

Mutagenita polétavého prachu (PM₁₀)

Biologický význam

Ovzduší je příkladem komplexní směsi. Díky nejrůznějším kontaminacím (plynné produkty spalování, výfukové plyny, průmyslové exhalace, kouření cigaret, pyly, sopečné erupce aj.) se může jednat o zástupce mnoha chemických skupin, u řady z nich byly prokázány mutagenní a karcinogenní účinky. Významné jsou zejména polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) a jejich deriváty. Tyto kontaminanty jsou v ovzduší přítomny většinou adsorbované na povrch pevných částic, mohou však být obsaženy i v plynné fázi. Důležitá je velikost částic, která ovlivňuje jejich respirabilitu a tím i biologickou dostupnost.

Amesův test

Pojmenován po Prof. Bruce Nathan Amesovi z Kalifornie, který publikoval o bakteriálním systému k detekci a klasifikaci mutagenů a karcinogenů již v roce 1973. Vycházel z myšlenky, že nejběžnější příčinou rakoviny je somatická mutace, způsobená DNA poškozením. Chemikálie, která poškodí bakteriální DNA a navodí mutaci, by také pravděpodobně způsobila mutaci v savčí, event. zárodečné buňce. Oproti savčím buňkám jsou výsledky na bakteriích mnohem rychlejší a levnější. Z pohledu dnešních znalostí je to značně zjednodušené, přesto je tento test i dnes používán k přímé detekci mutagenních látek, zejména v komplexních směsích (voda, moč, extrakty z pevných látek, testování nových sloučenin).

Využívanými bakteriemi jsou histidin auxotrofní kmeny *Salmonella typhimurium*, které po kontaktu s mutagenní/karcinogenní látkou ochotně revertují zpět a stávají se histidin prototrofními. Prakticky se to projeví změnou růstu bakterií v médiu bez histidinu, resp. se stopovým množstvím histidinu. Indikátorových kmenů existuje celá řada, liší se definovanou změnou genomu a tím schopností detekce genových mutací určitého typu.

Metoda stanovení mutagenity prašného aerosolu (PM₁₀) (metoda je akreditována ČIA):



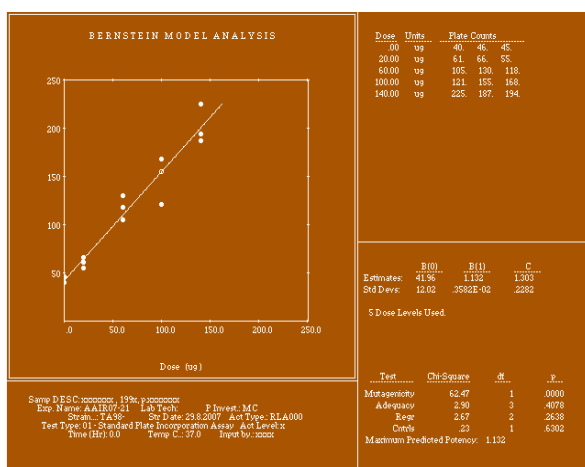
Odběr:

Vzorky jsou odebírány velkokapacitním odběrovým zařízením HVPM 10 (Graseby-Anderson) po dobu 24 hodin na předem zvážený filtr ze skelných vláken s teflonovým povrchem. Prachové částice PM₁₀ (o maximální velikosti 10 μm) jsou v cyklonech odběrového zařízení odděleny a zachyceny na filtr. Při odběru zařízením projde cca 1600 m³ vzduchu, rychlostí 1,13 m³/min. Po ukončení odběru se gravimetricky stanovuje hmotnost zachycených prachových částic a po extrakci dichlormetanem množství vyextrahovaných organických látek (EOM). Nakonec se extrakt převede do dimethylsulfoxidu a je připraven k testování.



Amesův test:

K detekci mutagenity PM₁₀ z ovzduší používáme klasický kmen *Salmonella typhimurium* TA98±S9 (hisD3052 (pKM101), uvrB, rfa), detekující posunové mutace a od něj odvozený YG1041 (TA98 (pYG233), uvrB, rfa), vyznačující se nadprodukcí nitroreduktáz a O-acetyltransferáz, vysoce citlivý na přítomnost nitro- a amino- derivátů.



