

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

---

**AZ EMLŐ LAPHÁMSEJTEK ETILÉN-OXID EXPOZÍCIÓVAL SZEMBENI  
FOKOZOTT ÉRZÉKENYSÉGE**

**DR. ÁDÁM BALÁZS**

**TÉMAVEZETŐ  
PROF. DR. ÁDÁNY RÓZA**

**DEBRECENI EGYETEM  
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM  
NÉPEGÉSZSÉGÜGYI ISKOLA  
MEGELŐZŐ ORVOSTANI INTÉZET**

---

**DEBRECEN, 2005.**

## TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	2
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	4
3. CÉLKITŰZÉSEK .....	16
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	17
5. EREDMÉNYEK .....	23
6. MEGBESZÉLÉS.....	29
7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS AJÁNLÁSOK.....	33
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	34
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	35
10. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	40
11. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK.....	43

## 1. BEVEZETÉS

Az etilén-oxid (ETO) egyike a legismertebb epoxid vegyületeknek. Ennek az iparban számos helyen használt, igen reakcióképes vegyületnek a mutagén hatása régóta ismert. Karcinogenitását állatkísérletes adatok egyértelműen támasztják alá, s humán epidemiológiai tanulmányok is valószínűsítik. Az etilén-oxidot a Nemzetközi Rákkutató Intézet (International Agency for Research on Cancer, IARC) egyértelműen rákkeltő hatásának minősítette, s az 1. kategóriába, a bizonyítottan humán karcinogén vegyületek közé sorolta [1].

A gázhalmazállapotú, erősen gyúlékony etilén-oxid széles körben használt vegyipari intermedier. Az élelmiszeripar élelmiszerek fertőtlenítésére, az egészségügy orvosi eszközök sterilizálására használja. Emberi expozíció elsősorban munkahelyi környezetben inhaláció útján, ritkábban *per os* következik be. Számos biológiai hatása közül a bőr-, szem-, gyomor-, és légzőrendszeri irritáció, szenzibilizáció, a teratogén és rákkeltő hatás emelhető ki [1].

Az epoxid vegyületek a direkt módon alkiláló anyagok különösen fontos csoportját alkotják. Nagy reaktivitásuknak köszönhetően a sejtek makromolekuláival – nukleinsavakkal és fehérjékkel egyaránt – adduktokat képeznek. Az etilén-oxid alkilálni képes egyes fehérjék (pl. hemoglobin) aminosav oldalláncait, valamint a DNS bázisait (purin bázisok) és foszfát csoportjait. Genotoxikus és mutagén tulajdonságait számos *in vitro* vizsgálat, *in vivo* állatkísérlet és humán epidemiológiai tanulmány bizonyította. Az etilén-oxid képes DNS száltöréseket, hipoxantin(guanin)-foszforibozil-transzferáz (*HPRT*) génmutációkat és testvérkromatid kicserélődést indukálni sejtkultúrákban [2–6]; *HPRT* mutációkat, kromoszómakárosodást, mikronukleusz képződést és testvérkromatid kicserélődést létrehozni állatokban [7,8]; valamint DNS száltöréseket, kromoszómakárosodást és testvérkromatid kicserélődést előidézni az emberi szervezetben [9–13]. Bár az etilén-oxid belélegezve számos daganattípus kifejlődését indukálta állatkísérletekben [14–16], az epidemiológiai vizsgálatok ellentmondásos eredményeket szolgáltatottak az anyag humán karcinogén tulajdonságáról.

Norman és mtsi. vetették fel az etilén-oxid expozíció lehetséges szerepét az emlőrák kialakulásában [17], de a hipotézis máig vitatott. Amellett, hogy elfogadottan képes leukémiát és limfómát előidézni [18–20], számos vizsgálat mutatott rá az etilén-oxid egyéb daganattípusok, például emlőrák kialakulásában betöltött szerepére [17,21,22], míg más tanulmányok negatív eredményre jutottak [23,24]. Daganatos betegségek, köztük emlőrák,

halmozódását figyelték meg egy magyarországi megyei kórház dolgozói között [25]. A rákos megbetegedések fokozott incidenciájának hátterében Tompa és mtsi. [26] nem megfelelően üzemeltetett gázsterilizátorból származó etilén-oxid expozíciót feltételeztek. Az exponált személyek perifériás limfocitáiban kimutatták a kromoszómakárosodások és testvérkromatid kicserélődések szintjének megemelkedését [10]. Az etilén-oxid emlőrák kialakulásában feltételezett szerepét szintén alátámasztotta egy, a kórházi kohorszon végzett epidemiológiai vizsgálat, amely a halálozási arányszám statisztikailag erősen szignifikáns növekedését találta (SHH = 251–273%) [27].

Az etilén-oxid genotoxikus tulajdonságának *in vitro* kísérleti körülmények között végzett jellemzéséhez az anyag DNS károsító hatását vizsgáltuk meg a sejtszintű DNS mikrogél elektroforézis (üstökös elektroforézis) alkalikus változatával emlő laphámsejteken, melyek érzékenységét a természetes célsejteket reprezentáló limfoblasztokéval valamint a biológiai monitorozáshoz rendszerint használt perifériás limfocitákéval hasonlítottuk össze. Azokból a szervekből származó sejtek érzékenységének jellemzésére, melyekből etilén-oxid expozícióval összefüggő daganatképződést még nem írtak le, keratinociták és méhnyak laphámsejtek vizsgálata szolgált.

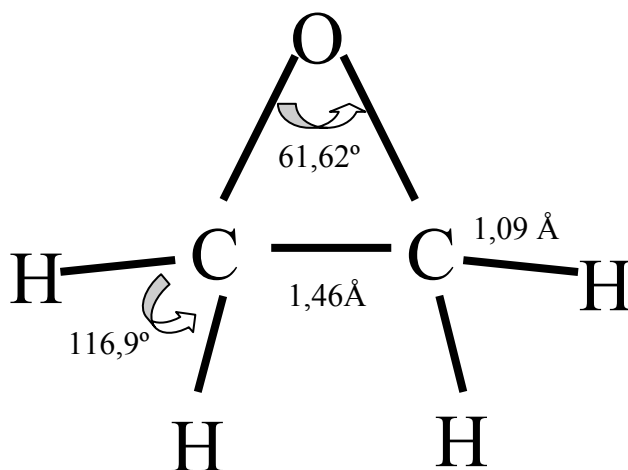
Az etilén-oxid természetes célsejtekben megfigyelt DNS károsító hatásának üstökös elektroforézissel történő jellemzése reményeink szerint hozzájárul e genotoxikus anyagról meglévő ismereteink bővítéséhez, az eredmények valós munkahelyi expozíciókra történő extrapolálása révén pedig segítséget kaphatunk a munkahelyi kockázattal kapcsolatban felmerülő kérdések megválaszolásához.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. ETILÉN-OXID

#### 2.1.1. Előfordulás, fizikai és kémiai tulajdonságok

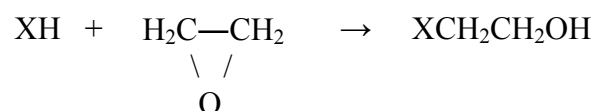
Az etilén-oxid (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O) színtelen, édeskés, éterhez hasonlatos szagú gáz. A légkörben természetes úton képződik kis mennyiségben oxidációs folyamatok révén, ezen kívül állati szervezetekben megfigyeltek endogén produkciót is. Előfordul szénhidrogének égéstermékeiben és belső égésű motorok kipufogógázában, a legnagyobb mennyiségben azonban ipari folyamatokban mesterségesen állítják elő [1].



1. ábra Az etilén-oxid molekula sematikus szerkezete

Az ETO a legegyszerűbb gyűrűs éter vegyület (1. ábra). A fellépő nagy molekuláris feszültség következtében a gyűrű könnyen felnyílik, ennek köszönhető a molekula fokozott reaktivitása. Az ETO kémiai neve oxirán (CAS No.: 75-21-8), de emellett számos szinonimája (oxaciklopropán, (α,β)oxidotán, dihidro-oxirén, (1,2-)epoxietán, ETO, EO), valamint kereskedelmi neve (Amprolene, Oxyfume 12, T-Gas) is létezik. A vegyület molekulatömege 44,1, forráspontja 10,4°C, fagyáspontja -112,5°C, sűrűsége folyékony halmazállapotban 0°C-on 0,8969 g/ml. Illékony anyag, gőztenziója 0°C-on 494 Hgmm.

Vízzel, etanollal, dietil-éterrel és a legtöbb szerves oldószerral jól elegyedik. Különösen gázhalmazállapotban rendkívül gyúlékony és robbanásveszélyes [1,28]. Az ETO reaktív hidrogénatommal rendelkező molekulákkal hidroxietil csoportot tartalmazó termék képződése mellett reagál:

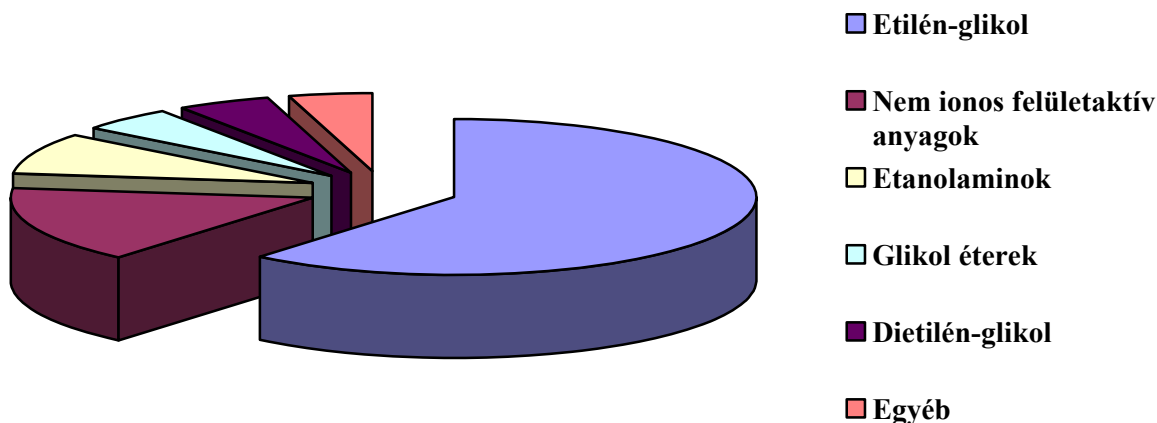


A molekula lehet  $R_2NH$ ,  $RCOOH$ ,  $RCONH_2$ ,  $RSH$  és  $ROH$ . Iparilag a legfontosabb ilyen típusú reakció az, amikor az ETO vízzel etilén-glikolt képez [28].

### 2.1.2. Ipari előállítás és felhasználás

Az ETO Wurtz által kifejlesztett, etilén-klorohidrin és kálium-hidroxid reakcióján alapuló mesterséges előállítását 1937-től kezdve fokozatosan felváltotta a Lefort-féle, az etilén oxigén és ezüst katalizátor jelenlétében lejátszódó direkt katalitikus oxidációját alkalmazó eljárás [1]. A világ éves ETO termelése 1999-ben meghaladta a 4 millió tonnát [29].

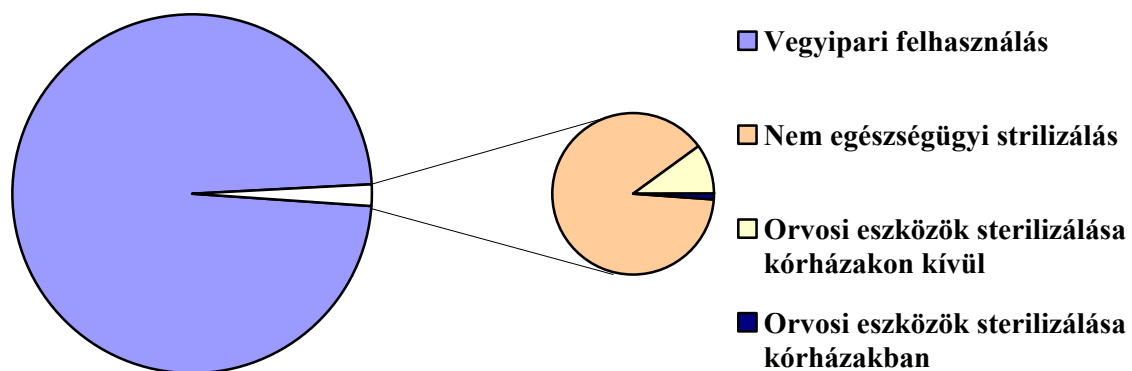
Az előállított ETO majdnem teljes mennyiségét a vegyipar használja fel intermedierként. Legfontosabb származékai a műanyagiparban oldószerként, fagyálló- és hűtőadó folyadékként használt mono- és dietilén-glikol; a kozmetikumok, gyógyszerek, oldószeres és ragasztók gyártásához alkalmazott poli(etilén)-glikolok; valamint a hidraulikus- és fékfolyadékokban, fagyállóként, oldószerként és detergensként alkalmazott glikol éterek. Jelentősek még a nem ionos felületaktív anyagok és biológiai úton lebontható detergensok, valamint a textiliparban, kozmetikumok és detergensok összetevőiként használt etanolaminok (2. ábra) [1].



2. ábra Az etilén-oxid vegyipari intermedierként történő felhasználásának végtermékek szerinti megoszlása (USA, 1993.)

Az etilén-oxidot antimikrobás hatása okán több helyen alkalmazzák tisztító, fertőtlenítő és sterilizáló szerként. Az iparilag előállított teljes mennyiségnek kevesebb mint 2%-át használják fel ilyen célra. A sterilizált, illetve fumigált anyagok leggyakrabban élelmiszerek (kenyér, hús, fűszerek, szárított zöldségek és gyümölcsök); az ETO gázt alkalmazzák továbbá faanyagok, papír, ruházati termékek, dohány, kozmetikumok, gyógyszerek, valamint orvosi, gyógyszerészeti és egyéb tudományos tevékenységek közben használt eszközök sterilizálására [1,30,31].

