

Słowa kluczowe: genotoksyczność, SOS Chromotest, UMU Test

Anita BONISŁAWSKA*, Krzysztof DEMKOWICZ-DOBRZAŃSKI*,
Grzegorz NAŁĘCZ-JAWECKI*, Józef SAWICKI*

OCENA PRZYDATNOŚCI KRÓTKOTERMINOWYCH TESTÓW BAKTERYJNYCH SOS CHROMOTEST ORAZ UMU TEST W BADANIACH GENOTOKSYCZNOŚCI ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH ORAZ PRÓB ŚRODOWISKOWYCH

SOS Chromotest oraz UMU test to dwa krótkoterminowe, bakteryjne testy do oceny genotoksycznego działania różnego rodzaju prób. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że mimo podobnej zasady i podobnego efektu testowego oba testy wykazują różną czułość w stosunku do badanych próbek co potwierdza tezę o konieczności stosowania baterii testów do badań związków potencjalnie mutagennych.

Wiele związków chemicznych wywiera efekty mutagenne, a zwłaszcza kancerogenne w organizmach zwierzęcych dopiero w wyniku zmian metabolicznych zachodzących w wątrobie. W naszym laboratorium do aktywacji związków genotoksycznych stosowana jest frakcja S9 otrzymana z wątrób szczurów szczepu Sprague-Dawley jak również frakcja S9 uzyskana z wątrób myszy szczepu B10.A. Ponieważ nie można jednak w jednoznaczny sposób stwierdzić, który z rodzajów frakcji jest korzystniejszy do stosowania w obu testach być może należałoby rozważyć wykonywanie testów z zastosowaniem kilku rodzajów frakcji pochodzących od różnych gatunków i ras zwierząt. Pozwoliłoby to na wyeliminowanie błędów wynikających z braku bądź bardzo słabej aktywacji określonego związku przez jedną z frakcji użytych do testów.

1. WSTĘP

Identyfikacja związków zdolnych do indukcji mutacji jest niezwykle istotna w ocenie narażenia. Substancje, które indukują mutacje mogą być potencjalnym zagrożeniem dla komórek zarodkowych, gdyż mogą prowadzić do zaburzeń płodności a także powstawania mutacji u przyszłych pokoleń. Związki mutagenne są także zdolne do indukowania nowotworów i właśnie to zagrożenie spowodowało rozwój programów testowania mutagenności [2].

* Warszawski Uniwersytet Medyczny, Zakład Badania Środowiska, ul. Banacha 1,
02-097 Warszawa, anita.bonislawska@wum.edu.pl

Do najpowszechniej stosowanych testów krótkoterminowych należą testy wykorzystujące jako organizm testowy bakterie.

Do grupy testów bakteryjnych należą test SOS Chromotest, w którym organizmem testowym jest *Escherichia coli* PQ37 i UMU test, w którym wykorzystuje się szczep *Salmonella typhimurium* TA1535.

Zasada obu testów jest podobna. U szczepu testowego związki uszkodzające DNA wywołują szereg funkcji znanych pod nazwą reperacji SOS. Pod kontrolą genów systemu naprawy SOS został umieszczony także gen lacZ, gen strukturalny dla β -galaktozydazy. Podczas ekspresji genów biorących udział w naprawie SOS następuje również ekspresja genu lacZ i synteza β -galaktozydazy. Aktywność β -galaktozydazy oznaczona po inkubacji szczepu testowego z badanym związkiem jest odbiciem poziomu indukcji genu lacZ oraz genów biorących udział w naprawie SOS. Szczep testowy (*E.coli* i *S.typhimurium*) posiada delecję normalnego regionu lac, tak, więc aktywność β -galaktozydazy mierzona w teście zależy wyłącznie od ekspresji genów biorących udział w naprawie SOS.

2. MATERIAŁY I METODY

2.1. TESTY

Test SOS Chromotest był wykonany w wersji mikropłytkowej opartej na procedurze opisanej przez Quillardet i Hofnug (1985) [3]. Szczep testowy *E.coli* PQ37 pochodził z Instytutu Pasteur'a (Paryż, Francja), UMU test był wykonany w wersji mikropłytkowej zgodnie z procedurą ISO/CD 13829 [1]. Szczep testowy *S.typhimurium* TA1535 pochodził z Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Niemcy).

2.2. FRAKCJA S9

Otrzymana z wątrób samców szczurów szczepu Sprague-Dawley oraz samców myszy szczepu B10.A.

3. WYNIKI

Ilościowo genotoksyczność jest wyrażana jako współczynnik indukcji IF (SOS Chromotest) lub współczynnik indukcji IR (UMU Test). Wartość IF/IR jest zależna od stężenia badanego związku, dla związków genotoksycznych rośnie ze wzrostem stężenia. Związek jest uznawany za genotoksyczny, gdy wartość współczynnika IF/IR przynajmniej dla jednego z badanych stężeń przekracza wartość 1,5.

