

*Słowa kluczowe: aglomeracja miejska, frakcja PM10, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), nitro- WWA, test Salmonella, linia komórek ludzkich raka płuc A549*

Katarzyna PIEKARSKA\*, Marzena ZACIERA\*\*, Anna CZARNY\*\*\*,  
Ewa ZACZYŃSKA\*\*\*

## **WŁAŚCIWOŚCI MUTAGENNE I CYTOTOKSYCZNE EKSTRAKTÓW PYŁU ZAWIESZONEGO POBRANEGO NA TERENIE WROCŁAWIA**

Testem *Salmonella*, prowadzonym w obecności szczepów TA98 i YG1041, oraz testem na linii komórek ludzkich raka płuc A549 stwierdzono mutagenność i cytotoksyczność zanieczyszczeń organicznych i ich frakcji zaadsorbowanych na cząstkach pyłu zawieszonego PM10 pobranego zimą i latem na terenie Wrocławia. Próbkę pyłu pobierano na filtry szklane przy pomocy wysoko-przepływowego aspiratora powietrza typu Staplex. Ekstrakcję przeprowadzono dichlorometanem w aparacie Soxhleta. Rozdziła na trzy frakcje: WWA, nitro-WWA i dinitro-WWA dokonano metodą chromatografii kolumnowej. Większy efekt mutagenny i cytotoksyczny stwierdzono w próbce pyłów pobranych w sezonie zimowym niż w letnim. W badanych próbkach stwierdzono obecność zanieczyszczeń mogących oddziaływać bezpośrednio i pośrednio na materiał genetyczny. W większości testów uzyskano niższe wartości współczynnika mutagenności (MR) w obecności frakcji badanych zanieczyszczeń w porównaniu do wartości MR uzyskanych dla całkowitych ekstraktów. Efektu mutagennego nie stwierdzono dla frakcji pochodzących z próbki pyłów pobranych latem badanych z aktywacją metaboliczną. Najwięcej związków wywołujących efekt toksyczny było obecnych w próbce pobranej zimą i w frakcji zimowej nitro-WWA oraz w frakcji letniej nitro-WWA i dinitro-WWA.

### 1. WSTĘP

Obecnie w środowisku znajduje się wiele tysięcy substancji wykazujących działanie toksyczne, mutagenne i potencjalnie nowotworowe. W wyniku działalności człowieka stale pojawiają się nowe, niebezpieczne związki we wszystkich elementach środowiska [1]. Zanieczyszczenia powietrza stanowią bardzo zróżnicowaną mieszaninę związków chemicznych.

---

\* Zakład Biologii i Ekologii Instytutu Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, katarzyna.piekarska@pwr.wroc.pl

\*\* Zakład Szkodliwości Chemicznych, Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, ul. Kościelna 13, 41- 200 Sosnowiec

\*\*\* Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53- 114 Wrocław

Część z nich adsorbuje się na różnej wielkości cząstkach pyłu i wraz z nimi może przedostać się do układu oddechowego, a następnie przez pęcherzyki płucne do układu krwionośnego i tą drogą mogą rozprzestrzenić się po całym organizmie [2]. Wśród nich poważną grupę, stosunkowo dobrze poznaną, stanowią wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) – związki o działaniu mutagennym i kancerogennym. Dużą aktywnością mutageną charakteryzują się także nitrowe, chlorowe i tlenowe pochodne WWA [3]. Od średnicy cząstek pyłu zależy ich szkodliwość dla organizmu. Cząstki respirabilne (inhalacyjne), o średnicy <math><10\mu\text{m}</math>, utrzymują się przez dłuższy czas w atmosferze, co zwiększa prawdopodobieństwo przedostania się ich do układu oddechowego człowieka [4,5].

Wykrycie oraz identyfikacja zanieczyszczeń w oparciu o analizę chemiczną jest kosztowna i wymaga zastosowania nowoczesnych technik analitycznych. Wymusza to konieczność rozpatrywania mutagenności i toksyczności mieszanin, a nie pojedynczych związków stanowiących zanieczyszczenie środowiska. Tylko na podstawie wyników uzyskanych metodami biologicznymi można otrzymać wiarygodne informacje odnośnie ich działania na organizm żywy, ponieważ wiele substancji wykazuje działanie synergistyczne lub antagonistyczne [6].

W badaniach nad oceną mutagenności zanieczyszczeń powietrza znalazł zastosowanie krótkoterminowy bakteryjny test *Salmonella* (test Ames) [7,8]. Do badań toksyczności zanieczyszczeń powietrza w warunkach *in vitro* wykorzystuje się także różne linie komórkowe, np. komórki nabłonkopodobne ludzkiego raka płuc-A549. Przydatność linii komórkowych do oceny właściwości cytotoksycznych cząstek respirabilnych została potwierdzona w wielu badaniach [9].

Celem niniejszej pracy była ocena mutagenności i cytotoksyczności zanieczyszczeń organicznych zaadsorbowanych na cząstkach pyłu zawieszonego frakcji PM<sub>10</sub> pobranego zimą i latem na terenie miasta Wrocławia.