Az egészségügyben gyakran használt gázsterilizálás során – melynek előnye hogy az anyagok alacsony hőmérsékleten és eredeti csomagolásban kezelhetők – rendkívül reakcióképes, a sejtek fehérje és DNS makromolekuláinak oldalláncjaihoz kapcsolódó gázhalmazállapotú kémiai anyagokkal történik a csíramentesítés. Az eljárás hátránya, hogy a felhasznált gáz balesetveszélyes és egészségre káros lehet, ezért az előírásoknak megfelelő működtetésnek nagy a jelentősége, a művelet után többnyire körültekintő szellőztetésre van szükség [30]. A gázsterilizálás két leggyakoribb formája az etilén-oxidos és a formaldehides csírántlanítás. Becslések alapján az Amerikai Egyesült Államokba megtermelt ETO mindössze kis része (alig 0,2%-a) kerül alkalmazásra az egészségügyben, ennek is kevesebb mint tizedét használják fel az intézmények orvosi eszközök csíramentesítésére (3. ábra) [31,32]. A kórházak sterilizáló egységeiben korábban elterjedten használt etilén-oxidos gázsterilizátort sok helyen napjainkban is működtetik. Az eszközben 80-99%-os relatív páratartalmú, 40-55°C hőmérsékletű légritkított munkatérbe 750-1200 mg/l koncentrációban juttatják be a gázt, amely 2-6 óra alatt előli a kórokozókat. Elsősorban hőre érzékeny anyagok (gumi és műanyag eszközök), optikai tartozékú (pl. endoszkópok) és egyéb műszerek sterilizálására használatos, amelyeket a művelet után szobahőmérsékleten még 96-120 óráig, vagy levegőztető kamrában 16-18 óráig szellőztetni kell a maradék ETO eltávolítása végett.



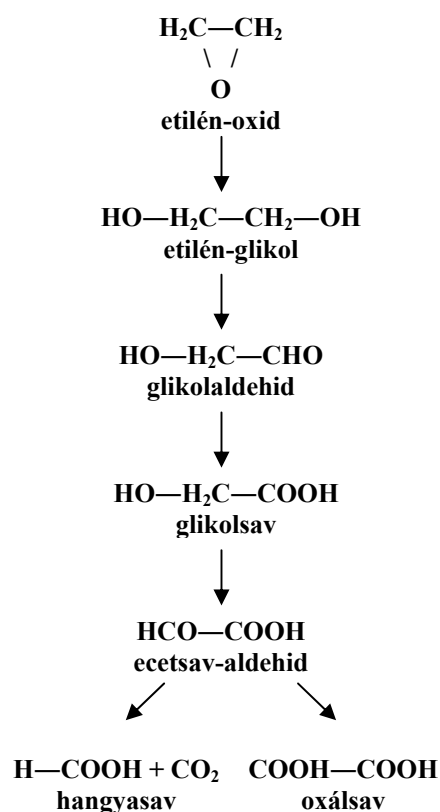
3. ábra Az etilén-oxid sterilizáló szerként történő felhasználásának becsült megoszlása (USA, 1996.)

Az utóbbi időben az ETO egészségkárosító hatásainak felismerése, és a nem ritkán – elsősorban az előírásokat be nem tartó, szabálytalan üzemeltetés révén – előforduló expozíciós esetek következtében az eszköz helyét a korszerűbb zárt rendszerű formaldehid gázsterilizátorok vették át. Bár ennek a gáznak is hasonló egészségkárosító hatásai vannak, előnye hogy biztonságosabban alkalmazható és a szaglási küszöbe jóval alacsonyabb, így az esetleges hiba könnyebben észlelhető. A formaldehid gázzal végzett sterilizálás után szellőztetésre nincs szükség, mivel a gázmentesítés már a készülékben megtörténik [1,30,33,34].

### 2.1.3. Metabolizmus

Bár az ETO endogén termelődését is megfigyelték, a szervezetbe elsősorban környezeti expozíció révén kerül. Behatolási kaput képezhet élelmiszerekkel és ivóvízzel történő bevitel esetén a gyomor-bél rendszer, az ETO folyékony oldatai képesek a bőrön át is penetrálni. A legjelentősebb expozíciós út azonban a belégzés, amely leginkább az ETO sterilizáló szerként történő felhasználásakor jellemző. A tüdők légzőfelületéről a gáz gyorsan felszívódik, és egyenletesen eloszlik a szervezetben.

A metabolizáció folyamán az ETO epoxid hidrolázok révén 1,2-etandiolra hidrolizál. Legjelentősebb metabolitja az etilén-glikol, amelyből alkohol dehidrogenázok hatására további termékek képződhetnek (4. ábra). A nem metabolizálódott ETO makromolekulákkal közvetlenül reakcióba lépve képes adduktokat képezni, a szövetek fehérjéihez (például a hemoglobinhoz) és sejtek DNS molekuláihoz kötődhet. Állatkísérletben a radioaktívan jelzett ETO bevitele után 48 órával 78%-a kiürült a vizelettel, a vegyület becsült fél életideje emberben 14 perc – 3,3 óra. A kiürülés főként a vizelettel történik első rendű kinetika szerint tioéterek formájában, a legfontosabb ürülő metabolitok az N-acetil-S-(2-hidroxi-etil)cisztein, az S-(2-hidroxi-etil)cisztein, az S-(karboxi-metil)cisztein és az etilén-glikol. Nagyobb dózis bevitele esetén a tioéter származékokkal szemben az etilén-glikol ürítése emelkedik meg [1,34–36].



4. ábra Az etilén-oxid metabolizmusának feltételezett útvonala (átvéve Hengstler és mtsi., 1994.)



#### *2.1.4. Akut és krónikus egészségkárosító hatás*

Az ETO akut toxicitása jelentős, az LC<sub>50</sub> 2630 mg/m<sup>3</sup> (1460 ppm) patkányok, és 1504 mg/m<sup>3</sup> (835 ppm) egerek esetében 4 órás expozíciónál. Lokális heveny hatásként az ETO elsősorban vizes oldataival történő kontaktus mind a szemet, mind a bőrt erősen irritálja, allergiás bőrgyulladást kiváltó hatását is leírták. Nagy párolgáshője következtében fagyási sérülést is okozhat. Szájon keresztüli bevitelnél gyomorirritáció, görcsök, hányás, hasmenés léphet fel. Belélegezve izgatja a légutak nyálkahártyáját, köhögést, mellkasi fájdalmat okozva. Szisztémás hatásként gyakran idéz elő általános panaszokat, mint gyengeséget, álmoságot, fejfájást, szédülést, hányingert. Súlyosabb esetben idegrendszeri hatásként beszédzavarok, inkoordináció léphet fel; nagy dózisban nehézlégzést, cianózist, narkózist és tüdővizenyőt okoz [1,34,37].

Nagy – a szaglási küszöböt (~1280 mg/m<sup>3</sup>) meghaladó – koncentrációjú krónikus ETO expozíció katarakta képződését idézi elő szemben. Kisebb koncentrációban okozhatja a légzőrendszer és a bőr krónikus gyulladását, a bőrre szenzibilizáló hatással lehet. Krónikus kitétség a máj, a perifériás (szenzoros és motoros) és a központi idegrendszer károsodását idézi elő [1,34,37].

Az ETO késői toxikus hatásai között említhető, hogy egerben és patkányban bizonyítottan embriotoxikus és teratogén. Csökkenti a beágyazódás esélyét, megnöveli az elhalt magzatok gyakoriságát és a kihordási időt, valamint a retardált és fejlődési rendellenességgel (arcoponya- és velőcső záródási defektusokkal) született utódok számát. A munkahelyen (gyártás, kórházi és ipari sterilizálás) etilén-oxiddal exponált nők között megnő a spontán vetélések száma, beszámoltak férfi fertilitást csökkentő hatásáról is [1,34].

#### *2.1.5. Genotoxicitás, mutagenitás, rákkeltő hatás*

Az ETO a vörösvértestek hemoglobinjának számos aminosav oldalláncához kötődik kovalensen, valamint képes a DNS molekula alkilálására is. A módosulás elsősorban az N-7-guanin helyen következik be N-7-alkil(hidroxi-etil)-guanin képződésével; emellett felmerült a foszfátcsoport észterezésének lehetősége is. A guanint a dezoxiribóz gyűrűhöz kapcsoló glikozil kötés destabilizálódik az N-alkilálás következtében, ami gyakran spontán

bázisvesztést idéz elő, emellett a módosult bázisokra specifikus N-glikozilázok működése is hozzájárul a purin bázis hiányos helyek számának emelkedéséhez. Végül a kémiai változások és a módosult nukleotidok javítási folyamata közben egyszeres száltörések képződhetnek a DNS molekulában [1,3]. A DNS láncban okozott károsodás, amennyiben nem kerül kijavításra, a genetikai információ öröklött megváltozását, azaz mutáció létrejöttét idézheti elő. Az ETO a mutagenitási tesztek többségében pozitívnak bizonyult.

A *Salmonella typhimurium* Ames reverz mutációs tesztben az ETO pozitív eredményt adott egyes törzsekkel, gén konverziót és reverz mutációt idézett elő *Saccharomyces cerevisiae* sejtekben, valamint mutagénnek bizonyult *Bacillus subtilis*-sel és *Neurospora crassa*-val végzett tesztekben is [1,6]. Pozitív mutációs választ detektáltak humán diploid fibroblasztok és kínai hörcsög ovárium sejtek *HPRT* lókuszában is [1,4,5]. Az ETO *in vitro* egyszeres és dupla száltörést indukáló képességét számos vizsgálat igazolta pulzáló mező gél elektroforézissel [2,5], neutrális filter elúcióval és alkalikus DNS denaturálással humán diploid fibroblasztokban [2], valamint alkalikus elúcióval humán perifériás limfocitákban és kínai hörcsög sejtekben [3,35]. Humán limfocitákban az ETO kromoszóma aberrációkat (CA), testvérkromatid kicserélődést (SCE), és nem tervezett DNS szintézist indukált [1,6]. Inhalációval exponált patkányok csontvelő és lép sejtjeiben megemelkedett a CA, SCE és a mikronukleuszok (MN), a perifériás limfocitákban pedig a CA és SCE gyakorisága [1,8]. Patkányok lép limfocitáiban az N-7-hidroxi-etil-guanin adduktok szintje jól korrelált a *HPRT* mutációk és az SCE frekvenciájával [7]. Az ETO *Drosophila melanogaster* sejtekben szex kromoszómához kötött recesszív letális mutációt, patkányokban domináns letális mutációt hozott létre [1].

Magas ETO expozícióval járó munkahelyeken (gyártás, kórházi és ipari sterilizálás) dolgozók perifériás limfocitáiban több vizsgálatnál sikerült adduktok, száltörések, CA, SCE és MN, csontvelő sejtekben pedig az MN gyakoriság emelkedését kimutatni [1,9,12,13]. A genotoxikológiai paraméterek közül a testvérkromatid kicserélődés bizonyult a legérzékenyebb biológiai markernek. Az egeri Markhot Ferenc Kórház ETO exponált nővéreinél a CA és SCE emelkedését figyelték meg perifériás limfocitákban [10].

Az etilén-oxid rákkeltőnek bizonyult számos állatkísérletben. Az ETO táplálékkal bejuttatva patkányokban gyomorrákot (laphámsejtes karcinóma), szubkután befecskendezése egerekben kötőszöveti daganatokat idézett elő [1]. Belégzés útján exponált egerekben és patkányokban mononukleáris sejtes leukémia, peritoneális mesothelioma, alveoláris és hörgődaganatok, méhrák (adenokarcinóma) és agydaganat (glióma) kialakulását figyelték meg [1,15,16].

Elenyésző humán etilén-oxid expozíció történhet az általános környezetben levegőből és vízből, jelentősebb mennyiségben kerülhet az emberi szervezetbe ételek és sterilizált – elsősorban orvosi – eszközökkel történő direkt kontaktus útján, a legjelentősebb azonban minden kétséget kizáróan a munkahelyi expozíció szerepe. A különböző fumigált élelmiszerekben 0–40 mg/m<sup>3</sup> közötti koncentrációban lehet kimutatni etilén-oxidot, a sterilizált orvosi eszközök csomagolásában rekedt gáz koncentrációja pedig akár a 2000 mg/m<sup>3</sup>-t is elérheti [12]. Munkahelyi expozíció elsősorban az ETO-t előállító vegyipari, az azt feldolgozó műanyagipari, valamint a gázt sterilizálásra használó élelmiszer-, orvosi eszköz- és gyógyszeripari üzemekben, és kórházak orvosi eszközöket sterilizáló egységeiben fordul elő. A Nemzeti Munkabiztonsági és Munkaegészségügyi Intézet (NIOSH) becslése szerint az 1990-es évek elején csak az Egyesült Államokban összesen mintegy 250 000 ember volt potenciálisan kitéve ETO expozíciónak (az iparban közvetlenül 80 000, közvetve pedig ennél is több munkás, a kórházak sterilizáló egységeiben pedig 75 000 egészségügyi dolgozó) [23]. Az ipari expozíció szintje tipikusan a kimutathatóság határa és 20 mg/m<sup>3</sup> között változott, egyes munkafázisoknál (a gépek gázzal történő feltöltésénél, leengedésénél és karbantartásnál) a munkalégtér koncentráció értéke azonban rövid időre meghaladta az 1000 mg/m<sup>3</sup>-t. A kórházak ETO gázsterilizátorait működtetők által elszenvedett expozíciós szint az iparhoz hasonlóan 0,1–20 mg/m<sup>3</sup> között volt jellemző 8 órás súlyozott átlagban (TWA). A legmagasabb koncentrációk (akár néhány ezer mg/m<sup>3</sup>) a sterilizálási folyamat végén a sterilizáló ajtajának kinyitásakor és a gáz leengedésekor, valamint a gázpalackok cseréjekor fordultak elő, és összefüggésbe hozhatók a sterilizáló nem megfelelő tervezésével, karbantartásával, illetve használatával [1]. Az egri kórház növértartózkodójában – ahol az ETO gázsterilizátort szabálytalanul működtették – mért légtér koncentrációk 5–150 mg/m<sup>3</sup> tartományban mozogtak [26].