3.1. TLENEK 4-NITROCHINOLINY

Wartości współczynnika IF (SOS Chromotest) dla 4-NQO (rys. 1) są znacznie wyższe niż wartości współczynnika IR (UMU Test) dla odpowiednich stężeń co świadczy o większej czułości testu SOS Chromotest w porównaniu do UMU Testu. Natomiast UMU Test pozwala na oznaczanie znacznie wyższych stężeń niż test SOS Chromotest. Wartości współczynnika IF uzyskane w teście SOS Chromotest dla stężeń 0,5 i 1 $\mu\text{g/ml}$ (wyniki nie prezentowane) są zbliżone do wartości uzyskanych dla stężenia 0,25 $\mu\text{g/ml}$ natomiast w UMU teście współczynnik IR rośnie liniowo aż do stężenia 1 $\mu\text{g/ml}$.

3.2. BENZO(A)PIREN

Analizując wyniki uzyskane dla BP (rys. 2) w SOS Chromotest oraz UMU Test można stwierdzić, że wartości współczynnika IF (SOS Chromotest) są znacznie wyższe niż wartości IR (UMU Test). SOS Chromotest również wykrywa jako genotoksyczne niższe stężenia BP w porównaniu do UMU Testu. Stosując do aktywacji frakcję S9 pochodzącą z wątrób myszy (wyniki nie prezentowane) zamiast frakcji S9 szczurzej uzyskano zbliżoną aktywację BP.

3.3. METYLOCHOLANTREN

Analizując wyniki uzyskane dla 3-MC w teście SOS Chromotest oraz UMU teście (rys. 3) można stwierdzić, że w obu testach lepszą aktywację 3-MC uzyskano stosując frakcję mysią zamiast szczurzej. Różnica ta jest wyraźniejsza w teście SOS Chromotest. SOS Chromotest charakteryzował się większą czułością w stosunku do 3-MC w porównaniu do UMU Testu. SOS Chromotest wykrywał jako genotoksyczne niższe stężenia 3-MC niż UMU Test a wartości współczynnika IF (SOS Chromotest) były znacząco wyższe niż wartości współczynnika IR (UMU Test) dla odpowiednich stężeń. Natomiast UMU Test pozwalał na oznaczanie wyższych stężeń niż SOS Chromotest. Stężenia 3-MC 50 i 100 $\mu\text{g/ml}$, które w SOS Chromotest były identyfikowane jako toksyczne nie były toksyczne dla szczepu *S.typhimurium* w UMU Test.

3.4. AMINOANTRACEN

Wyniki IF (SOS Chromotest) dla 2-aminoantracenu (rys. 4) są znacznie niższe od wartości IR (UMU Test). Tak więc SOS Chromotest, w tym przypadku, jest testem mniej czułym niż UMU Test. W obu testach nie stwierdzono różnic w aktywacji 2-AA frakcją S9 mysią (dane nie prezentowane) i szczurzą.

3.5. AFLATOKSYNA B₁

Analizując wyniki dla AFB₁ (rys. 5) można stwierdzić, że wartości IF (SOS Chromotest) są znacznie wyższe od wartości IR (UMU Test). Tak więc SOS Chromotest jest testem czulszym dla AFB₁ ale w wyższych stężeniach - powyżej 0,15 µg/ml – obserwuje się silne toksyczne właściwości w stosunku do *E.coli*. UMU Test choć mniej czuły pozwala testować wyższe stężenia AFB₁. W obu testach frakcja S9 mysia aktywuje lepiej w porównaniu z frakcją szczurzą. Wyjątek stanowią w UMU Teście niskie stężenia AFB₁ do 0,1 µg/ml, gdzie frakcja szczurza aktywuje lepiej.

3.6. SINICE

Zakwity sinicowe są istotnym problemem w wielu krajach poprzez wpływ na jakość wody pitnej.

Ekstrakty sinicowe zostały przygotowane z próbek sinic pobranych w sierpniu oraz wrześniu 2004 roku oraz w sierpniu, wrześniu oraz październiku 2005 roku ze Zbiornika Sulejowskiego, Zbiornika Jeziorsko oraz Jeziora Bnińskiego. Wszystkie pobrane próbki ze Zbiornika Jeziorsko oraz z jeziora Bnińskiego wykazywały działanie genotoksyczne, natomiast próbki pobrane ze Zbiornika Sulejowskiego wykazywały bardzo słabe własności genotoksyczne w porównaniu z próbkami z innych zbiorników oraz charakteryzowały się sezonową zmiennością (próbki pobrane w pierwszym tygodniu sierpnia i września nie były genotoksyczne, natomiast pozostałe wykazywały działanie genotoksyczne) (rys. 6, 7, 8). Natomiast żadna z próbek nie wykazywała właściwości genotoksycznych w UMU teście zarówno w oznaczeniach bez jak i z aktywacją metaboliczną.