## 2. MATERIAŁY I METODY

Materiał do badań stanowiły próbki pyłu pobierane na filtry szklane za pomocą wysoko-przepływowego aspiratora powietrza typu Staplex PM-10. Próbki pyłów pobierano na stanowisku usytuowanym w dzielnicy Stare Miasto w miejscu o natężonym ruchu samochodowym. Próbki pobierano w sezonie letnim (od maja do września) i w sezonie zimowym (od listopada do marca). Filtry wraz z pyłami ekstrahowano w aparatach Soxhleta dichlorometanem bez dostępu światła, przez 16 godzin z 15 minutowym refluksiem [10]. Następnie ekstrakty zagęszczano do sucha w wyparce próżniowej, a na koniec przedmuchiwano azotem. Uzyskane tą drogą suche ekstrakty poddawane były analizie w celu oznaczenia w nich zawartości WWA, nitro-WWA i dinitro-WWA oraz wykorzystywane były jako materiał do testów biologicznych.

Surowy ekstrakt frakcjonowano na kolumnach szklanych wypełnionych żelazem krzemionkowym zgodnie z metodyką podaną przez Zaciera M. [11].

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną, natomiast zawartość nitro-WWA techniką chromatografii gazowej z detekcją mas.

Suchą pozostałość ekstraktów pyłów przeznaczoną do badań biologicznych rozpuszczano w sterylnym dimetylosulfotlenku (DMSO) w taki sposób by w 1cm<sup>3</sup> roztworu podstawowego znajdowały się zanieczyszczenia pochodzące z 1000m<sup>3</sup> powietrza. Do testów wprowadzano wszystkie organiczne zanieczyszczenia (C) obecne w pobranych próbkach oraz zanieczyszczenia zawarte w trzech frakcjach: WWA (II), nitropochodnych WWA (III) i dinitropochodnych WWA (IV).

W teście *Salmonella*, wykonywanym zgodnie z zaleceniami autorów [8], stosowano dwa szczepy: TA98 i YG1041 w wariantach bez i z aktywacją metaboliczną frakcją mikrosomalną S9. Wszystkie analizy wykonywano w pięciu powtórzeniach. Próby inkubowano 48 godzin (TA98) lub przez 72 godziny (YG1041) w temperaturze 37°C. Po tym czasie określano liczbę kolonii rewertantów (his<sup>+</sup>) rosnących na płytkach Petriego. Efekt mutageny ekstraktów pyłów zawieszonych przedstawiono w postaci współczynnika mutagenności (MR), czyli ilorazu średniej liczby rewertantów wyrosłych w obecności badanej próbki i średniej liczby rewertantów spontanicznych. Za mutagenne uznawano próbki dla których współczynnik mutagenności MR był  $\geq 2$ .

Badania cytotoksycznego działania ekstraktów przeprowadzono metodą bezpośredniego kontaktu z jednowarstwową hodowlą komórek nabłonkopodobnych ludzkiego raka płuc–A549 (American Type Culture Collection, Cell Culture Line-ATCC CCL 185). Na plastikowych, 96-dółkowych płytkach założono jednowarstwową hodowlę komórek A549 o gęstości 2x10<sup>6</sup>/ml i inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Po tym czasie usuwano płyn z nad komórek, a na jednowarstwową hodowlę komórek nanoszono odpowiednie stężenia badanych ekstraktów i inkubowano 24, 48 i 72 godziny w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Kontrolę stanowiły hodowle komórek bez dodatku badanych próbek oraz hodowle komórek z dodatkiem DMSO w takiej samej ilości jak w próbkach badanych. Zmiany ilościowe i morfologiczne, pod wpływem badanych ekstraktów, oceniono po 24, 48 i 72 godzinach w odwróconym mikroskopie. Minimalne stężenie badanych próbek, które powodowało degenerację 50% komórek uznawano za dawkę toksyczną (TCCD<sub>50</sub>-Tissue Culture Cytotoxic Dose) [12]. Wyniki testu cytotoksycznego przedstawiono w postaci ilości m<sup>3</sup> badanego powietrza z którego uzyskany ekstrakt wywoływał jeszcze efekt toksyczny.

### 3. Dyskusja wyników

Na wybranym stanowisku badawczym we Wrocławiu stężenia pyłu zawieszonego PM10 wahały się w zakresie od 43,74µg/m<sup>3</sup> do 57,84 µg/m<sup>3</sup>, natomiast stężenia zaadsorbowanych na pyłe zawieszonym związków organicznych (substancje smołowe) w zakresie od 7,56 µg/m<sup>3</sup> do 17,57 µg/m<sup>3</sup> (tab. 1). Stężenia pyłu

zawieszonych i zaadsorbowanych na nim zanieczyszczeń organicznych były wyższe zimą niż latem. Stwierdzone sezonowe różnice pomiędzy ich zawartością pokrywają się z doniesieniami literaturowymi [7]. Różnice te wynikają głównie z faktu zwiększonej emisji pyłów w okresie zimowym na terenie aglomeracji miejskich, pochodzących z procesów spalania na cele grzewcze. Otrzymana ilość pyłu frakcji PM10 była zbliżona do wartości zmierzonych w różnych miastach europejskich [13–16,17].