Az ETO exponált munkásokon megfigyelt daganatkeltő hatására először Högstedt és mtsi. közleménye hívta fel a figyelmet 1979-ben, amelyben egy orvosi eszközöket sterilizáló svéd üzemben 1972–1977 között 70 munkásból 3 leukémiás eset előfordulását közölték [18]. Az ETO expozícióval összefüggésben leggyakrabban megfigyelt daganattípus a vér-, és nyirokrendszeri daganatok (krónikus limfoid leukémia, akut mieloid leukémia, non-Hodgkin-, és Hodgkin-limfóma) csoportja. Bár a vizsgálatok többségében a daganat frekvencia csak mérsékelten emelkedett és két meta-analízis csak valószínűsíthető kapcsolatot talált [38,39], számos tanulmányban egyértelmű trend volt felfedezhető a limfoid leukémiák és non-Hodgkin limfómák kialakulása és a kumulatív ETO expozíció között [1,19,23,36]. Gyomorrákos, nyelöcsőrákos és hasnyálmirigy daganatos esetek számának emelkedését csak

egy-egy vizsgálatban sikerült kimutatni [1,19]. Az Egyesült Államokban egy etilén-oxidot használó munkahelyen tapasztalt citogenetikai eltérések hatására indított epidemiológiai vizsgálat az 1974-től 1980-ig foglalkoztatott női dolgozók között emlőrák gyakoriságának szignifikáns növekedését mutatta ki; egyéb daganatok megszorodását nem észlelték [17]. A közleménnyel kapcsolatos kritika az expozíció időtartama, az első expozíció és a daganat kialakulása között eltelt idő és a daganatos kockázat emelkedése közötti összefüggés hiányos elemzésére hívta fel a figyelmet [40]. Későbbi tanulmányok nem tudták alátámasztani a megfigyelést [23,24], az utóbbi években azonban az ETO kitettség és az emlőrák kapcsolatát több vizsgálat is alátámasztotta [21,22]. Magyarországon az egeri Markhot Ferenc Kórház nővértartózkodójában 1976–1992 között szabálytalanul működtetett gázsterilizátor okozta ETO expozícióról derült ki, hogy szerepet játszott az osztályon bekövetkezett emlőrákos és egyéb daganatos megbetegedések (méh-, tüdő-, vastagbél-, petefészek- és agydaganat, limfoid leukémia) kialakulásában, amelyek 1987 óta 11 halálesetet eredményeztek [26]. A Kardos és mtsi. által végzett, indirekt standardizáláson alapuló epidemiológiai vizsgálat a kérdéses, expozíciónak kitett populációban a daganatos halálozások statisztikailag szignifikáns emelkedését tudta kimutatni (SHH = 251–273%, az exponáltak körének meghatározásától függően) [27]. Megjegyzendő, hogy az epidemiológiai vizsgálatok értékelését nehezíti az általában jellemző alacsony esetszám, az expozíciós értékek bizonytalan volta és a kombinált expozíciók lehetősége, ezért az összefüggés további vizsgálatokat igényel [36].

#### 2.1.6. A rákkeltő hatás munkaegészségügyi vonatkozásai

A Nemzetközi Rákkutató Intézet 1994-ben újraértékelte az ETO karcinogén szerepét. Eszerint „Az etilén-oxid rákkeltő hatására kísérleti állatokban *elegendő bizonyíték* áll rendelkezésre”, míg „*korlátozott a bizonyíték* az etilén-oxid emberekre gyakorolt karcinogén hatásáról”. A végső értékelés alapján (a korábbi „valószínűleg karcinogén (2A csoport)” besorolással szemben): „Az etilén-oxid az *emberre karcinogén* (1. csoport)” [1]. Az ETO az Egészségügyi Világszervezet (WHO) szerint is bizonyítottan humán rákkeltő (1. kategória), míg az amerikai Környezetvédelmi Hivatal (EPA) a valószínűleg humán karcinogének (B1 csoport) között tartja számon.

A munkaegészségügyet legmagasabb szinten szabályzó 1993. évi XCIII. Törvény kimondja, hogy az egészséget nem veszélyeztető és biztonságos munkavégzés követelményeinek

megvalósítása – a munkavállalók ez irányú felelősségének hangsúlyozásával – a munkáltató kötelessége. A kémiai biztonságról szóló 2000. évi XXV. Törvény alapján a 25/2000. EüM-SzCsM együttes rendelet meghatározza a munkalégtér határértékek típusait és megadja ezek értékét az egyes anyagokra. A 8 munkaórás súlyozott átlagként értelmezett átlagos koncentrációval (ÁK) és a 15 percre vonatkoztatott csúcskoncentrációval (CK) szemben a sztochasztikus hatású anyagokra – tipikusan a rákkeltő vegyületekre, ahol nem állapítható meg olyan biztonságos határérték, ami alatt egészségkárosodás nem fordul elő – maximális koncentráció (MK) értéket állapítanak meg, amit a legrövidebb időre sem szabad túllépni. Az ETO esetében Magyarországon ez  $1,8 \text{ mg/m}^3$  (1 ppm). A rendelet alapján a vegyületre jellemző tulajdonságok: i (ingerlő), sz (szenzibilizáló), r (rákkeltő).

Az Egyesült Államok Munkaegészségügyi és Munkabiztonsági Hivatala (Occupational Safety and Health Administration, OSHA) által etilén-oxidra meghatározott kötelező érvényű munkalégtér határérték (permissible exposure limit, PEL) megegyezik a hazánkban alkalmazottal ( $1,8 \text{ mg/m}^3$ ), az Egyesült Királyságban megállapított határérték (maximum exposure level, MEL) viszont magasabb ( $10 \text{ mg/m}^3$ ).

Az ETO expozíció környezeti monitorozása a levegőből aktív szenes megkötés és széndiszulfidos deszorpció után gázkromatográfiás módszerrel történik. A felszívódott ETO mennyiségét meghatározó biológiai monitorozást az anyag vérből, illetve metabolitjainak a vizeletből történő kimutatásával végzik. A biológiailag hatékony dózis mérését az ETO makromolekulákkal képzett adduktjainak detektálása teszi lehetővé. A gyakorlatban elsősorban a hemoglobin N terminális hidroxietilvalin szintjének mérése használható; egy vizsgálatban kórházi sterilizáló egységben dolgozók vérében  $170 \mu\text{mol/mol}$  hemoglobin ETO szintet mutattak ki [12]. Az ETO expozícióhoz kapcsolódó biológiai hatás monitorozására a már korábban részletezett genotoxikológiai módszerek (szájtörések, CA, SCE, MN kimutatása) állnak rendelkezésre. Hazánkban az ETO expozíció biológiai monitorozásának egyik formája sem kötelező.

Az orvosi vizsgálat a potenciálisan ETO expozíciónak kitett munkakörbe történő bekerülésnél és távozásnál, közben rendszeresen évente, illetve a dolgozó kérésére soron kívül történhet. A vizsgálat során az ETO hatására kialakuló megbetegedések, preklinikai állapotban történő korai felfedezésére törekszenek (bőr-, légzőszervek-, szem vizsgálata, vérképelemzés, májfunkció, neurológiai vizsgálat) [34].

A munkahelyi ETO expozíció megelőzése (primer prevenció) lehetséges más anyaggal történő helyettesítéssel (pl. formaldehiddel gázsterilizátorokban), műszaki intézkedésekkel (zárt rendszer), szellőztetéssel (elszívó), megfelelő munkaszervezési gyakorlattal, a

határértékek betartásának ellenőrzésével (monitorozás), a dolgozók felvilágosításával és tréningjével, és utolsó megoldásként egyéni védőfelszerelés (légzőkészülék, védőruha, kesztyű, szemüveg) használatával [34]. Mivel az ETO fokozottan tűz- és robbanásveszélyes, fontos a tűzbiztos, hideg helyen tárolás és a megfelelő jelölés [37].

## 2.2. ÜSTÖKÖS ELEKTROFORÉZIS

### 2.2.1. Módszer

A DNS károsodás mértékének egyedi sejtekben történő meghatározását először Rydberg és Johanson kísérte meg, majd a sejszintű DNS gél elektroforézist (üstökös elektroforézis) Östling és Johanson vezette be a mikrogél elektroforézis technika kifejlesztésével [41]. A módszer tökéletesítése Singh és mtsi. nevéhez fűződik, akik bevezették az alkalikus közegben végzett DNS denaturálást és elektroforézist [42]. Ez a megközelítés lehetővé tette a dupla mellett az egyszeres száltörések és lúglabilis sérülések (purin és pirimidin bázis hiányos helyek és foszfortriészterek) kimutatását is. Az utóbbi évtizedben a módszernek számos változatát dolgozták ki a különböző típusú (pl. oxidatív) DNS károsodások detektálására [43–46].

Az üstökös elektroforézis alkalikus változata szenzitív és viszonylag egyszerű módszer a DNS egyszeres és kétszeres száltöréseinek, valamint lúglabilis sérüléseinek kimutatására. A módszer során a vizsgálandó sejteket mikroszkóp tárgylemezre felvitt agaróz gélbe ágyazzák. A magas só és detergens koncentrációjú, lúgos közegben végzett emésztés után csak a sejtmag DNS tartalma marad vissza, amelynek kettős hélix szerkezete alkalikus közegben felbomlik, a komplementer láncok szétválnak egymástól. Így az egyszeres száltörések, sőt a magas pH-n egyszeres száltöréssé alakuló lúglabilis sérülések is kimutathatóvá válnak. Az elektroforézis folyamán az alacsony feszültségű elektromos mezőben a károsítatlan nagyméretű DNS molekula helyben marad, míg a sérült, letört lánccsövek negatív töltésű nukleinsav tartalmuk révén az anód (pozitív pólus) felé vándorolnak. A migráció mértéke a DNS károsodás szintjével arányos. A megfestett DNS fluoreszcens mikroszkóp alatt megjelenő képe egy fejből (intakt DNS) és csóvából (károsodott DNS) álló üstökösre emlékeztet. A DNS károsodás mértéke a csóva hosszúságával, valamint a fej és a csóva

fluoreszcencia intenzitásának arányával, illetve e két paraméter szorzataként adódó „tail moment” értékkel számszerűsíthető. Az utóbbi paraméter nem csak a csóvába került DNS mennyiségét, hanem a csóva alakját, így a száltörések sűrűségét is figyelembe veszi (gyakoribb száltörések által létrehozott kisebb DNS darabok messzebbre vándorolnak hosszabb csóvát képezve) [43,47].

### 2.2.2. Alkalmazás

Az üstökös elektroforézis alkalikus változatának egyik alkalmazási területét a genotoxikológiai vizsgálatok jelentik. Számos tanulmány használta a módszert különböző vegyi anyagok *in vitro* vagy *in vivo* genotoxicitásának tanulmányozására. A vizsgálat nagy előnye érzékenysége, valamint hogy csak kevés sejtre és kis mennyiségű vizsgálandó anyagra van szükség [43]. A programozott sejthalál következtében megjelenő dupla száltörések a DNS intenzív fragmentációjához vezetnek. A DNS károsodás mértéke az apoptotikus sejtekben olyan nagy, hogy üstökös képeik vizuálisan is könnyen megkülönböztethetők az élő sejtektől (úgynevezett „sündisznó” alak), mivel a nukleinsav döntő mennyisége a csóvában található (80% feletti csóva DNS tartalom egyértelmű sejtelhalás jele) [48].

Érzékenysége miatt az üstökös elektroforézis hasznos eszköznek bizonyult molekuláris epidemiológiai tanulmányokban is, elsősorban a genotoxikus anyagokkal exponált személyekből származó minták sejteiben (általában perifériás limfocitákban) jelenlévő DNS károsodás meghatározására. E tanulmányok egyik legfontosabb területe a munkaegészségtan; vizsgálatokat végeztek például az egészségügyben (radiológusok, aneszteziológusok, onkológiai osztályok nővérei), a gumiiiparban, és szeméttelpeken dolgozók sejteiben megjelenő DNS károsodás mértékének megállapítására [49–52].