3.7. GLEBA

Próbki gleby otrzymano dzięki uprzejmości Instytutu Ekologii Terenów Uprzemysłowionych w Katowicach. Pochodziły one z terenów zanieczyszczonych (wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi oraz metalami ciężkimi) poddanych rekultywacji

Ekstrakcję zanieczyszczeń z próbek gleby przeprowadzono metodą nieorganiczną używając solanki (30% roztwór DMSO w 0,85% roztworze NaCl) oraz metodą organiczną (heksan:aceton - 2:1).

W SOS Chromotest wśród próbek poddanych ekstrakcji metodą nieorganiczną wartości współczynnika IF większe lub równe 1,5 uzyskano dla 4 próbek w oznaczeniu bez aktywacji metabolicznej oraz dla 5 próbek w oznaczeniu z aktywacją metaboliczną (tab. 1). Po ekstrakcji organicznej nieco więcej próbek wykazywało właściwości genotoksyczne, odpowiednio 7 bez S9 i 5 z S9. W teście UMU Test dla żadnej z próbek zarówno przy ekstrakcji nieorganicznej jak i organicznej, w oznaczeniach bez i z aktywacją nie uzyskano wartości współczynnika

IR większej niż 1,5 co oznacza, że żadna z próbek nie wykazała właściwości genotoksycznych w tym teście (dane nie prezentowane).

4. WNIOSKI

W zależności od związku chemicznego SOS Chromotest lub UMU Test wykazują różną czułość - dla 4-NQO, BP, 3-MC, AFB1 wyższą SOS Chromotest, dla 2-AA UMU Test. Frakcja S9 mysia silniej aktywuje AFB1 oraz 3-MC w porównaniu z frakcją szczurzą, natomiast w przypadku BP oraz 2-AA aktywacja dla obu frakcji jest porównywalna.

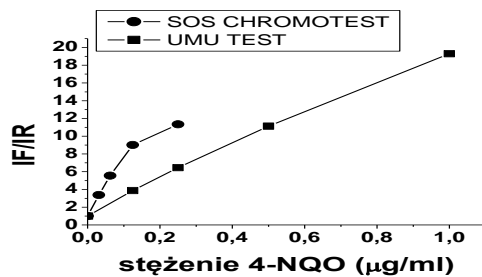
Tylko SOS Chromotest wykrywał właściwości genotoksyczne ekstraktów sinicowych oraz skażonej gleby. Przydatność UMU Test do badania próbek sinic i gleby jest dyskusyjna i wymaga dalszych pogłębionych badań.

5. WYKRESY I TABELE

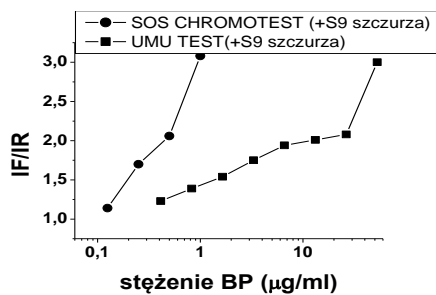
Tab.1. SOS Chromotest; maksymalne wartości współczynnika IF z i bez aktywacji dla próbek gleb ekstrahowanych solanką lub warstwą organiczną. Próbki 1-5 zanieczyszczone metalami; 6-12 WWA

Pola zacieniowane – próbka genotoksyczna; frakcja S9 szczurza

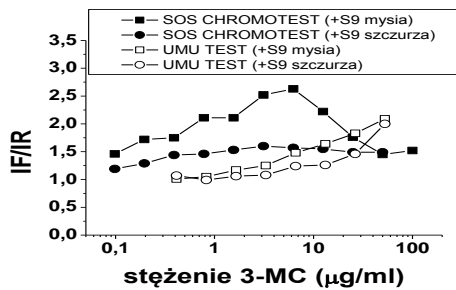
Lp	IF - S9 solanka	IF + S9 solanka	IF - S9 organiczna	IF + S9 organiczna
1.	1,38	1,41	1,91	1,50
2.	1,44	1,88	1,85	1,25
3.	1,54	1,76	1,83	1,54
4.	1,26	1,80	1,98	1,42
5.	1,12	1,31	1,61	1,63
6.	1,08	1,51	2,45	1,43
7.	1,58	1,89	1,50	1,31
8.	1,97	1,29	1,22	1,60
9.	0,98	1,33	1,18	1,28
10.	1,10	1,04	1,22	1,77
11.	1,50	1,29	1,29	1,25
12.	1,17	1,10	1,29	1,39