Tab. 1. Dane dotyczące poboru próbek powietrza

| Rodzaj próbki       | Czas poboru [h] | Objętość powietrza [m <sup>3</sup> ] | Masa pyłów [μg/m <sup>3</sup> ] | Masa substancji smołowych [μg/m <sup>3</sup> ] |
|---------------------|-----------------|--------------------------------------|---------------------------------|--|
| Zima (Stare Miasto) | 960             | 122 326,0                            | 57,8428                         | 17,57  |
| Lato (Stare Miasto) | 1669            | 161 004,0                            | 43,737                          | 7,56   |

Największą ilość zaadsorbowanych na pyłach WWA odnotowano w zimie (tab. 2). Suma wykrytych WWA w tym okresie wynosiła 40,670 ng/m<sup>3</sup>. Z kolei w próbce pyłów pobranych latem 7,447 ng/m<sup>3</sup>. Wśród obecnych w ekstraktach WWA były trzy (benzo[a]antracen, benzo[a]piren, dibenzo[a,h]antracen) klasyfikowane przez IARC (Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem) jako należące do grupy węglowodorów prawdopodobnie rakotwórczych dla ludzi (2A) oraz trzy (beno[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten, indeno[1,2,3-c,d]piren) zaklasyfikowane do grupy 2B, przypuszczalnie rakotwórczej dla ludzi [18]. Zarówno sumaryczna zawartość WWA jak i też ich profil był zgodny z doniesieniami literaturowymi dotyczącymi innych miast europejskich [13-16]. Z kolei suma stężeń nitrowych pochodnych WWA (tab.2) zawierała się w granicach od 3,43 ng/m<sup>3</sup> do 1,6 ng/m<sup>3</sup>. Najbardziej bogaty profil tych związków uzyskano w próbce pobranej zimą. W ekstraktach nie stwierdzono występowania badanych dinitropochodnych WWA w granicach ich oznaczalności. Stwierdzono natomiast występowanie mononitropochodnych WWA, wśród których obecne były należące do grupy 2B 2-nitrofluoren i 1-nitopiren. 2-nitrofluoren występował w obu badanych próbkach, natomiast obecność 1-nitopirenu stwierdzono tylko w próbce pobranej zimą.

We wszystkich testach *Salmonella* najwyższe wartości współczynnika mutagenności (MR) (tab. 3) otrzymano dla próbki pobranej w okresie zimowym. Taką samą zmienność sezonową obserwuje się w innych krajach [7]. Mutageny obecne w badanych ekstraktach pyłów wywoływały wyższą odpowiedź ze strony szczepu YG1041 w porównaniu do szczepu TA98, co oznacza, że były to głównie nitrowe związki aromatyczne na które szczep YG1041 jest wrażliwy [19].

W badaniach przeprowadzonych ze szczepem TA98 (tab. 3) najwyższe wartości MR (np. MR=19,68 przy 50m<sup>3</sup>/płytkę) uzyskano dla całkowitego ekstraktu próbki pobranej w okresie zimowym badanej bez aktywacji metabolicznej.

Tab. 2. Wartości stężeń badanych WWA i nitro- WWA w organicznych ekstraktach pyłów zawieszonych

| Badany WWA              | Zima (Stare Miasto) | Lato (Stare Miasto) | Badany nitro-WWA   | Zima (Stare Miasto) | Lato (Stare Miasto) |
|-------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Fenantren               | 3,127               | 0,855               | 1-nitronaftalen    | 0,58                | 0,47                |
| Antraceni               | 0,360               | 0,044               | 2-nitrofluoreni    | 1,88                | 0,31                |
| Fluoranteni             | 7,488               | 1,069               | 9-nitroantraceni   | 0,87                | 0,52                |
| Pireni                  | 8,340               | 0,988               | 3-nitrofluoranteni | 0,50                | n.w.                |
| Benzo[a]antraceni       | 3,144               | 0,286               | 1-nitropireni      | 0,48                | n.w.                |
| Chryzeni                | 1,911               | 0,343               | 1,3-dinitropireni  | n.w.                | n.w.                |
| Benzo[b]fluoranteni     | 2,832               | 0,955               | 1,6-dinitropireni  | n.w.                | n.w.                |
| Benzo[k]fluoranteni     | 1,702               | 0,267               | 1,8-dinitropireni  | n.w.                | n.w.                |
| Benzo[a]pireni          | 7,980               | 0,765               |                    |                     |                     |
| Dibenzo[a,h]antraceni   | 0,284               | 0,112               |                    |                     |                     |
| Benzo[g,h,i]terylene    | 1,776               | 1,233               |                    |                     |                     |
| Indeno[1,2,3-c,d]pireni | 1,726               | 0,530               |                    |                     |                     |
| SUMA                    | 40,670              | 7,447               | SUMA               | 3,43                | 1,6                 |