### 2.2.3. Hatos oxidációs számú krómmal végzett genotoxikológiai vizsgálataink

Az etilén-oxid génekárosító hatásának üstökös elektroforézissel történő vizsgálatára szolgáló *in vitro* rendszer kidolgozása korábbi, hatos oxidációs számú krómmal ( $\text{Cr}^{\text{VI}}$ ) végzett kísérleteink során történt. Az IARC által bizonyítottan humán rákkeltőként jellemzett  $\text{Cr}^{\text{VI}}$

emberi expozíciót főként belégzés útján okoz, s mivel elsődleges biológiai targetnek a légzőrendszer tekinthető, humán tüdő sejtek konfluens rétege megfelelő *in vitro* modellként szolgált a Cr<sup>VI</sup> expozíció genotoxikológiai hatásának tanulmányozására. Vizsgálatainkban a Cr<sup>VI</sup> DNS károsító hatását két sejtpopuláción jellemeztük, humán perifériás limfociták és II típusú pneumociták (A549 humán tüdő karcinóma sejtvonal; ECACC No. 86012804, Porton Down, UK) tenyészetein. A sejtek kezelése nátrium-bikromát nem citotoxikus koncentrációival az üstökös elektroforézis alkalikus változatával kimutatott genotoxikus hatás koncentráció függő emelkedését eredményezte. A DNS károsodási szint statisztikailag szignifikáns ( $p < 0,01$ ) növekedését előidéző legkisebb nátrium-bikromát koncentráció 50  $\mu\text{M}$  volt a limfociták, illetve 10  $\mu\text{M}$  a pneumociták esetében. Az oxidatív típusú DNS károsodás üstökös elektroforézissel történő kimutatását lehetővé tevő endonukleáz (formamidopirimidin glikoziláz) előkezelés alkalmazása az üstökös elektroforézis érzékenységét 10-szeresére növelte a tüdő sejtek esetében, ami a hatos oxidációs számú króm indukálta DNS károsodásban bázisoxidáció szerepét bizonyítja. A Cr<sup>VI</sup> hatására kialakuló DNS-DNS keresztkötések jelenlétét a dózis-hatás görbében magasabb koncentrációknál (1 mM) megfigyelt plató valószínűsíti. A hatos oxidációs számú króm genotoxicitásának tanulmányozásához kidolgozott rendszer megfelelőnek bizonyult az etilén-oxiddal végzett vizsgálatok végrehajtásához.



### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink során célként tűztük ki az etilén-oxid genotoxikus hatásának tanulmányozását *in vitro* körülmények között primer és szekunder humán sejt kultúrákon.

Az emlő laphámsejtek érzékenységét az etilén-oxid expozíció ismert és feltételezett célsejtjeinek, valamint targetként nem azonosítható sejt típusoknak az érzékenységével összevetve jellemeztük, választ keresve arra a kérdésre, hogy az etilén-oxid expozíció felelőssé tehető-e emlőrák kialakulásáért.

A munkánk során vizsgáltuk, hogy:

1. Felállítható-e olyan laboratóriumi *in vitro* modell, amelyben az etilén-oxid kezelés hatására létrejövő DNS károsodás üstökös elektroforézissel vizsgálható humán sejt kultúrákban?
2. A genotoxicitás dózis-hatás összefüggésével jellemzett érzékenység statisztikailag meghatározható különbséget mutat-e a különböző sejt típusoknál?
3. Az emlő laphámsejtek az etilén-oxid genotoxikus hatására érzékeny sejtekkel mutatnak-e hasonlóságot?

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. ANYAGOK

A kísérletekhez használt anyagok a következő gyártóktól származtak:

Az etilén-oxid a Flukától (Buchs, Switzerland); az RPMI 1640 médium (RPMI), DMEM médium és borjú savó (FBS) a Gibcotól (Grand Island, NY, USA); a nátrium-klorid (NaCl) és nátrium-hidroxid (NaOH) a Reanaltól (Budapest, Magyarország); a Penicillin G a Biogaltól (Debrecen, Magyarország); a Streptomycin-szulfát pedig a Sanavitától (Werne, Németország).

A többi anyag beszerzése a Sigmától történt (St. Louis, MO, USA).

### 4.2. MÓDSZEREK

#### 4.2.1. Sejtkultúrák

A humán limfoblasztok (HL-60 humán promielocitás leukémia sejtvonal; ECACC No. 93021013, Porton Down, UK) tenyésztése 20% borjú savóval, 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml Penicillin G-vel és 0,5 mg/ml Streptomycin-szulfáttal kiegészített RPMI 1640 médiumban történt. A többi sejtvonal letapadó sejtréteggként nőtt: a humán emlő laphámsejtek (BT-474 humán epitelioid duktális emlő karcinóma sejtvonal; ATCC No. MTB-20, Manassas, VA, USA) RPMI 1640 médiumban (20% borjú savó, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml Penicillin G, 0,5 mg/ml Streptomycin-szulfát, 10 µg/ml inzulin), a humán keratinociták (HaCaT spontán transzformálódott humán keratinocita sejtvonal; Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Németország) és méhnyak laphámsejtek (HeLa humán méhnyak epitelioid karcinóma sejtvonal; ECACC No. 93021013, Porton Down, UK) pedig DMEM médiumban (10% borjú savó, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml Penicillin G, 0,5 mg/ml Streptomycin-szulfát). Az összes sejtkultúrát 25 cm<sup>2</sup>-es sejtenyésztő flaskákban (T<sub>25</sub>; Nunclon, Roskilde, Dánia),

37°C hőmérsékletű, 5%-os CO<sub>2</sub> és magas páratartalmú léghőrt biztosító inkubátorban tenyésztettük.

Az emberi vérminták ismételtén ugyanattól az egészséges, nem dohányzó felnőtt férfi donortól származtak, és 7 ml-es heparinos vákuumcsövekbe (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) történő vérvétel után közvetlenül kerültek felhasználásra. A limfociták szeparálása a teljes vérből standard eljárással Histopak-1077 szeparációs médiumot alkalmazva történt [53]. A Histopak-1077 médiumot teljes vér és RPMI 1640 médium keveréke alá rétegezve 300×g sebességgel 30 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten. A fehérvérsejt réteg (buffy-coat) leszívása után a sejteket RPMI 1640 médiumban (10% borjú savó, 2 mM L-glutamin) szuszpendáltuk.

A sejtek életképességének meghatározásához a sejtmembrán sértetlenségét kimutató tripán kék tesztet használtuk vizsgálataink folyamán. A sejtuszpenzióhoz 10% tripán kéket (0,4%) adva az elszíneződött sejtek arányát Bürker kamrában (Hirschmann Techcolor, Eberstadt, Németország) határoztuk meg. Az izolált sejtek életképességét minden esetben 90% felettinek találtuk.

A passzálás és a sejtekkel végrehajtott minden egyéb művelet a megfelelő higiénés szabályok betartása mellett II. osztályú mikrobiológiai biztonsági fülkében történt.

#### 4.2.2. Etilén-oxid expozíció vizsgálatok

Az etilén-oxid törzsoldat (1 M) minden kísérlet előtt frissen készült úgy, hogy a folyékony etilén-oxidot (forráspontja 10,4°C) előhűtött gázzáró fecskendővel (Hamilton, Reno, NV, USA) membrános kupakú üvegcsébe (Spektrum 3D, Debrecen, Magyarország) mérve 4°C-os PBS pufferben (pH 7,5) nyelettük el. A törzsoldatból hígítások a sejtenyészítő médiumban készültek.

A sejtek etilén-oxidos kezelése és feldolgozása az általunk korábban hatos oxidációs számú króm genotoxikus tulajdonságának *in vitro* jellemzésére kidolgozott rendszerben történt. A kezelési koncentrációk kiválasztásához először a sejtek életképességének etilén-oxid expozíciót követő meghatározása történt. A citotoxicitási vizsgálat során a 0–1000 µM koncentrációtartományban az életképes sejtek aránya nem csökkent 85% alá.

A limfoblasztok és perifériás limfociták  $2 \times 10^5$  sejt/ml médium sejtsűrűségű tenyészetait műanyag csőben kezeltük  $37^\circ\text{C}$ -on 1 óráig. A letapadó emlő laphámsejtek, keratinociták és méhnyak laphámsejtek 12 lyukú sejtenyésztő plate (TTP, Uetikon-Zurich, Svájc) felszínén nőttek konfluens sejtréteggé, mielőtt a kultúrákat  $37^\circ\text{C}$ -on 1 óráig etilén-oxiddal kezeltük.

A kezelés után a médiumot leszívtuk a letapadó sejtekről, majd a sejteket a plate aljáról a tripszin indukálta DNS károsodás elkerülése végett mechanikusan távolítottuk el. A szuszpenzióban kezelt sejtekről a médiumot  $200 \times g$  sebességgel 10 percig  $4^\circ\text{C}$ -on végzett centrifugálást követően választottuk le. Minden sejt kultúrát mosás után szérumentes médiumban  $1000$  sejt/ $\mu\text{l}$  médium sűrűségben szuszpendáltunk az üstökös elektroforézishez.

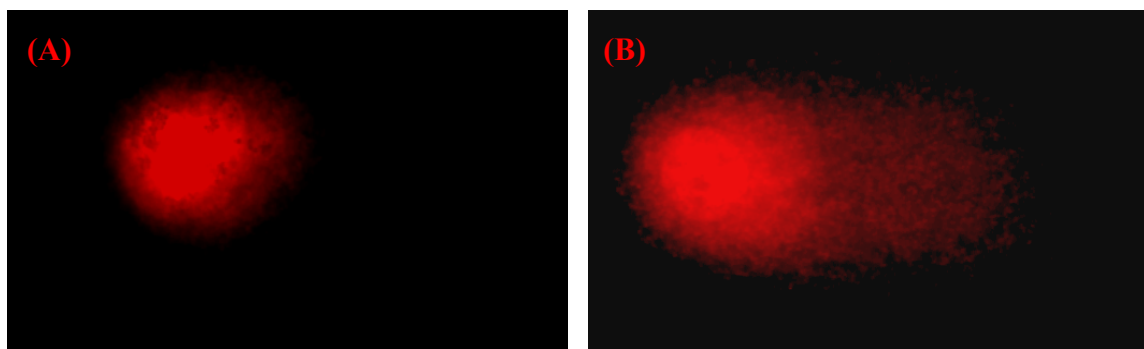
A kísérleteket 3–6 alkalommal ismételtünk meg. A sejtek életképességét kezelésekk előtt és után is meghatároztuk tripán kék tesztel, és az elhalt sejtek aránya sohasem haladta meg a citotoxicitási vizsgálatoknál kapott értékeket.

#### *4.2.3. Üstökös elektroforézis*

A genotoxicitás vizsgálatához az üstökös elektroforézis alkalikus változatát használtuk a következő módosításokkal: egyik oldalukon érdesített tárgylemezeket (Spektrum-3D, Debrecen, Magyarország) 1%-os normál olvadáspontú agaróz géllal (NMA) fedtünk, melyet megszilárdulása után eltávolítottunk a felszín jobb tapadásának biztosítása és a háttérintenzitás jelentős csökkentésének érdekében. Ezután egy új 1%-os NMA réteg került a tárgylemez felszínére. A 0,75%-os alacsony olvadáspontú agaróz gélben (LMA) szuszpendált sejteket ( $\sim 10\,000$ – $15\,000$ ) felvittük az 1%-os NMA rétegre, melyet egy további 0,75%-os LMA réteggel fedtünk. Megszilárdulás után a lemezek jéghideg lizáló elegybe kerültek [2,5 M NaCl, 100 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 10 mM Trizma (pH 10), 1% nátrium N-lauroyl sarcosinate és közvetlenül használat előtt hozzáadott 1% Triton X-100] egy éjszakára. A további lépéseket sötétszobában a természetes fény kizárásával, sárga megvilágításnál végeztük. A citoplazma emésztése után a DNS szálak szétválásának és a bázishiányos helyek felszakadásának elősegítése 20 perces inkubációval történt alkalikus pufferben [300 mM NaOH és 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (pH > 13)]. Az elektroforézis ugyanebben a közegben zajlott horizontális elektroforézis kádban (BioRad, Hercules, CA, USA) 20 percig szobahőmérsékleten  $0,8$  V/cm ( $\sim 300$  mA) feszültségű elektromos térben, melyet egy EPS 600 elektroforézis tápegység (Pharmacia, Uppsala, Svédország) szolgáltatott. A lemezeket ezután

3×5 percig mostuk neutralizáló pufferben [0,4 M Trizma (pH 7,5)], majd szárítás után etidium-bromiddal (20 µg/ml desztillált víz) festettük. Minden mintából két párhuzamos lemez készült.

A fluoreszcens képek digitalizálása és elemzése 50 W-os higanygőz lámpával ellátott Axioplan fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss, Oberkochen, Németország) történt, amihez fekete-fehér videokamera (IMAC-CCD, Computer Systeme, Böblingen, Németország) és üstökös képelemző rendszer (Metasystems, Altlussheim, Németország) csatlakozott. A mintákat több-hullámsávós szűrőrendszer (Chroma, Rockingham, VT, USA) segítségével előállított 570 nm hullámhosszú zöld fénnel gerjesztettük. A lemezenként 50 véletlenszerűen kiválasztott sejtmag (100/minta) digitalizált felvétele 40× NA 0,75 tárgylencsével 400× nagyításon készült (5. ábra).