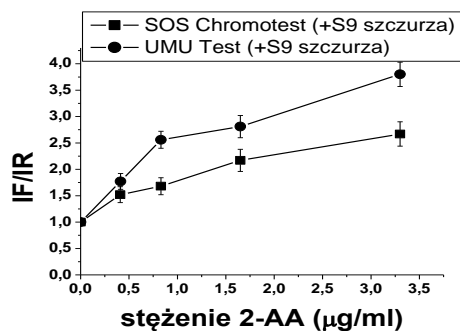
Rys. 1. Wartości IF (SOS Chromotest) i IR (UMU Test) dla wzrastających stężeń 4-NQO



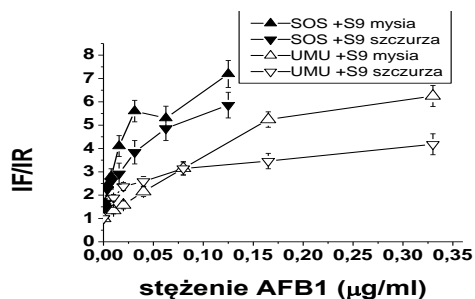
Rys. 2. Wartości IF (SOS Chromotest) i IR (UMU Test) dla wzrastających stężeń BP



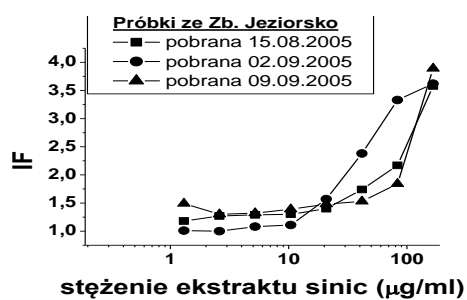
Rys. 3. Wartości IF (SOS Chromotest) i IR (UMU Test) dla wzrastających stężeń 3-MC



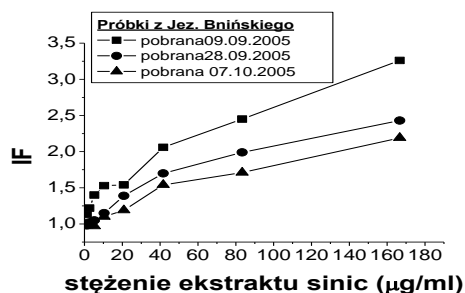
Rys. 4. Wartości IF (SOS Chromotest) i IR (UMU Test) dla wzrastających stężeń 2-aminoantracenu (2-AA)



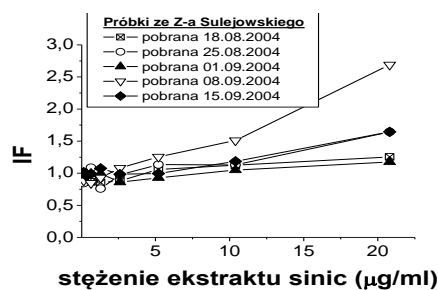
Rys. 5. Wartości IF (SOS Chromotest) i IR (UMU Test) dla wzrastających stężeń aflatoksyny B1 (AFB₁)



Rys. 6. Wartości IF (SOS Chromotest) dla wzrastających stężeń ekstraktu sinicowego



Rys. 7. Wartości IF (SOS Chromotest) dla wzrastających stężeń ekstraktu sinicowego



Rys. 8. Wartości IF (SOS Chromotest) dla wzrastających stężeń ekstraktu sinicowego

LITERATURA

- [1] ISO/CD 13829: Water quality Determination of the genotoxicity of water and waste water using the *Umu* test.
- [2] Mortelmans K., Zeiger E. (2000) *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay*. Mut. Res. 455: 29-60.
- [3] Quillardet P.; Hofnung M. (1985) *The SOS chromotest a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures*. Mutation Res. 147 : 65-78.

THE ESTIMATION OF USEFULNESS OF TWO SHORT TERM BACTERIAL TESTS: SOS CHROMOTEST AND UMU TEST IN GENOTOXICITY INVESTIGATION OF CHEMICAL COMPOUNDS AND ENVIRONMENTAL SAMPLES

The SOS Chromotest and UMU test are simple, bacterial colorimetric assays for genotoxicity. Results of our experiments indicate that in spite of similar principle and similar test effect both test shows different sensitivity relatively to tested samples. In both test for promutagens/procarcinogens an appropriate, exogenous metabolic activation system (S9) is required. In our laboratory we use S9 fraction from Sprague-Dawley rats and B10.A mouse. The present data indicate that compounds should be tested with metabolic activation using S9 fraction from different species of animals which allow to increase the sensitivity and specificity of tests.