n.w.- nie wykryto

Ekstrakt ten zawierał więc większe ilości mutagenów bezpośrednich typu zmiany fazy odczytu niż mutagenów pośrednich. Najniższe stężenie ekstraktu próbki zimowej, które we wszystkich testach (-F, +F) wywołało efekt mutageny (MR $\geq$ 2) wynosiło 1,56 m<sup>3</sup>/płytkę. Z kolei wartości MR uzyskane w testach prowadzonych w obecności poszczególnych frakcji pyłów (II, III, IV) były dużo niższe ( np. MR=3,71; MR=5,46; MR=3,9 przy 50m<sup>3</sup>/płytkę), przy czym najwyższe wartości współczynnika mutagenności uzyskano dla frakcji nitro-WWA. Całkowity ekstrakt próbki pobranej w okresie letnim charakteryzował się niższymi wartościami MR w stosunku do wyników jakie uzyskano dla próbki pobranej w zimie. Najniższe stężenie ekstraktu pyłów pobieranych w lecie, które wywoływało efekt mutageny, w badaniach prowadzonych bez i z aktywacją metaboliczną, zawierało zanieczyszczenia pochodzące z 12,5m<sup>3</sup> powietrza. Testy prowadzone na poszczególnych frakcjach pyłów letnich nie wykazały obecności związków o charakterze mutagenym w badaniach z aktywacją metaboliczną. Z kolei w testach bez aktywacji metabolicznej efekt mutageny uzyskano jedynie w przypadku frakcji zawierającej WWA i nitro-WWA. W przypadku badań prowadzonych ze szczepem YG1041 (tab. 3) otrzymano bardzo wysokie wartości współczynnika MR, zwłaszcza w testach z próbką pobraną zimą. Największe wartości MR (MR<sub>-F</sub>=35,50 przy 3,125m<sup>3</sup>/płytkę i MR<sub>+F</sub>=46,21 przy 12,5m<sup>3</sup>/płytkę) uzyskano w badaniach z udziałem ekstraktu pyłów zimowych. Szczep ten, będący pochodną szczepu TA98, charakteryzuje się zwiększoną wrażliwością na nitrowe, aminowe i hydroksyloaminowe pochodne WWA, ze względu na obecność w jego komórkach plazmidów związanych z nadprodukcją nitroreduktazy i O-acetylotransferazy [19].

W badanym zakresie stężeń zanieczyszczeń powietrza zaobserwowano dla tego szczepu wyraźną zależność dawka-odpowiedź, co w pełni ilustrowało biologiczny efekt działania zanieczyszczeń obecnych w próbkach w zależności od ich stężenia.

Tab. 3. Wartości MR ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza badanych szczepem TA98 i YG 1041 w wariancie z S9 (+F) oraz bez S9 (-F)