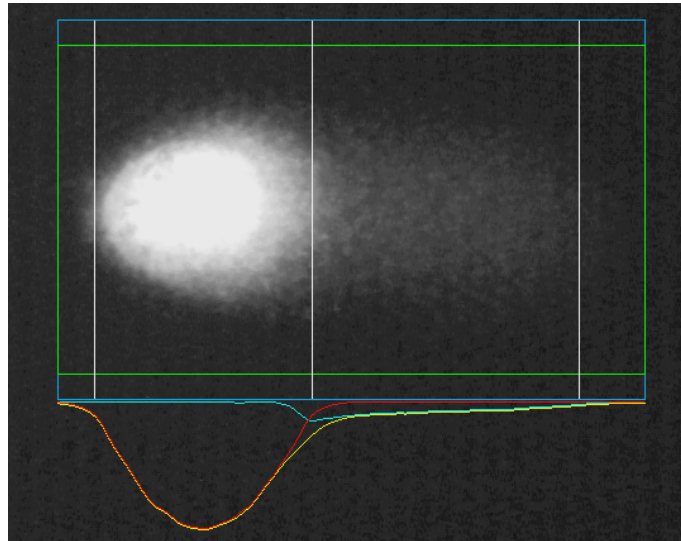


5. ábra Kis- (A) és nagymértékű (B) DNS károsodást mutató humán emlő laphámsejtek magjainak üstökös képei

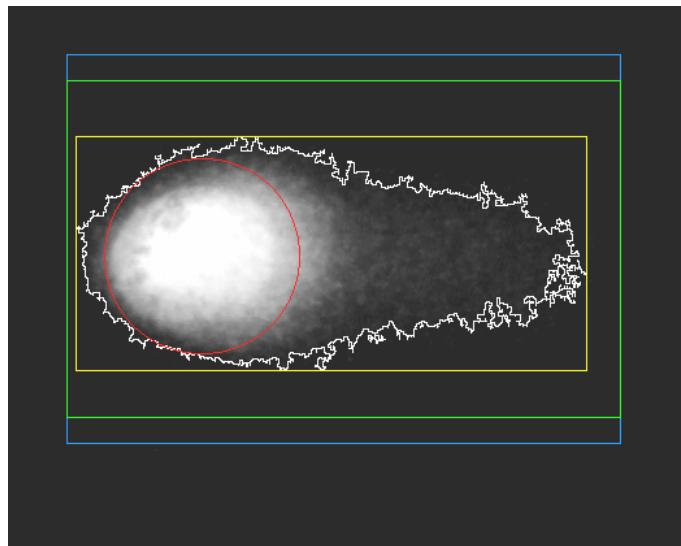
A DNS károsodási szint mérése és jellemzése a csóva DNS tartalmának (intenzitás %) és a csóvahossznak (µm) a meghatározásával történt, melyekből a 'Comet Imager 1.2' szoftver a tail moment értékeket (tail moment = csóva DNS tartalom(%)×csóvahossz) automatikusan származtatta.

A képanalizáló szoftver mérési programja a háttérintenzitásra történő korrekció után kijelezte az egész kép intenzitásgörbéjét (sárga vonal), majd a legnagyobb intenzitást mutató pontra tükrözve megadta a fej intenzitását (piros vonal). A két intenzitásgörbe különbsége (kék vonal) adta a csóva intenzitását (6.a ábra). Amennyiben az üstökös magjának aszimmetrikus volta miatt az automatikus mérési folyamat nem működött megfelelően, lehetőség nyílt a kép manuális elemzésére, amikor a háttérintenzitás korrigálása és az

objektum kijelölése az intenzitásküszöb beállításával, a fej területének meghatározása pedig kézi kijelöléssel valósult meg (6.b ábra).



6.a ábra DNS károsodás paramétereinek mérése a képanalizáló szoftverrel (Comet Imager 1.2) automata mérési üzemmódban



6.b ábra DNS károsodás paramétereinek mérése a képanalizáló szoftverrel (Comet Imager 1.2) manuális mérési üzemmódban

#### 4.2.4. Statisztikai elemzés

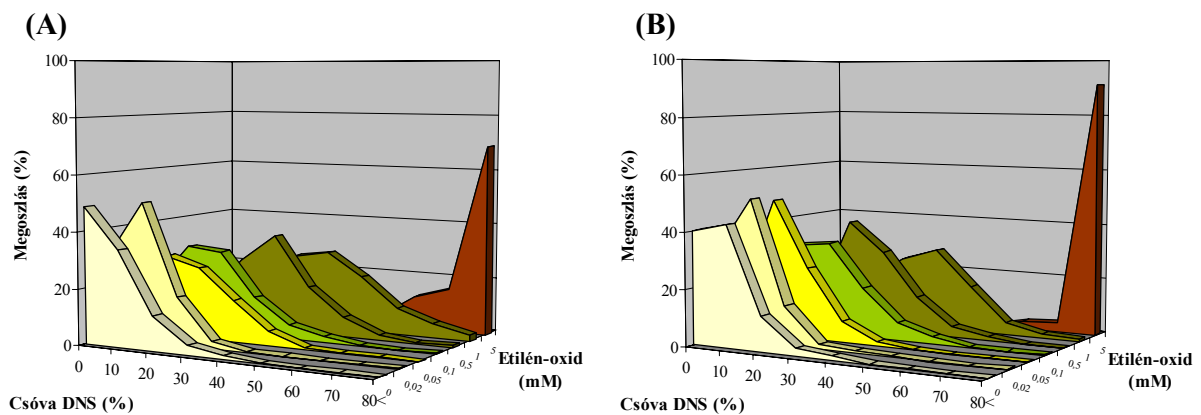
Az etilén-oxid különböző dózisaival indukált DNS károsodás ismételt kísérletekből származó átlagértékeit hasonlítottuk össze a kezeletlen sejtek alapértékeivel Student-féle t-próba segítségével, mivel az átlagok (Skewness és Kurtosis normalitás teszttel megvizsgálva) normál eloszlást mutattak. A szignifikancia 5%-os ( $p < 0,05$ ) szignifikancia szinten volt értelmezve.

A dózis-hatás görbét vonaldiagram (szórás hibasávokkal jelezve), a DNS károsodási értékek növekedését oszlopdiagram, az egyes sejtek DNS károsodási paramétereinek megoszlását pedig 3 dimenziós hisztogram formájában ábrázoltuk.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. ETILÉN-OXID CITOTOXICITÁS

A vizsgált sejttípusok életképességét a 0–1000  $\mu\text{M}$  etilén-oxid koncentrációtartományban tripán kék tesztel vizsgálva 85% felettinek találtuk, 5 mM-nál azonban lényegesen e szint alá csökkent. A sejtek életképességére indirekt módon az üstökös elektroforézis eredményeiből is következtetni tudunk. Megfigyelt jelenség ugyanis, hogy elhalt (apoptotikus) sejtpopuláció esetében a csóva DNS tartalma (TD) lényegesen megemelkedik (60%–80% valószínű, 80% fölött gyakorlatilag egyértelmű sejtelhalást jelez). E megfigyelés alapján szintén arra a következtetésre juthattunk, hogy ellentétben a 0–1000  $\mu\text{M}$  tartománnyal, az etilén-oxid 5 mM koncentrációjával történő kezelés az emlő laphámsejtekben (TD 82,68%) és limfoblasztokban (TD 88,24%) teljes, a többi sejttípusnál jelentős sejtpusztulást idézett elő (7. ábra).

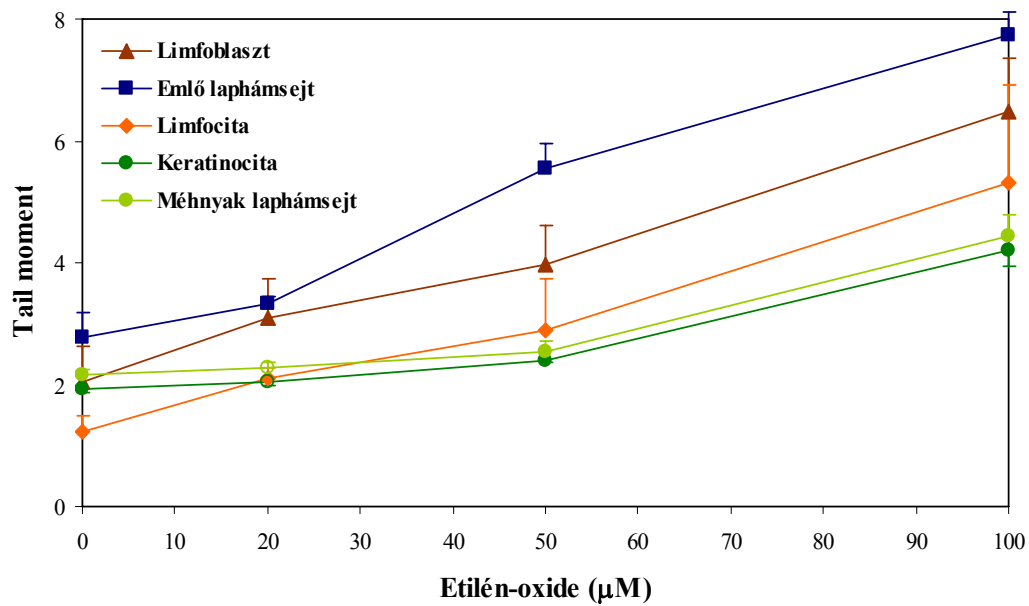


7. ábra Emlő laphámsejtek (A) és limfoblasztok (B) DNS károsodási szintjeinek megoszlása 0–5 mM koncentrációjú etilén-oxiddal történő kezelés után (1 óra, 37°C)

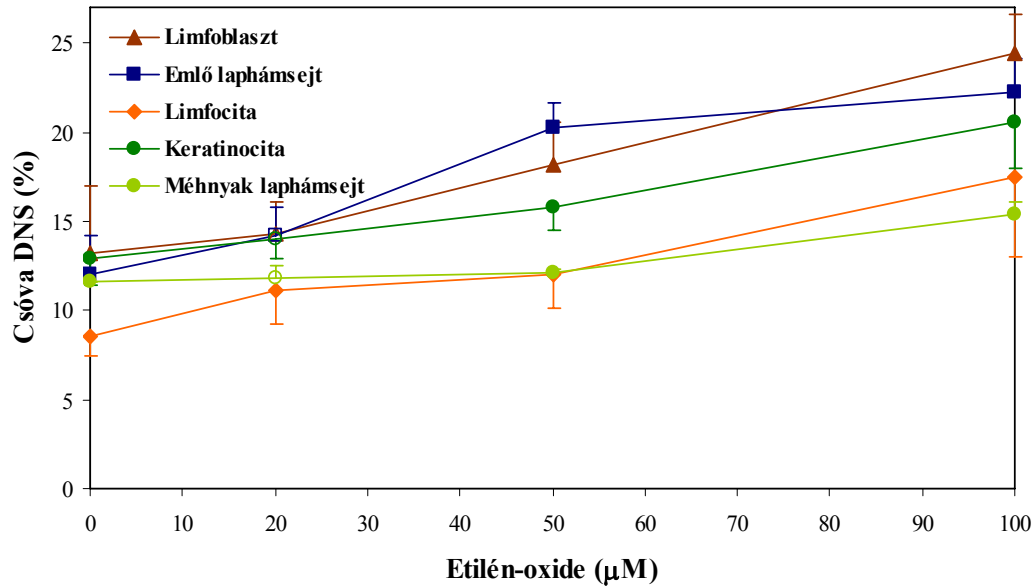


## 5.2. ETILÉN-OXID GENOTOXICITÁS

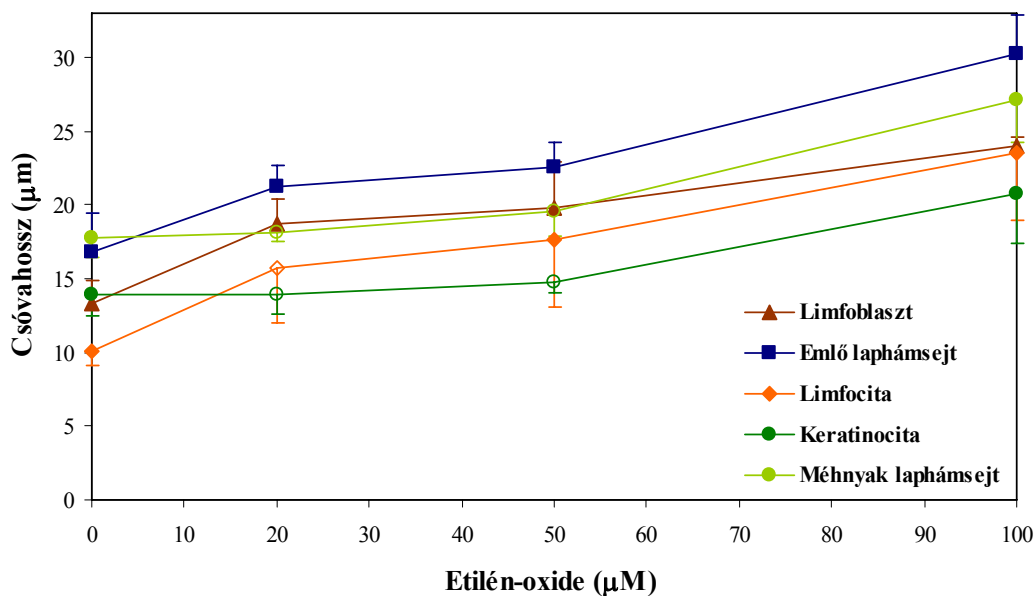
Az etilén-oxid genotoxikus tulajdonságának elemzése különböző humán sejtvonalakban a DNS károsodást jelző paraméterek dózis-hatás görbéinek összehasonlításával történt (9.a,b,c ábra).



