Megbeszélés

Az 1-NP genotoxikus aktivitását már számos módszerrel bizonyították (2, 8). A TA 98 és 100-as Salmonella-törzsek nem igényelnek metabolikus aktiválást a mutagenitás kimutatásához (11), míg nitroreduktáz-deficiens sejteket felhasználva in vitro mutagenitási tesztekben csak metabolikus aktiválás után lehetett pozitívítást kimutatni (6). Ez utóbbi tény a nitro-csoport fontosságára hívja fel a figyelmet. Élő állatok kezelésekor eltérő viselkedést tapasztalhatunk különböző körülmények között. Az in vivo vizsgálatok szerint pl. a bélflóra játszik jelentős szerepet az 1-NP 1-aminopiréné történő átalakításában, melynek már nincs mutagén hatása (2). A patkánymáj aerob viszonyok között kimutatható mértékben gyűrű-oxidációs termékeket is termel, továbbá DNS-aduktumok megjelenését is előidézi (2). Az ip. kezelt patkányok vizelete szintén mutagénnek bizonyult Salmonellában (1). In vivo citogenetikai vizsgálattal pedig genommutációt (aneuploiditást) egyszeri 30 mmol/kg dózissal ip. kezelt CBA/Ca egerekből sikerült leírni (12).

Az állatkísérletek során összegyűlt bizonyítékok alapján az 1-NP humán karcinogénnek tekinthető (8). A tüdőtumoron kívül egyéb malignus elváltozásokat is okoz, pl. emlő-, gyomor-bélrendszeri tumorokat vagy leukémiát (2, 9). Mind a rövid-, mind a hosszútávú állatkísérletek bizonyos gének (Ha-ras, c-myc, p53) expressziójának megemelkedését is jelezték a legkülönbözőbb szövetekben (3-5).

A jelen kísérletek során, ugyanazzal a kezelési protokollal, amelyet korábban a citogenetikai és a génexpressziós vizsgálatokban is alkalmaztunk, a kiválasztott vizelet mutagenitását igazoltuk (3-5). A TA 100-as törzs használatával, mely bázispár-szubsztitúcióra érzékeny, a mutagenitás

csak az első 24 órában jelentkezett az ip. kezelést követően. A mutagén metabolit(ok) mindenképpen konjugált formában is jelen volt(ak) ebben a vizeletmintában, hiszen a dekonjugáció a mutagenitás újabb szignifikáns növekedésével járt. A po. kezelés kizárólag a TA 98 által kimutatható frame-shift mutagén(ek) megjelenéséhez vezetett a vizeletben, mely(ek)et dekonjugáció mellett tudtunk kimutatni az első 24 órában. A második 24 órában a vizeletminták már nem mutattak mutagén hatást, vagyis a mutagén metabolitok 24 óra alatt kiürültek. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a biotranszformáció jellegét nagymértékben befolyásolja a kezelés ill. az anyag felvételének módja. A po. kezelés a kockázatbecslés szempontjából fontos, mivel ez a környezeti 1-NP-expozíció lehetséges formáját modellezi. A szituáció nagyban hasonlít tehát a karcinogén azbesztrostok esetéhez (16).

Minthogy a „kereskedelmi méretű” belégzett azbesztrostok jelentős része végül lenyelésre kerül és a rostok felületén policiklusos aromás molekulák nagy számban lehetnek jelen, mindkét anyagcsoport kockázatbecslésekor figyelembe kell venni a lehetséges interakciókat. A vizelet mutagenitási mintázatának előzetes meghatározásával egy használható modellt dolgoztunk ki. Az állatmodell alkalmazhatónak tűnik a genotoxikus kölcsönhatások vizsgálatára (a) rosthöz kötött nitroarén orális expozíciója esetén; (b) akut, 24 órás kísérletben. Minthogy az átlagpopuláció főleg orálisan exponálódik a részecskéhez kötött nitroarénekkel, az itt ismertetett, orális kezelést alkalmazó módszer hatékonyabbá teheti a kockázatbecslés folyamatát az ilyen jellegű karcinogén légszennyezők esetében.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak Prof. B.A. Amesnek a Salmonella-törzsekért.

Irodalom

1. Ball LM, Rafter JJ, Gustafsson JA, et al. Formation of mutagenic urinary metabolites from 1-nitropyrene in germ-free and conventional rats: role of the gut flora. *Carcinogenesis* 12:1-5, 1991
2. Chan PC. NPT Toxicity Report Series No. 34: NTP Technical Report on Toxicity Study of 1-Nitropyrene, Research Triangle Park, 1996, pp. 1-62
3. Ember I, Kiss I, Gyöngyi Z, et al. Comparison of early onco/suppressor gene expressions in peripheral leukocytes and potential target organs of rats exposed to the carcinogen 1-nitropyrene. *Eur J Cancer Prev* 9:439-442, 2000
4. Ember I, Pusztai Z, Gyöngyi Z, et al. 1-Nitropyrene induces elevated expression of oncogenes and tumor suppressor genes 24 hours after treatment in CBA/Ca mice. *Anticancer Res* 20:1563-1566, 2000
5. Gyöngyi Z, Nádas E, Varga C, et al. "Long-term" effects of 1-nitropyrene on oncogene and tumor suppressor gene expression. *Anticancer Res* 21:3937-3940, 2001
6. Heflich RH, Thornton-Manning JR, Kinouchi T, et al. Mutagenicity of oxidized microsomal metabolites of 1-nitropyrene in Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 5:151-157, 1990
7. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Chemicals on Man. Vol 14: Asbestos, IARC, Lyon, 1977, pp. 1-106

8. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Vol 46: Diesel and Gasoline Engine Exhausts and Some Nitroarenes, IARC, Lyon, 1989, pp. 1-458
9. Imaida K, Lee MS, Land SJ, et al. Carcinogenicity of nitropyrenes in the newborn female rat. *Carcinogenesis* 16:3127-3030, 1995
10. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215, 1983
11. Mermelstein R, Kiriazides DK, Butler M, et al. The extraordinary mutagenicity of nitropyrenes in bacteria. *Mutat Res* 89:187-196, 1981
12. Pusztai Z, Selyes A, Ember I. Short-term effects of 1-nitropyrene on chromosomes and on oncogene/tumor suppressor gene expression in vivo. *Anticancer Res* 18:4489-4492, 1998
13. Varga C, Kiss I, Ember I. The lack of environmental justice in Central and Eastern Europe. *Environ Health Persp* 110A:662-663, 2002
14. Varga Cs. A genotoxikológiai kockázatbecslés nehézségei: környezeti azbesztexpozíció. *Magyar Epidemiol* 2:147-150, 2005
15. Varga C. Asbestos fibres in drinking water: are they carcinogenic or not? *Med Hypotheses* 55:225-226, 2000
16. Varga C. Can one assess genotoxic and carcinogenic risk of asbestos without mentioning ingested fibres? *Mutat Res* 572:173-174, 2005
17. Varga C, Szendi K, Ember I. An in vivo model for testing genotoxicity of environmental fibre-associated nitroarenes. *In Vivo* 20:539-542, 2006