| [m <sup>3</sup> /<br>płytkę] | Rodzaj próby                       |             |             |             |              |             |             |             |                                   |             |             |             |             |      |      |      |
|------------------------------|------------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|------|------|
|                              | Zima Stare Miasto ( ul. Wierzbowa) |             |             |             |              |             |             |             | Lato Stare Miasto (ul. Wierzbowa) |             |             |             |             |      |      |      |
|                              | TA 98                              |             |             |             |              |             |             |             |                                   |             |             |             |             |      |      |      |
|                              | -F                                 |             |             |             | +F           |             |             |             | -F                                |             |             |             | +F          |      |      |      |
| C                            | II                                 | III         | IV          | C           | II           | III         | IV          | C           | II                                | III         | IV          | C           | II          | III  | IV   |      |
| 50                           | <b>19,68</b>                       | <b>3,71</b> | <b>5,46</b> | <b>3,90</b> | <b>12,76</b> | <b>2,77</b> | <b>3,38</b> | <b>2,71</b> | <b>4,90</b>                       | <b>2,22</b> | <b>2,91</b> | 1,72        | <b>3,29</b> | 1,40 | 1,46 | 1,89 |
| 25                           | <b>15,64</b>                       | <b>2,38</b> | <b>4,86</b> | <b>3,25</b> | <b>8,85</b>  | 1,71        | <b>2,39</b> | <b>2,15</b> | <b>2,58</b>                       | 1,89        | <b>2,44</b> | 1,56        | <b>2,68</b> | 1,27 | 1,37 | 1,45 |
| 12,5                         | <b>11,05</b>                       | 1,23        | <b>3,67</b> | <b>2,03</b> | <b>6,63</b>  | 1,69        | 1,95        | 1,88        | <b>2,24</b>                       | 1,72        | <b>2,34</b> | 1,29        | <b>2,27</b> | 1,17 | 1,35 | 1,38 |
| 6,25                         | <b>7,25</b>                        | 1,07        | <b>2,21</b> | 1,22        | <b>4,93</b>  | 1,41        | 1,88        | 1,55        | 1,67                              | 1,58        | <b>2,18</b> | 1,19        | 1,58        | 1,14 | 1,33 | 1,36 |
| 3,125                        | <b>3,35</b>                        | 1,01        | 1,51        | 1,07        | <b>3,59</b>  | 1,41        | 1,57        | 1,25        | 1,43                              | 1,47        | 1,78        | 1,05        | 1,40        | 1,02 | 1,29 | 1,18 |
| 1,56                         | <b>2,51</b>                        | 0,94        | 1,09        | n.b.        | <b>2,34</b>  | 1,23        | 1,28        | 1,11        | 1,37                              | 1,11        | 1,14        | 0,95        | 1,25        | 1,00 | 1,11 | 0,99 |
| 0,78                         | 1,76                               | 0,86        | 0,99        | n.b.        | 1,66         | 1,16        | 1,26        | n.b.        | 1,06                              | n.b.        | n.b.        | n.b.        | 1,29        | n.b. | n.b. | n.b. |
| 0,39                         | 1,55                               | 0,83        | 0,96        | n.b.        | 1,39         | 1,15        | 1,18        | n.b.        | 0,97                              | n.b.        | n.b.        | n.b.        | 1,01        | n.b. | n.b. | n.b. |
| 0,195                        | 0,98                               | 0,79        | 0,94        | n.b.        | 1,05         | 1,13        | 1,17        | n.b.        | 0,97                              | n.b.        | n.b.        | n.b.        | 1,01        | n.b. | n.b. | n.b. |
| 0,097                        | n.b.                               | 0,72        | 0,86        | n.b.        | n.b.         | 0,93        | 1,09        | n.b.        | n.b.                              | n.b.        | n.b.        | n.b.        | n.b.        | n.b. | n.b. | n.b. |
|                              | YG1041                             |             |             |             |              |             |             |             |                                   |             |             |             |             |      |      |      |
| 50                           | <b>4,39</b>                        | <b>3,30</b> | <b>4,12</b> | <b>2,7</b>  | <b>5,91</b>  | <b>2,90</b> | <b>3,40</b> | <b>2,80</b> | <b>3,49</b>                       | <b>7,84</b> | <b>9,93</b> | <b>2,77</b> | <b>3,23</b> | 1,86 | 1,83 | 1,91 |
| 25                           | <b>8,30</b>                        | <b>3,36</b> | <b>5,16</b> | <b>4,8</b>  | <b>12,83</b> | <b>3,43</b> | <b>5,65</b> | <b>4,64</b> | <b>3,93</b>                       | <b>5,08</b> | <b>5,70</b> | <b>2,18</b> | <b>4,95</b> | 1,56 | 1,59 | 1,74 |
| 12,5                         | <b>29,24</b>                       | <b>4,78</b> | <b>7,80</b> | <b>5,67</b> | <b>46,21</b> | <b>7,82</b> | <b>9,81</b> | <b>2,65</b> | <b>4,14</b>                       | <b>3,39</b> | <b>3,88</b> | 1,76        | <b>2,09</b> | 1,32 | 1,42 | 1,50 |
| 6,25                         | <b>31,50</b>                       | <b>5,08</b> | <b>10,3</b> | <b>4,66</b> | <b>36,77</b> | <b>5,10</b> | <b>7,54</b> | 1,24        | <b>5,93</b>                       | 1,94        | <b>2,74</b> | 1,62        | 1,70        | 1,24 | 1,28 | 1,23 |
| 3,125                        | <b>35,50</b>                       | <b>3,71</b> | <b>4,78</b> | <b>3,35</b> | <b>32,32</b> | <b>4,76</b> | <b>5,82</b> | 1,15        | <b>3,62</b>                       | 1,08        | <b>2,05</b> | 1,47        | 1,29        | 1,05 | 0,98 | 1,13 |
| 1,56                         | <b>30,88</b>                       | <b>2,20</b> | <b>4,09</b> | <b>2,8</b>  | <b>20,46</b> | <b>3,77</b> | <b>3,61</b> | 0,98        | <b>2,09</b>                       | n.b.        | 1,87        | 1,22        | 1,18        | n.b. | n.b. | n.b. |
| 0,78                         | <b>26,31</b>                       | 1,67        | <b>3,35</b> | 1,67        | <b>11,51</b> | <b>2,10</b> | <b>2,12</b> | 1,02        | 1,76                              | n.b.        | 1,54        | 1,08        | 1,00        | n.b. | n.b. | n.b. |
| 0,39                         | <b>20,96</b>                       | 1,17        | <b>2,12</b> | 1,10        | <b>5,22</b>  | 1,29        | 1,36        | n.b.        | 1,24                              | n.b.        | 1,24        | n.b.        | n.b.        | n.b. | n.b. | n.b. |
| 0,195                        | <b>12,93</b>                       | 1,02        | 1,67        | 0,98        | <b>4,03</b>  | 1,06        | 1,17        | n.b.        | 1,03                              | n.b.        | 1,09        | n.b.        | n.b.        | n.b. | n.b. | n.b. |
| 0,097                        | <b>5,52</b>                        | n.b.        | 1,23        | n.b.        | <b>2,80</b>  | 0,92        | n.b.        | n.b.        | 1,09                              | n.b.        | n.b.        | n.b.        | n.b.        | n.b. | n.b. | n.b. |
| 0,049                        | 1,77                               | n.b.        | 1,09        | n.b.        | 0,91         | n.b.        | n.b.        | n.b.        | 0,93                              | n.b.        | n.b.        | n.b.        | n.b.        | n.b. | n.b. | n.b. |

C- całość próbki; II- frakcja WWA; III- frakcja nitro-WWA; IV- frakcja dinitro-WWA; n.b.- nie badano

Uzyskano także maksymalne ilości rewertantów dla niższych stężeń badanych ekstraktów w porównaniu do ilości rewertantów otrzymanych w analogicznych stężeniach w badaniach ze szczepem TA98. Efekt mutagenny, zarówno w testach przeprowadzonych z aktywacją metaboliczną jak i bez niej, zaobserwowano już przy stężeniu ekstraktu pochodzącego z 0,097m<sup>3</sup>. Z kolei wartości MR uzyskane w obecności poszczególnych frakcji pyłów były dużo niższe w porównaniu do wartości MR uzyskanych dla ekstraktu całkowitego, większe jednak niż w badaniach ze szczepem TA98. W przypadku próbki pyłów pobranych latem maksymalną wartość MR (5,93) w badaniach bez S9 uzyskano dla ekstraktu pochodzącego z 6,25m<sup>3</sup> powietrza, a w badaniach z aktywacją metaboliczną z 25m<sup>3</sup> powietrza (MR=4,95). Również w przypadku tej próbki we wszystkich badaniach stwierdzono występowanie efektu toksycznego na krzywej dawka-odpowiedź. Z kolei efekt mutagenny zaobserwowano w wyższych badanych stężeniach ekstraktu w porównaniu do