9.a ábra Etilén-oxid kezelés (1 óra, 37°C) hatására létrejött, tail moment paraméterrel jellemzett DNS károsodás a vizsgált sejttípusokban. Az adatok 3-6 kísérletből átlagolt értékek (szórás jelölése hibaszávokkal). A üres adatpontok a kezeletlen sejtek megfelelő alapértékeihez viszonyított nem szignifikáns növekedést reprezentálják ( $p>0,05$ )

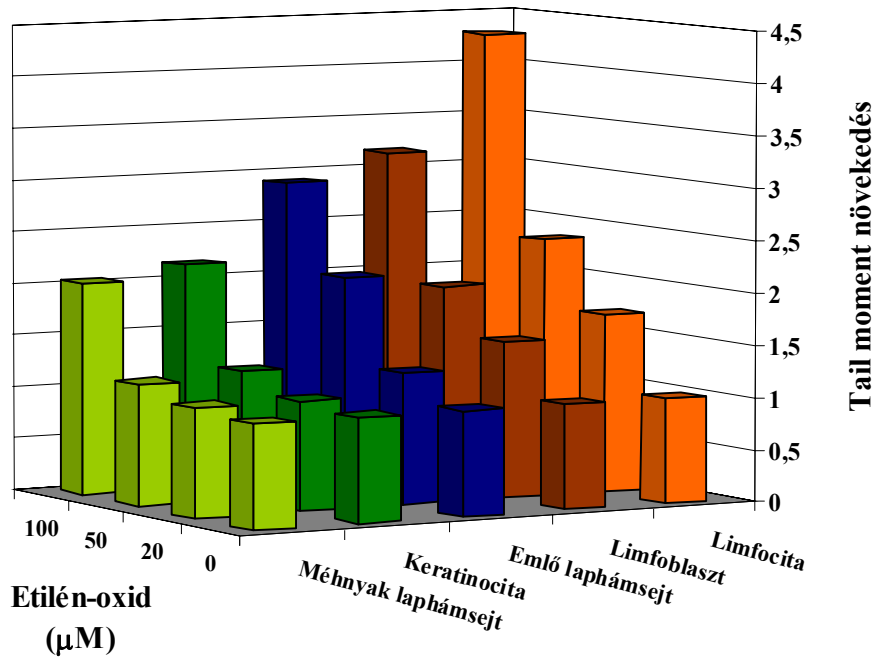


9.b ábra Etilén-oxid kezelés (1 óra, 37°C) hatására létrejött, csóva DNS tartalom paraméterrel jellemzett DNS károsodás a vizsgált sejtípusokban. Az adatok 3-6 kísérletből átlagolt értékek (szórás jelölése hibasávokkal). A üres adatpontok a kezeletlen sejtek megfelelő alapértékeihez viszonyított nem szignifikáns növekedést reprezentálják ( $p>0,05$ )

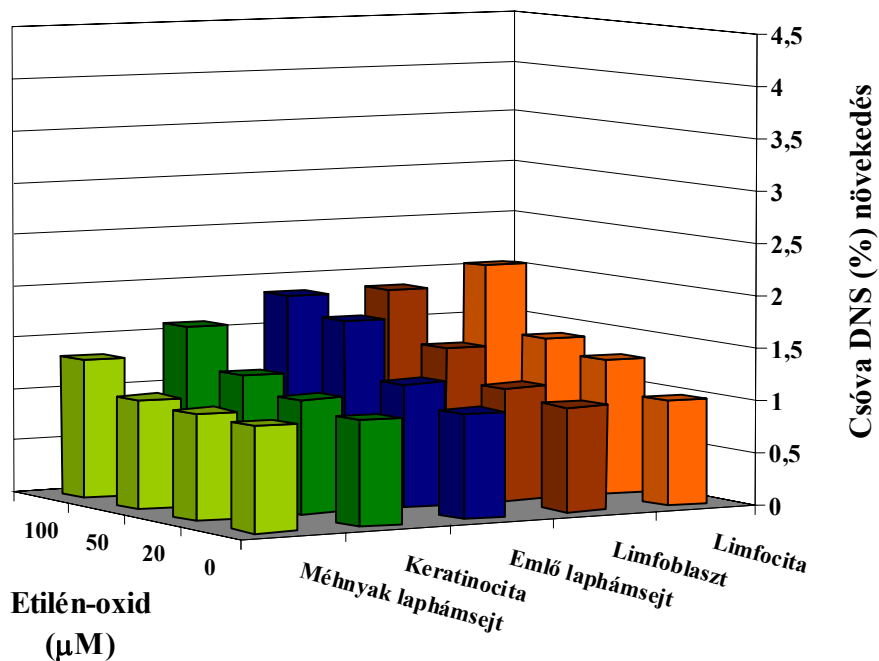


9.c ábra Etilén-oxid kezelés (1 óra, 37°C) hatására létrejött, csóvahossz paraméterrel jellemzett DNS károsodás a vizsgált sejtípusokban. Az adatok 3-6 kísérletből átlagolt értékek (szórás jelölése hibasávokkal). A üres adatpontok a kezeletlen sejtek megfelelő alapértékeihez viszonyított nem szignifikáns növekedést reprezentálják ( $p>0,05$ )

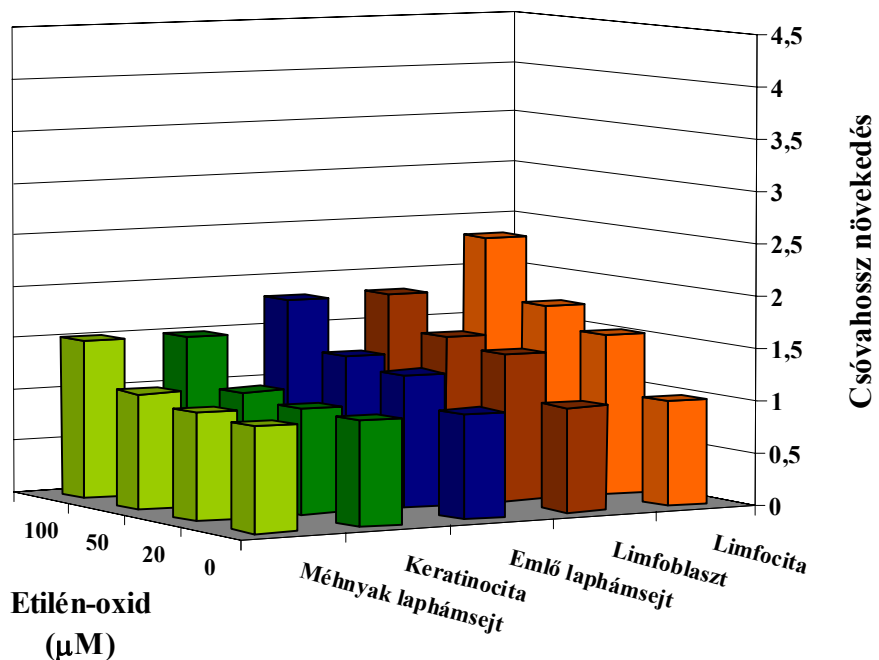
A tail moment (TM), csóva DNS tartalom és csóvahossz (TL) értékek statisztikailag szignifikáns emelkedése volt megfigyelhető a 0–100  $\mu\text{M}$  koncentráció tartományban (10.a,b,c ábra).



10.a ábra Etilén-oxid kezelés (1 óra, 37°C) hatására létrejött, tail moment paraméterrel jellemzett DNS károsodás növekedése a vizsgált sejtípusokban



10.b ábra Etilén-oxid kezelés (1 óra, 37°C) hatására létrejött, csóva DNS tartalom paraméterrel jellemzett DNS károsodás növekedése a vizsgált sejtípusokban



10.c ábra Etilén-oxid kezelés (1 óra, 37°C) hatására létrejött, csóvahossz paraméterrel jellemzett DNS károsodás növekedése a vizsgált sejtípusokban

Hasonló dózis-hatás görbéket nyertünk a keratinocita és méhnyak laphámsejt kultúrákon. A kezeletlen sejtek DNS károsodási értékeihez képest (keratinocitáknál TM 1,94; TD 12,88%; TL 13,9  $\mu\text{m}$ ; méhnyak laphámsejtekénél TM 2,17; TD 11,6%; TL 11,75  $\mu\text{m}$ ) minimális emelkedést figyeltünk meg 50  $\mu\text{M}$ -os etilén-oxid koncentráció értékig; jelentős növekedés csupán a 50–100  $\mu\text{M}$  tartományban volt kimutatható. A vizsgált koncentrációtartományban észlelt maximális károsodás a többi vizsgált sejtípushoz viszonyítva e kultúrákban adódott a legkisebbnek (mintegy kétszeres TM, 1,5-szeres TD és TL növekedés). A DNS károsodás statisztikailag szignifikáns növekedését 50  $\mu\text{M}$  etilén-oxid indukálta a tail moment (2,39 és 2,54,  $p < 0,05$ ) és csóva DNS tartalom (15,78% és 12,08%,  $p < 0,05$ ), valamint 100  $\mu\text{M}$  a csóvahossz paramétereinél (14,76  $\mu\text{m}$ ,  $p < 0,05$  és 19,6  $\mu\text{m}$ ,  $p < 0,01$ ).

A kezeletlen humán perifériás limfocitákra a többi sejtípushoz képest alacsony DNS károsodási szint volt jellemző (TM 1,23; TD 8,57%; TL 10,12  $\mu\text{m}$ ). A mért paraméterek dózis-hatás görbéinek lefutása közel lineárisnak adódott, és az értékek a legmagasabb emelkedést mutatták a vizsgált sejtípusok között a 0–100  $\mu\text{M}$  koncentrációtartományban (több mint 4-szeres TM, 2-szeres TD és TL). A limfocitáknál a DNS károsodás szignifikáns emelkedése a tail moment és csóva DNS tartalom paraméterek esetén 20  $\mu\text{M}$  etilén-oxid kezelésnél (TM 2,11,  $p < 0,001$ ; TD 11,09%,  $p < 0,01$ ), míg a csóvahossz értékekkel jellemezhetően az 50  $\mu\text{M}$ -os kezelés után következett be (TL 17,59  $\mu\text{m}$ ,  $p < 0,05$ ).

Az emlő laphámsejtek és a limfoblasztok esetében a kezeletlen sejtek DNS károsodási szintjéhez képest (emlő laphámsejtekénél TM 2,77; TD 12,01%; TL 16,74  $\mu\text{m}$ ; limfoblasztoknál TM 2,04; TD 13,19%; TL 13,28  $\mu\text{m}$ ) az etilén-oxid expozíció hatására kialakuló növekedés hasonlóan mutatkozott. A tail moment értékek növekedése jelentős volt a 0–100  $\mu\text{M}$  koncentrációtartományban (3-szoros); a csóva DNS tartalom és csóvahossz értékek szintén hasonló mértékű emelkedést mutattak (több mint 1,8-szeres) mindkét sejtípusnál. A kezeletlen sejtekhez viszonyítva szignifikáns, tail moment és csóvahossz paraméterekkel jellemzett DNS károsodás volt megfigyelhető mindkét sejtvonala esetében 20  $\mu\text{M}$  etilén-oxid kezelésnél (TM 3,33 és 3,09,  $p < 0,05$ ; TL 21,24  $\mu\text{m}$  és 18,72  $\mu\text{m}$ ,  $p < 0,05$ ). Az emlő laphámsejtek és a limfoblasztok csóva DNS tartalom értékeinek szignifikáns emelkedése 50  $\mu\text{M}$ -os etilén-oxid expozíció után következett be (TD 20,26%,  $p < 0,01$  és 18,21%  $p < 0,05$ ).

## 6. MEGBESZÉLÉS

Az etilén-oxid jól ismert mutagén és karcinogén anyag; a genotoxikus tulajdonságát vizsgáló tanulmányok száma azonban egyéb hasonló jelentőségű rákkeltőkéhez viszonyítva korlátozott. Az etilén-oxid DNS károsító hatását mostanáig csupán egyetlen tanulmányban vizsgálták – egyéb módszerek mellett – üstökös elektroforézissel, s ebben az esetben is az etilén-oxid expozíció célsejtjeinek nem tekinthető humán fibroblasztok *in vitro* tenyésztésében, az eredmények vizuális értékelésével [2]. A módszer használatának elsődleges célja nem a károsodás mértékének jellemzése, hanem a károsodási szint sejtek közötti megoszlásának tanulmányozása volt.

Vizsgálataink célja az etilén-oxid DNS károsító hatásának tanulmányozása volt *in vitro* körülmények között humán emlő laphámsejtekben, limfoblasztokban, perifériás limfocitákban, keratinocitákban és méhnyak laphámsejtekben a citotoxicitás és a dózis-hatás összefüggés jellemzésével. A tanulmányozott sejtípusok kiválasztásában a humán expozíciók gyakorlati vonatkozásai játszottak szerepet. A limfoblasztok vizsgálatát az indokolta, hogy az etilén-oxid expozíció emberben bizonyítottan főként leukémia és limfóma kialakulását idézi elő. Az emlő laphámsejtek tanulmányozásának oka az egri kórház nővéreinek körében megfigyelt emlőrákos esetek és az őket ért etilén-oxid expozíció közötti összefüggés kapcsán megfogalmazott feltételezés, miszerint e sejtek is lehetnek az etilén-oxid expozíció célsejtjei. A perifériás limfociták vizsgálatát az indokolta, hogy a gyakorlatban a genotoxikus hatásra adott korai válasz monitorozására ezt a könnyen nyerhető humán sejtpopulációt alkalmazzák. A keratinociták és méhnyak laphámsejtek bevonása a vizsgálatokba viszonyítási alapul szolgált, mivel bőr- és méhnyakrák kialakulását etilén-oxid expozícióval összefüggésben még nem írták le.

Az etilén-oxid rákkeltő tulajdonságának sejt- illetve szerv-specificitása heves viták tárgya. Az etilén-oxid expozícióval összefüggő leggyakrabban megfigyelt neopláziák a vérképző rendszeri malignómák [18–20]. Epidemiológiai eredmények alapján Norman és mtsi. felvetették, hogy munkahelyi etilén-oxid expozíció hatására emlőrák alakulhat ki [17], az etilén-oxid expozíció és emlőrákos mortalitás közötti pozitív dózis-hatás összefüggésre Steenland és mtsi. is szolgáltatott a közelmúltban adatokat [21,22]. Más vizsgálatok azonban nem támasztották alá ezt a feltételezést [23,24]. Az etilén-oxidnak emlőrák kialakulásában

játszott lehetséges szerepére utaló adatokat Magyarországon Müller és Bertók közölt [25], s e feltételezést később *in vivo* genotoxikológiai [10] és epidemiológiai vizsgálatok is alátámasztották [27]. Eredményeink további megerősítést – bár nem közvetlen bizonyítékot – szolgáltatnak arra, hogy etilén-oxid expozíció hozzájárulhat emlőrák kialakulásához.