Hodnocení:

Vzorky jsou testovány v několika dávkách (trojice/dvojice misek), spolu s kontrolami. Po 70 (48) hod. kultivaci se na miskách odečítá nárůst revertant (Counter/Analyzer 282B). Hodnotí se spontánní nárůst kmene, odezva na definovaný mutagen a dávková závislost.

Výsledek – maximální mutagenní potence vzorku (počet revertant/jednotku) - se počítá regresní analýzou (Bernsteinův lineární model, event. Steadův nelineární model – součásti databáze GeneTox Manager, EPA, USA, verze 2.1).

Výsledky

Amesův test byl využit v letech 1991-1999 v Programu Teplice, 2000-2002 v programu Znečištění ovzduší a zdraví (MŽP).

Od r. 1995 se tímto testem monitorují vybrané lokality ČR v rámci Systému monitorování zdravotního stavu obyvatelstva ve vztahu k životnímu prostředí – výsledky mutagenity PM₁₀ z ovzduší jsou součástí Odborných zpráv. Lze shrnout, že v první etapě (1998-2005) byly vzorky odebrány ve čtyřech lokalitách. Byly zjištěny lokální rozdíly, nejzatíženější ze sledovaných lokalit byla Praha. Odběry se uskutečnily převážně v zimním období (říjen-březen). Výsledky na klasickém TA98 kmeni jsou vyšší po externí metabolické aktivaci (TA98+S9), což svědčí pro přítomnost látek, které se mohou stát aktivními až po aktivaci enzymatickým systémem uvnitř organismu. Typickým představitelem jsou PAU. Kmen YG1041, díky své citlivosti, vykazuje několikanásobně vyšší počty indukovaných revertant. Signalizuje přítomnost nitrovaných PAU (dopravní zátěž?).

Literatura

1. Bernstein, L., Kaldor, J., McCaan, J., Pike, M.C.: An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test, *Mutation Res.* 97, 1982, 267–281.
2. Maron, D.M., Ames, B. N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Res.* 113, 1983, 173-215.

3. Tokiwa, H., Ohnishi, Y.: Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment, *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 17, 1986, 23-60.
4. Lewtas, J., Gallagher, J.: Complex mixtures of urban air pollutants: Identification and comparative assessment of mutagenic and tumorigenic chemicals and emission sources. In: *Complex mixtures and cancer risk*. Eds. H. Vainio, M. Sorsa and A.J. McMichael, IARC Sci. Publ. 104, Lyon, 1990, s. 252-260.
5. J. Lewtas, J.: Experimental evidence for the carcinogenicity of air pollutants, in: L. Tomatis Ed., *Air Pollution and Human Cancer*, Springer Verlag, Berlin, 1990, 49-61.
6. Hagiwara, Y., Watanabe, M., Oda, Y., Sofuni, T., Nohmi, T.: Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity, *Mutation Res.* 291, 1993, 171-180.
7. Claxton, L.D., Creason, J., Nader, J.A., Poteat, W., Orr, J.D.: Gene Tox manager for bacterial mutagenicity assays: a personal computer and mini computer system, *Mutation Res.* 342, 1995, 87-94.
8. Černá, M., Pastorková, A., Vrbíková, V., Šmíd, J., Rössner, P.: Mutagenicity monitoring of airborne particulate matter (PM₁₀) in the Czech Republic, *Mutation Res.* 444, 1999, 373-386.
9. Černá, M., Pochmanová, D., Pastorková, A., Beneš, I., Leníček, J., Topinka, J., Binková, B.: Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic Part I. Bacterial mutagenic potencies of organic compounds adsorbed on PM₁₀ particulates, *Mutation Res.* 469, 2000, 71-82.
10. Mortelmans, K., Zeiger, E.: The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mutation Res.* 455, 2000, 29-60.
11. Černá, M., Pochmanová, D., Pastorková, A., Šmíd, J., Binková, B.: Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic Part I. Bacterial Mutagenic of Fractionated Organic Material Adsorbed on Urban Air Particles, in R.J.Šrám (ed.) *Impact of Air Pollution on Human Health*, Academia, Prague, 2001, 113-125.
12. Pastorková, A., Černá, M.: Amesův miskový test (plate incorporation assay), *Standardní operační postup. Acta hygienica epidemiologica et microbiologica*, 3/2003, SZÚ Praha
13. Pastorková, A., Černá, M., Šmíd, J., Vrbíková, V.: Mutagenicity of airborne particulate matter PM₁₀, *Cent Eur J Publ Health* 2004; 12, Suppl, p. S72-S75.