ekstraktu próbki pobranej zimą. W teście przeprowadzonym bez S9 zanieczyszczenia pochodzące z 1,56m<sup>3</sup> powietrza były mutagenne, a w teście z aktywacją metaboliczną z 12,5m<sup>3</sup> powietrza. Testy prowadzone na poszczególnych frakcjach pyłów pobranych latem nie wykazały, podobnie jak w badaniach na szczepie TA98, obecności związków o charakterze mutagennym w badaniach z aktywacją metaboliczną. Z kolei w testach bez aktywacji metabolicznej efekt mutagenny uzyskano dla wszystkich frakcji, a w przypadku frakcji zawierającej WWA i nitro-WWA uzyskane wartości MR były większe od uzyskanych wartości MR dla ekstraktu całkowitego.

W tabeli 4 umieszczono wyniki badań dotyczące wpływu badanych ekstraktów pyłów na komórki nowotworowe raka płuc A549. Ze względu na znaczną powierzchnię czynną płuc resorpcja zanieczyszczeń powietrza zachodzi z dużą intensywnością głównie w pęcherzykach płucnych. Badania prowadzone *in vitro* i *in vivo* nad mechanizmem wpływu pyłu zawieszonego na organizm żywy dowiodły, iż pył zawieszony jest odpowiedzialny za wywoływanie w komórkach nabłonkowych układu oddechowego stanu zapalnego i oksydacyjnego stresu [20]. Stres oksydacyjny polega na tym, że katalizowane są reakcje chemiczne, w wyniku których powstają aktywne formy tlenu (rodniki tlenowe). Rodniki tlenowe dokonują poważnych uszkodzeń biocząsteczek, w tym uszkodzeń cząsteczek DNA. Uszkodzone komórki jeżeli nie zostaną wyeliminowane we wczesnej fazie przez układ immunologiczny, zaczynają proliferować, co w efekcie może prowadzić do powstania nowotworu.

W prezentowanych badaniach stwierdzono toksyczne oddziaływanie zanieczyszczeń organicznych zaadsorbowanych na pyłach pobranych zarówno w zimie jak i w lecie na komórki linii A549 w warunkach *in vitro*. Stężenia powietrza wywołujące efekt toksyczny kształtowały się różnie w zależności od sezonu poboru próbki i badanej frakcji zanieczyszczeń (tab. 4).

W przypadku testów wykonanych na całkowitych ekstraktach otrzymano silniejszy efekt toksyczny dla ekstraktu pyłów pobranych zimą w porównaniu do efektu otrzymanego dla ekstraktu pyłów pobranych latem. Zarówno po 24, 48 i 72 godzinach obserwacji mniejsze dawki powietrza pobranego zimą (12,5; 6,25; 6,25m<sup>3</sup>) wywoływały efekt letalny 50% badanych komórek w stosunku do dawek powietrza pobranego latem (brak toksyczności; 25; 25m<sup>3</sup>). Podobną zmienność sezonową efektu cytotoksycznego obserwowano w wielu miastach [21,22]. Z kolei odmienne wyniki otrzymano kiedy do testu wprowadzano poszczególne badane frakcje zanieczyszczeń powietrza. Po 48 godzinach zarówno frakcja WWA, nitro-WWA i dinitro-WWA uzyskana z letniego ekstraktu wywoływała efekt toksyczny w dawce 12,5m<sup>3</sup>, a analogiczne frakcje pozyskane z zimowego ekstraktu pyłów w dawce 25m<sup>3</sup>. Najsilniejszy efekt toksyczny oznaczony na komórkach A549 stwierdzono po 72 godzinach oddziaływania całkowitego zimowego ekstraktu i jego frakcji WWA oraz frakcji letniej nitro-WWA i dinitro-WWA, pochodzących z 6,25m<sup>3</sup> powietrza.

Tab. 4. Działanie ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza na ludzkie komórki płuc linii A549 w warunkach *in vitro*