Nagymértékű DNS károsodás létrejöttét figyeltünk meg 20  $\mu\text{M}$  etilén-oxiddal kezelt emlő laphámsejtekben, ami hasonlónak mutatkozott a limfoblasztokban és perifériás limfocitákban tapasztalt hatáshoz. A keratinociták és méhnyak laphámsejtek etilén-oxiddal szembeni érzékenysége jelentősen kisebb volt, mivel a tail moment és csóva DNS tartalom értékeik csupán 50  $\mu\text{M}$  feletti dózisoknál emelkedtek meg szignifikánsan. Ráadásul ezekben a sejtekben csak 100  $\mu\text{M}$  etilén-oxiddal végzett kezelés után következett be a csóvahossz szignifikáns növekedése.

Jelen vizsgálatainkban emelkedett DNS károsodás alacsonyabb etilén-oxid koncentrációknál volt megfigyelhető, mint amiket más végpontokat elemző tanulmányok közöltek. Ez valószínűleg az üstökös elektroforézis magas szenzitivitásának tudható be. Korábbi megfigyelésekben a mutációs frekvencia és DNS károsodás szignifikáns növekedése humán fibroblasztokban *HPRT* mutációs teszttel és alkalikus DNS denaturálással mérve 2,5 mM-os etilén-oxid kezelésnél következett be [4]. Alkalikus elúciós technikát alkalmazva szignifikáns DNS károsodást 1 mM-os etilén-oxid expozíciónál lehetett megfigyelni humán perifériás limfocitákban és 0,5 mM-nál kínai hörcsög ovárium sejtekben [3,35]. Az etilén-oxid belső dózisára vonatkozó megbízható humán adatok nem állnak rendelkezésre, az értékeket becsülni csak állatkísérletes eredmények extrapolációjával lehet. Beliles és Parker határozta meg az etilén-oxid hozzávetőleges belső dózisát állatkísérletekből származó toxikokinetikai adatok alapján [54]. A 8 órás, 1,8  $\text{mg}/\text{m}^3$  (1 ppm) légtér-koncentrációjú etilén-oxid expozíció hatására kialakuló vérplazma koncentráció időfüggvényének görbe alatti területét 18,8  $\mu\text{g}\times\text{h}/\text{ml}$  (426  $\mu\text{mol}\times\text{h}/\text{l}$ ) értékűnek becsülték patkányokon, és 14,3  $\mu\text{g}\times\text{h}/\text{ml}$  (324  $\mu\text{mol}\times\text{h}/\text{l}$ ) értékűnek kutyákon végzett kísérletekből származó adatok alapján. Az állatkísérletes adatok emberre történő vonatkoztatása korlátozott értékű, továbbá a belső dózis nem feltétlenül tükrözi a biológiailag hatékony dózist, mindazonáltal a fenti adatok alapján megállapítható, hogy a vizsgálatainkban használt alacsony etilén-oxid koncentrációk a korábban alkalmazott magas dózisoknál pontosabban reprezentálhatják az exponált egyéneknél kialakuló plazmaszinteket.

A DNS károsodás növekedése a 0–100  $\mu\text{M}$  koncentrációtartományban a vizsgált sejtípusok közül a perifériás limfocitákban volt a legmagasabb, különösen a tail moment értékek

esetében (4,3-szeres). Feltételezhető, hogy a nem osztódó kezeletlen limfociták alacsony DNS károsodási szintje lehet az oka a nagymértékű emelkedésnek, mivel a DNS károsodás abszolút értékei a perifériás limfocitáknál többnyire alacsonyabbak, mint a limfoblasztok vagy emlő laphámsejtek esetében. A heterogén limfocita populációban változó arányban jelen lévő érzékeny sejtsoportoknak tulajdonítható, hogy az ismételt kísérletek átlagértékei nagy szórást mutatnak a többi sejttípushoz viszonyítva, ami szintén közrejátszhat a DNS károsodás nagymértékű emelkedésében. A vizsgálataink szempontjából jelentős, valós expozíciós körülményekre leginkább jellemző legalacsonyabb koncentrációtartományban (0–50  $\mu\text{M}$ ) az etilén-oxid genotoxikus hatására adott válasz nem különbözött jelentősen az emlő laphámsejteknél, limfoblasztoknál és perifériás limfocitáknál, így feltételezhető ezen sejttípusok hasonló érzékenysége. Az etilén-oxid alacsony koncentrációi által okozott kiterjedt DNS károsító hatást nem figyelhettünk meg keratinocitákban és méhnyak laphámsejtekben, ami e sejteknek a többi vizsgált sejttípusnál alacsonyabb érzékenységre utal a vizsgált genotoxikus hatással szemben. A megfigyelést alátámasztotta a DNS károsodás 0–100  $\mu\text{M}$  dózistartományban megfigyelt lassú növekedése csakúgy, mint a szignifikáns genotoxikus hatás kifejtéséhez keratinocitákban és méhnyak laphámsejtekben szükséges magas etilén-oxid koncentráció.

A humán limfoblasztok és emlő laphámsejtek érzékenysége alig különbözött. Ez megerősíti azt a feltételezést, hogy az emlő laphámsejtek a csontvelő sejtekhez hasonlóan az etilén-oxid expozíció által kiváltott DNS károsodás célsejtjei. Az alkalmazott *in vitro* modellnek nagy előnye a kontrollált, a különböző kezelési dózisok kivételével teljesen azonos laboratóriumi környezet biztosítása, de mivel nem valós humán expozíciós helyzet tanulmányozása történt, az eredményeink *in vivo* körülményekre történő extrapolálása körültekintő megfontolást igényel. Az etilén-oxid az emberi szervezetben mind spontán, mind enzimatis úton bomlik, így feltételezhető, hogy a légző szervrendszeren keresztüli behatolás esetén az etilén-oxidnak az emlő laphámsejtjeit elérő koncentrációja – a biológiailag effektív dózis – alacsonyabb, mint a limfocitákra, az erekben gazdag csontvelő sejteire, vagy gasztrointesztinális felvétel esetén a gyomorhámra ható dózis. Az etilén-oxid toxikokinetikai jellemzőinek feltárása ezért további vizsgálatokat igényel.

Az üstökös elektroforézissel kimutatható, szignifikáns DNS károsodást előidéző legalacsonyabb etilén-oxid koncentráció megállapításának munkaegészségügyi jelentősége az, hogy egyéb vizsgálatokkal együtt segítséget nyújthat, kiegészítő információval szolgálhat a munkalégtér határértékek megállapításához, illetve módosításához.



Az üstökös elektroforézis szenzitív, de nem specifikus módszer DNS károsodás kimutatására. A mérési eredmények alapján nem lehet különbséget tenni a különféle károsodási formák között, csupán indirekt módon következtetni rájuk. Természetesen e módszerrel nem lehet meghatározni a genotoxikus anyag fajtáját sem, ezért a lehetséges zavaró tényezők figyelembe vételének a gyakorlatban nagy a jelentősége. Mindazonáltal az etilén-oxid és bármely egyéb génekárosító anyag expozíciójának kitett dolgozók véréből izolált humán perifériás limfociták DNS károsodásának kimutatása üstökös elektroforézissel a genotoxikus hatásokra adott korai választ detektáló biomonitor hasznos elemévé válhat, hozzájárulva az egyéni kockázati szint tökéletesebb meghatározásához.

## 7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS AJÁNLÁSOK

Következtetések:

1. Az etilén-oxid 0–1000  $\mu\text{M}$  koncentrációtartományban üstökös elektroforézissel kimutatható dóziszfüggő DNS károsodást hoz létre humán emlő laphámsejtekben, limfoblaszokban, perifériás limfocitákban, keratinocitákban és ményhak laphámsejtekben jelentős mértékű sejtelhalás előidézése nélkül.
2. A humán emlő laphámsejtek, limfoblaszok és perifériás limfociták érzékenysége az etilén-oxid génkárosító hatásával szemben lényegesen nem tér el egymástól, s szignifikánsan nagyobb a keratinociták és méhnyak laphámsejtek érzékenységénél.
3. Az emlő laphámsejtek a limfoblaszokhoz illetve perifériás limfocitákhoz hasonlóan az etilén-oxid expozíció célsejtjei lehetnek.
4. Az üstökös elektroforézis szenzitív, de nem specifikus módszert kínál az etilén-oxid indukálta DNS károsodás kimutatására.
5. Az etilén-oxid okozta DNS károsodás humán perifériás limfocitákban történő kimutatása üstökös elektroforézissel egy, a munkaegészségügyi vizsgálatokban használható potenciális biomarker.
6. A használt sejtvonalak megfelelő *in vitro* modellt szolgáltatnak az etilén-oxid genotoxikus tulajdonságának, hatásmechanizmusának további kutatásához.

Ajánlások:

1. Az etilén-oxid indukálta DNS károsodás részletes jellemzésére további vizsgálatok végezhetők az alkalmazott sejtvonalak, mint *in vitro* modellek felhasználásával.
2. Az etilén-oxid emberi szervezetben mutatott toxikokinetikai jellemzőinek részletes feltárása szükséges az *in vitro* eredmények valós expozíciókra történő pontosabb vonatkoztatásához.
3. További vizsgálatokat kell végezni annak alátámasztására, hogy az üstökös elektroforézis hatékonyan alkalmazható munkahelyi genotoxikus expozíciók által okozott DNS károsodás korai kimutatására.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az etilén-oxid az egyik legjelentősebb epoxid vegyület, melyet a Nemzetközi Rákkutató Intézet a bizonyítottan humán rákkeltők csoportjába sorolt. Nagy reakciókészsége miatt gyakran használt vegyipari intermedier és sterilizáló szer, képes alkilálni a DNS-t, lúglabilis sérüléseket és száltöréseket hozva létre. Etilén-oxid expozíciónak kitett dolgozók körében a leukémia és limfóma emelkedett előfordulási gyakoriságát figyelték meg; egyéb daganattípusok – például emlőrák – előidézésében betöltött szerepével kapcsolatban azonban ellentmondó eredmények születtek. A vizsgálataink célja különböző szövetekből származó sejtek érzékenységének összehasonlításával, az etilén-oxid szerv specifikus hatásának jellemzése révén, az emlőrák kialakulásában betöltött feltételezett szerepének tanulmányozása volt. Az anyag genotoxikus tulajdonságát üstökös elektroforézis alkalikus változatával vizsgáltuk primer és szekunder sejt kultúrákon a hatos oxidációs számú krómmal végzett hasonló kísérleteinknél kidolgozott *in vitro* rendszerben. A DNS károsodás jellemzése a csóva DNS tartalmával, csóvahosszal és tail moment értékekkel történt. A természetes célsejteket reprezentáló limfoblasztok etilén-oxid genotoxikus hatásával szembeni érzékenységét vetettük össze a feltételezett célsejtként számon tartott emlő laphámsejtek, a biológiai monitorozás számára könnyen hozzáférhető sejt populációt jelentő perifériás limfociták, valamint a célsejtnek nem tekinthető méhnyak laphámsejtek és keratinociták érzékenységével. Az etilén-oxid a DNS károsodás dóziszfüggő emelkedését hozta létre a 0–100  $\mu\text{M}$  koncentrációtartományban jelentős sejt elhalás nélkül. A DNS károsodás szintjének statisztikailag szignifikáns emelkedése volt kimutatható 20  $\mu\text{M}$  etilén-oxidos kezelés után limfoblasztokban, emlő laphámsejtekben és perifériás limfocitákban. Keratinocitákban és méhnyak laphámsejtekben szignifikáns emelkedés nem következett be, csak magasabb koncentrációknál (50–100  $\mu\text{M}$ ). Az eredmények az emlő laphámsejtek etilén-oxid genotoxikus hatásával szembeni fokozott érzékenységét jelzik. Megfigyeléseink további adatokat szolgáltatnak az etilén-oxid expozíció emlőrák kialakulásában betöltött feltételezett szerepének értékeléséhez, és az eredmények hozzájárulhatnak genotoxikus hatásokra adott korai választ monitorozó munkahelyi vizsgálatok kidolgozásához.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 60. Some industrial chemicals, IARC: Lyon, 1994.
- [2] Nygren J., Cedervall B., Eriksson S., Dušínká M., Kolman A. Induction of DNA strand breaks by ethylene oxide in human diploid fibroblasts, *Environ. Mol. Mutagen.* 24 (1994) 161–167.
- [3] Herrero M.E., Arand M., Hengstler J.G., Oesch F. Recombinant expression of human microsomal epoxide hydrolase protects V79 Chinese hamster cells from styrene oxide- but not from ethylene oxide-induced DNA strand breaks, *Environ. Mol. Mutagen.* 30 (1997) 429–439.
- [4] Kolman A., Bohušová T., Lambert B., Simons J.W.M. Induction of 6-thioguanine-resistant mutants in human diploid fibroblasts in vitro with ethylene oxide, *Environ. Mol. Mutagen.* 19 (1992) 93–97.
- [5] Kolman A., Chovanec M. Combined effects of  $\gamma$ -radiation and ethylene oxide in human diploid fibroblasts, *Mutagenesis* 15 (2000) 99–104.
- [6] Agurell E., Cederberg H., Ehrenberg L., Lindahl-Kiessling K., Rannug U., Törnqvist M. Genotoxic effects of ethylene oxide and propylene oxide: a comparative study, *Mutat. Res.* 250 (1991) 229–237.
- [7] van Sittert N.J., Boogaard P.J., Natarajan A.T., Tates A.D., Ehrenberg L.G., Törnqvist M.A. Formation of DNA adducts and induction of mutagenic effects in rats following 4 weeks inhalation exposure to ethylene oxide as a basis for cancer risk assessment, *Mutat. Res.* 447 (2000) 27–48.
- [8] Garcia C.L., Darroudi F., Tates A.D., Natarajan A.T. Induction and persistence of micronuclei, sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in splenocytes and bone-marrow cells of rats exposed to ethylene oxide, *Mutat. Res.* 492 (2001) 59–67.
- [9] Fuchs J., Wullenweber U., Hengstler J.G., Bienfait H.G., Hiltl G., Oesch F. Genotoxic risk for humans due to work place exposure to ethylene oxide: remarkable individual differences in susceptibility, *Arch. Toxicol.* 68 (1994) 343–348.