| Czas Kontaktu | Sezon poboru  | Rodzaj próbki | Efekt toksyczny [m <sup>3</sup> ] |    |      |      |       |      |      |      |
|---------------|---------------|---------------|-----------------------------------|----|------|------|-------|------|------|------|
|               |               |               | 50                                | 25 | 12,5 | 6,25 | 3,125 | 1,56 | 0,78 | 0,39 |
| 24            | Zima          | C             | t                                 | t  | t    | n    | n     | n    | n    | n    |
|               |               | II            | t                                 | t  | n    | n    | n     | n    | n    | n    |
|               |               | III           | t                                 | t  | n    | n    | n     | n    | n    | n    |
|               |               | IV            | t                                 | t  | n    | n    | n     | n    | n    | n    |
|               | Lato          | C             | n                                 | n  | n    | n    | n     | n    | n    | n    |
|               |               | II            | t                                 | t  | n    | n    | n     | n    | n    | n    |
|               |               | III           | t                                 | t  | n    | n    | n     | n    | n    | n    |
|               |               | IV            | t                                 | t  | t    | n    | n     | n    | n    | n    |
|               | Kontrola A549 |               | n                                 | n  | n    | n    | n     | n    | n    | n    |
|               | 48            | Zima          | C                                 | t  | t    | t    | t     | n    | n    | n    |
| II            |               |               | t                                 | t  | n    | n    | n     | n    | n    | n    |
| III           |               |               | t                                 | t  | n    | n    | n     | n    | n    | n    |
| IV            |               |               | t                                 | t  | n    | n    | n     | n    | n    | n    |
| Lato          |               | C             | t                                 | t  | n    | n    | n     | n    | n    | n    |
|               |               | II            | t                                 | t  | t    | n    | n     | n    | n    | n    |
|               |               | III           | t                                 | t  | t    | n    | n     | n    | n    | n    |
|               |               | IV            | t                                 | t  | t    | n    | n     | n    | n    | n    |
| Kontrola A549 |               | n             | n                                 | n  | n    | n    | n     | n    | n    |      |
| 72            |               | Zima          | C                                 | t  | t    | t    | t     | n    | n    | n    |
|               | II            |               | t                                 | t  | t    | n    | n     | n    | n    | n    |
|               | III           |               | t                                 | t  | t    | t    | n     | n    | n    | n    |
|               | IV            |               | t                                 | t  | t    | n    | n     | n    | n    | n    |
|               | Lato          | C             | t                                 | t  | n    | n    | n     | n    | n    | n    |
|               |               | II            | t                                 | t  | t    | n    | n     | n    | n    | n    |
|               |               | III           | t                                 | t  | t    | t    | n     | n    | n    | n    |
|               |               | IV            | t                                 | t  | t    | t    | n     | n    | n    | n    |
|               | Kontrola A549 |               | n                                 | n  | n    | n    | n     | n    | n    | n    |

C- całość próbki; II- frakcja WWA; III- frakcja nitro-WWA; IV- frakcja dinitro-WWA; n- próbka nietoksyczna; t- próbka toksyczna.

## WNIOSKI

1. Ekstrakty pyłowych zanieczyszczeń powietrza różniły się między sobą sumaryczną zawartością jak i procentowym udziałem poszczególnych związków chemicznych w zależności od sezonu poboru próbek.
2. Zastosowanie testu *Salmonella* i testu na linii komórek ludzkich A549 uzyskanych z komórek nowotworowych raka płuc umożliwiło ocenę mutagenności i cytotoksyczności pyłowych zanieczyszczeń powietrza pobranych zimą i latem na terenie Wrocławia.
3. Ekstrakty pyłowych zanieczyszczeń powietrza badane za pomocą testu *Salmonella* przy użyciu szczepu TA98 i jego pochodnej YG1041 charakteryzował wysoki poziom efektu mutagennego zarówno w testach przeprowadzanych z aktywacją metaboliczną jak i bez niej. Mutagenność pyłów zanieczyszczających powietrze była większa zimą niż latem.



4. Badania potwierdziły wysoką przydatność szczepu YG1041 w wykrywaniu mutagennego działania nitrowych pochodnych związków aromatycznych.
5. W większości przeprowadzonych testów *Salmonella* uzyskano większy efekt mutageny całkowitych ekstraktów pyłów w porównaniu do efektu uzyskanego dla poszczególnych jego frakcji (WWA, nitro-WWA i dinitro-WWA). W próbie pyłów pochodzących z sezonu letniego brak było mutagenów pośrednich we frakcjach, mimo iż były one obecne w ekstrakcie całkowitym.
6. Stwierdzono nieco silniejszy efekt cytotoksyczny w próbie pyłów pobranych w sezonie zimowym niż w letnim. Jednak najwięcej związków wywołujących ten efekt było obecnych w całkowitym ekstrakcie pyłów pobranych zimą i w jego frakcji nitro-WWA oraz w frakcji letniej nitro-WWA i dinitro-WWA.
7. Rzeczywiste zagrożenie zdrowotne związane z organicznymi zanieczyszczeniami zaadsorbowanymi na pyłe zawieszonym odzwierciedlają jedynie badania biologiczne, ponieważ uwzględniają one wypadkowy efekt działania zanieczyszczeń na organizmy żywe. Powinny więc zostać uwzględnione, razem z analizą chemiczną, w standardowym monitoringu zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego.

*Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006-2009 jako projekt badawczy Nr N305 096 31/3476*

#### LITERATURA

- [1] Brunekreef B., Holgate S.T. 2002. *Air pollution and health*. The Lancet, 360: 1233-1242.
- [2] Feilberg A., Nielsen T., Binderup M.L., Skov H., Poulsen M.W.B. 2002. *Observations of the effect of atmospheric processes on the genotoxic potency of airborne particulate matter*. Atmospheric Environment, 36: 4617-4625.
- [3] De Kok T.M.C.M., Driessens H.A.L., Hogervorst J.G.F., Briede J.J. 2006. *Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies*. Mutat.Res.-Rev.Mutat.Res., 613 (2-3): 103-122.
- [4] Künzli N., Kaiser R., Medina S., Studnicka M., Chanel O., Filliger P., Herry M., Horak Jr F., Puybonnieux-Texier V., Quénel P., Schneider J., Seethaler R., Vergnaud J.C., Sommer H. 2000. *Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment*. The Lancet, 356: 795-801.
- [5] Cohen A.J. 2000. *Outdoor air pollution and lung cancer*. Environmental Health Perspectives, 108 (4): 743-750.
- [6] Dehnen W., Pitz N., Tomingas R. 1997. *The mutagenicity of airborne particulate pollutants*. Cancer Lett., 4: 5-12.
- [7] Claxton L.D., Matthews P.P., Warren S.H., 2004. *The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity*. Mutation Research, 567: 347-399.
- [8] Maron D.M., Ames B.N. 1983. *Revised methods for the Salmonella mutagenicity test*. Mutation Res., 113: 173-215.
- [9] Claxton L.D., Woodall Jr.G.M. 2007. *A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air*. Mutation Research, 636: 36-94.
- [10] Lenicek J., Sekyra M., Badnarkova K., Benes I., Sipek F. 2000. *Fractionation and chemical analysis of urban air particulate extracts*. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 77(4): 269- 288.

- [11] Zaciera M. 2006. *Metoda oznaczania nitrowych pochodnych WWA w powietrzu*. W: Ochrona powietrza w teorii i praktyce. Pod red. J. Koniecznyńskiego. Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk w Zabrze.
- [12] Mendyka B., Radek P., Wargacka A., Czarny A., Zaczyńska E., Pawlik M. 2005. *Cytotoksyczność i mutagenność preparatów zawierających domieszkę estru metylowego oleju rzepakowego*. *Medycyna Środowiskowa*. 8 (2): 139-145.
- [13] Černa M., Pochamanova D., Pastorková, Beneš I., Leniček J., Topinka J., Binková B. 2000. *Genotoxicity of urban air pollutants in Czech Republic. Part I. Bacterial mutagenic potencies of organic compounds adsorbed on PM 10 particulates*. *Mutation.Res.*, 469: 71-82.
- [14] Du Four V.A., Janssen C.R., Brits E., Larebeke N.V. 2005. *Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples from different rural, urban and industrial sites in Flanders, Belgium*. *Mutat.Res.-Genet.Toxicol.Environ.Mutag.*, 588 (2): 106-117.
- [15] Brits E., Schoeters G., Verschaeve L. 2004. *Genotoxicity of PM 10 and extracted organic collected in an industrial, urban and rural area in Flanders, Belgium*. *Environ.Res.*, 96: 109-118.
- [16] Chorąży M., Szeliga J., Stróżyk M., Cimander B. 1994. *Ambient air pollutants in Upper Silesia: partial chemical composition and biological activity*. *Environmental Health Perspectives* 102, Supplement 4: 61-66.
- [17] Juda-Rezler. 2000. *Oddziaływanie zanieczyszczeń powietrza na środowisko*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
- [18] Nisbet I.C.T., LaGgy P.K. 1992. *Toxic (TETs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)*. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 16: 290- 300.
- [19] Watanabe M., Ishidate M. Jr. And Nohmi T. 1989. *A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of Salmonella typhimurium strains TA 98 i TA 100*. *Mutat. Res.* 216:211-220.
- [20] Risom L., Møller P., Loft S. 2005. *Oxidative stress- induced DNA damage by particulate air pollution*. *Mutat.Res.* 592: 119-137.
- [21] Gábelová A., Valovicová Z., Bacová G., Lábaj J., Binková B., Topinka J., Sevastyanova O, Šrám R.J., Kalina I., Habalová V., Popov T.A., Panev T., Farmer P.B. 2007. *Sensitivity of different endpoints for in vitro measurement of genotoxicity of extractable organic matter associated with ambient airborne particles (PM10)*. *Mutation Res.* 620: 103-13.
- [22] Gábelová A., Valovicová Z., Horváthová E., Slameňová D., Binkova B., Šrám R.J., Farmer P.B. 2004. *Genotoxicity of environmental air pollution in three European cities: Prague, Košice and Sofia*. *Mutation Res.* 563: 49-59.

#### MUTAGENIC AND CYTOTOXIC PROPERTIES OF EXTRACTS OF SUSPENDED PARTICULATE MATTER COLLECTED IN THE WROCLAW CITY AREA

Organic pollutants and fractions thereof adsorbed on the PM10 fraction of suspended dust particles from samples collected in winter and summer time alike in the Wrocław city area were found mutagenic and cytotoxic, which was proved by a *Salmonella* assay conducted in the presence of TA98 and YG1041 strains, and an assay conducted on the human lung adenocarcinoma cell line A549. Dust samples were taken on sintered glass filters using a high performance Staplex air aspirator. Extraction by dichloromethane was performed in a Soxhlet apparatus. A column chromatography method was applied to achieve separation into three fractions: PAH, nitro-PAH and dinitro-PAH. Particulate samples collected in a winter season showed higher mutagenic and cytotoxic effects than the samples collected in summer time. Pollutants capable of direct and indirect effecting on genetic material were found present in the examined samples. Mutagenicity ratio (MR) values obtained in majority of assays conducted in the presence of fractions of tested pollutants were lower as compared with the MR values obtained for the whole extracts. Only in case of fractions derived from the summer-collected particulate sample, when the assay was conducted with metabolic activation, no mutagenic effect was found. The largest amount of compounds giving the cytotoxic effect was found in the winter-collected whole extract and nitro-PAH fraction, and also in the summer-collected nitro-PAH and dinitro-PAH fractions.