- [10] Major J., Jakab G.M., Tompa A. Genotoxicological investigation of hospital nurses occupationally exposed to ethylene oxide. I. Chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges, cell cycle kinetics, and UV-induced DNA synthesis in peripheral blood lymphocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* 27 (1996) 84–92.
- [11] Stolley P.D., Soper K.A., Galloway S.M., Nichols W.W., Norman S.A., Wolman S.R. Sister-chromatid exchanges in association with occupational exposure to ethylene oxide, *Mutat. Res.* 129 (1984) 89–102.
- [12] Mayer J., Warburton D., Jeffrey A.M., Pero R., Walles S., Andrews L., Toor M., Latriano L., Wazneh L., Tang D., Tsai W-Y., Kuroda M., Perera F. Biologic markers in ethylene oxide exposed workers and controls, *Mutat. Res.* 248 (1991) 63–176.
- [13] Yong L.C., Schulte P.A., Wiencke J.K., Boeniger M.F., Connally L.B., Walker J.T., Whelan E.A., Ward E.M. Hemoglobin adducts and sister chromatid exchanges in hospital workers exposed to ethylene oxide: effects of glutathione S-transferase T1 and M1 genotypes, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10 (2001) 539–550.
- [14] Lynch D.W., Lewis T.R., Moorman W.J., Burg J.R., Groth D.H., Khan A., Ackerman L.J., Cockrell B.Y. Carcinogenic and toxicologic effects of inhaled ethylene oxide and propylene oxide in F344 rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 76 (1984) 69–84.
- [15] Snellings W.M., Weil C.S., Maronpot R.R. A two-year inhalation study of the carcinogenic potential of ethylene oxide in Fischer 344 rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 75 (1984) 105–117.
- [16] Garman R.H., Snellings W.M., Maronpot R.R. Brain tumors in F344 rats associated with chronic inhalation exposure to ethylene oxide, *Neurotoxicology* 6 (1985) 117–137.
- [17] Norman S.A., Berlin J.A., Spoer K.A., Middendorf B.F., Stolley P.D. Cancer incidence in a group of workers potentially exposed to ethylene oxide, *Int. J. Epidemiol.* 24 (1995) 276–283.
- [18] Högstedt C., Malmqvist N., Wadman B. Leukemia in workers exposed to ethylene oxide, *JAMA* 241 (1979) 1132–1133.
- [19] Högstedt C., Aringer L., Gustavsson A. Epidemiologic support for ethylene oxide as a cancer-causing agent, *JAMA* 255 (1986) 1575–1578.
- [20] Hagmar L., Mikoczy Z., Welinder H. Cancer incidence in Swedish sterilant workers exposed to ethylene oxide, *Occup. Environ. Med.* 52 (1995) 154–156.
- [21] Steenland K., Whelan E., Deddens J., Stayner L., Ward E. Ethylene oxide and breast cancer incidence in a cohort of 7576 women (United States), *Cancer Causes Control* 14 (2003) 531–539.

- [22] Steenland K., Stayer L., Deddens J. Mortality analyses in a cohort of 18 235 ethylene oxide exposed workers: follow up extended from 1987 to 1998, *Occup. Environ. Med.* 61 (2004) 2–7.
- [23] Steenland K., Stayner L., Greife A., Halperin W., Hayes R., Hornung R., Nowlin S. Mortality among workers exposed to ethylene oxide, *N. Engl. J. Med.* 324 (1991) 1402–1407.
- [24] Coggon D., Harris E.C., Poole J., Palmer K.T. Mortality of workers exposed to ethylene oxide: extended follow up of a British cohort, *Occup. Environ. Med.* 61 (2004) 358–362.
- [25] Müller E., Bertók A. Az egri kórházban előfordult daganatos megbetegedések – higiénés viszonyok, konzekvenciák, *Kórház- és Orvostechnika* 33 (1995) 17–22.
- [26] Tompa A., Major J., Jakab M.G. Is breast cancer cluster influenced by environmental and occupational factors among hospital nurses in Hungary? *Pathol. Oncol. Res.* 5 (1999) 117–121.
- [27] Kardos L., Széles Gy., Gombkötő Gy., Szeremi M., Tompa A., Ádány R. Cancer death among hospital staff potentially exposed to ethylene oxide: an epidemiological analysis, *Environ. Mol. Mutagen.* 42 (2003) 59–60.
- [28] Celanese, Dow, Shell, Sunoco, Equistar. Ethylene Oxide. User's Guide. 2<sup>nd</sup> ed., [www.ethyleneoxide.com](http://www.ethyleneoxide.com), 1999.
- [29] Chemical & Engineering News. U.S. Organic Chemicals. Strong rebound led by urea and ethylbenzene; only acrylonitrile and dichloride faltered, *CEN* 81 (2003) 53.
- [30] Kertai P. Megelőző orvostan. A népegészségügy elméleti alapjai, *Medicina Könyvkiadó: Budapest*, 1999.
- [31] Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Ethylene oxide. (Final Report), ATSDR, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services: Atlanta, 1990.
- [32] Stanford Research Institute. Ethylene Oxide. Supply and Demand by Region–United States–Consumption–Other, In: SRI. Economics Handbook, SRI International: Menlo Park, 1997.
- [33] Nagylucskay S. A fertőző betegségek járványtana, In: Dési I. (ed) *Népegészségtan*, Semmelweis Kiadó: Budapest, 1995., pp. 61–72.
- [34] Ungváry Gy. (ed) *Munkaegészségtan*, Medicina Könyvkiadó: Budapest, 2000.

- [35] Hengstler J.G., Fuchs J., Gebhard S., Oesch F. Glycolaldehyde causes DNA-protein crosslinks: a new aspect of ethylene oxide genotoxicity, *Mutat. Res.* 304 (1994) 229–234.
- [36] Blair A., Kazerouni N. Reactive chemicals and cancer, *Cancer Causes Control* 8 (1997) 473–490.
- [37] International Programme of Chemical Safety. International Chemical Safety Cards. Ethylene oxide, IPCS: Geneva, 1993.
- [38] Shore R.E., Gardner M.J., Pannett B. Ethylene oxide: an assessment of the epidemiological evidence on carcinogenicity, *Br. J. Ind. Med.* 50 (1993) 971–997.
- [39] Teta M.J., Sielken R.L. Jr., Valdez-Flores C. Ethylene oxide cancer risk assessment based on epidemiological data: application of revised regulatory guidelines, *Risk Anal.* 19 (1999) 1135–1155.
- [40] Lucas L.J., Teta M.J. Breast cancer and ethylene oxide exposure, *Int. J. Epid.* 25 (1996) 685–686.
- [41] Östling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123 (1985) 291–298.
- [42] Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [43] Tice R.R. The single cell gel/Comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells, In: Phillips D.H., Venitt S. (eds) *Environmental Mutagenesis*, BIOS Scientific Publishers: Oxford, 1995., pp. 315–339.
- [44] Collins A.R., Duthie S.J., Dobson V.L. Direct enzymatic detection of endogenous base damage in human lymphocyte DNA, *Carcinogenesis* 14 (1993) 1733–1735.
- [45] Collins A.R., Dušinska M., Gedik C.M., Štětina R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ. Health Perspect.* 104(Suppl. 3) (1996) 465–469.
- [46] Collins A.R., Dušinska M., Franklin M., Somorovská M., Petrovská H., Duthie S., Fillion L., Panayiotidis M., Rašlová K., Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications, *Environ. Mol. Mutagen.* 30 (1997) 139–146.
- [47] Fairbairn D.W., Olive P.L., O’Neil K.L. The comet assay: a comprehensive review, *Mutat. Res.* 339 (1995) 37–59.

- [48] Uzawa A., Suzuki G., Nakata Y., Akashi M., Ohyama H., Akanuma A. Radiosensitivity of CD45RO<sup>+</sup> memory and CD45RO<sup>-</sup> naive T cells in culture, *Radiat. Res.* 137 (1994) 25–33.
- [49] Moretti M., Villarini M., Scassellati-Sforzolini G., Monarca S., Libraro M., Fatigoni C., Donato F., Leonardis C., Perego L. Biological monitoring of genotoxic hazard in workers of the rubber industry, *Environ. Health Perspect.* 104(Suppl. 3) (1996) 543–546.
- [50] Sardaş S., Aygün N., Gamli M., Ünal Y., Ünal N., Berk N., Karakaya A.E. Use of alkaline Comet assay (single cell gel electrophoresis technique) to detect DNA damages in lymphocytes of operating room personnel occupationally exposed to anaesthetic gases, *Mutat. Res.* 418 (1998) 93–100.
- [51] Hartmann A., Fender H., Speit G. Comparative biomonitoring study of workers at a waste disposal site using cytogenetic tests and the comet (single-cell gel) assay, *Environ. Mol. Mutagen.* 32 (1998) 17–24.
- [52] Ündeger Ü., Basaran N., Kars A., Güç D. Assessment of DNA damage in nurses handling antineoplastic drugs by the alkaline COMET assay, *Mutat. Res.* 439 (1999) 277–285.
- [53] Böyum A. Separation of lymphocytes from blood and bone marrow, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 (1968) 51–76.
- [54] Beliles R.P., Parker J.C. Risk assessment and oncodynamics of ethylene oxide as related to occupational exposure, *Toxicol. Ind. Health* 3 (1987) 371–382.



## 10. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### Az értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények

**Ádám B.**, Bárdos H., Ádány R. Increased genotoxic susceptibility of breast epithelial cells to ethylene oxide, *Mutat. Res.* 585 (2005) 120–126.

IF: 2,020

Hodges N.J.\*, **Ádám B.**\*, Lee A.J.\*, Cross H.J., Chipman J.K. Induction of DNA-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes and A549 lung cells by sodium dichromate: association with 8-oxo-2-deoxyguanosine formation and inter-individual variability, *Mutagenesis* 16 (2001) 467–474.

\*First three authors contributed equally to this work

IF: 1,538

### Egyéb in extenso közlemények és idézhető absztraktok

**Ádám B.**, Tóth L., Pásti G., Ádány R. Contact stimulation of fibroblasts for tenascin production by melanoma cells (közlésre elküldve)

**Ádám B.**, Varga Cs., Ádány R. Repair of induced DNA strand breaks as a biomarker of individual susceptibility to cancer. *Toxicol. Lett.*, 123 (Suppl. 1) (2001) 101. (abstract)

**Ádám B.**, Hodges N.J., Lee A.J., Cross H.J., Chipman J.K. Induction of DNA-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes and A549 lung cells by sodium dichromate. *Toxicol. Lett.*, 123 (Suppl. 1) (2001) 122. (abstract)

## **Előadások és poszterek**

**Ádám B.**, Varga Cs., Ádány R. Indukált DNS száltörések javításának képessége, mint a daganatos megbetegedésekkel szembeni egyéni fogékonyság biomarkere. *In vitro* módszer a reparációs kapacitás mérésére. Magyar Humángenetikusok Konferenciája, Debrecen, 2001.

**Ádám B.**, Varga Cs., Ádány R. Az indukált DNS száltörések javításának képessége, mint a daganatos megbetegedésekkel szembeni egyéni fogékonyság biomarkere. *In vitro* módszer a reparációs kapacitás mérésére. Népegészségügyi Tudományos Társaság (NETT) X. Nagygyűlése, Békéscsaba, 2001.

**Ádám B.**, Hodges N.J., Lee A.J., Cross H.J., Chipman J.K. Hexavalens króm indukálta DNS károsodás vizsgálata. Népegészségügyi Tudományos Társaság (NETT) XI. Nagygyűlése, Nyíregyháza, 2002.

**Ádám B.**, Bárdos H., Ádány R. Etilén-oxid genotoxikus hatásának vizsgálata humán emlő laphámsejtekben, lymphoblastokban és perifériás lymphocytákban üstökös elektroforézissel. Népegészségügyi Tudományos Társaság (NETT) XII. Nagygyűlése, Hévíz, 2003.

**Ádám B.**, Bárdos H., Ádány R. Az etilén-oxid genotoxikus hatásának vizsgálata különböző sejt kultúrákon – az emlő epithelialis sejtek fokozott érzékenysége. „A népegészségügy kihívásai és lehetőségei a posztgenomika évszázadában” Szimpózium, Hajdúszoboszló, 2004.

**Ádám B.**, Bárdos H., Ádány R. Az etilén-oxid genotoxikus hatásának sejt típus függése. Népegészségügyi tudományos társaság (NETT) XIII. Nagygyűlése, Szekszárd, 2004. (poszter)

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Mindenek előtt köszönöm témavezetőmnek, Ádány Róza Professzornőnek, hogy a Ph.D. munkámat útmutatásával segítette. Köszönettel tartozom továbbá Bárdos Helgának a kezdeteknél nyújtott segítségéért, Kovács Györgynének és Nagy Istvánnének a sejtek előkészítéséért, valamint az Iskola minden dolgozójának a támogatásért. Végül, de nem utolsó sorban szívből köszönöm feleségemnek, két kisfiamnak és családom többi tagjának, hogy odaadó türelmükkel, támogatásukkal segítették munkámat.

## **11. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK**