

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

DR. ÁDÁM BALÁZS

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

DEBRECEN, 2005.

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**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.

1. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Etilén-oxid

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

1.1.1. Tulajdonságok, expozíció

Az etilén-oxid (C_2H_4O) színtelen, édeskés, éterhez hasonlatos szagú gáz. Molekulaszerkezetileg gyűrűs éter vegyület, ennek köszönhető fokozott reaktivitása. Az erősen gyúlékony ETO széles körben használt vegyipari intermedier. Antimikrobás hatása okán több helyen alkalmazzák tisztító, fertőtlenítő és sterilizáló szerként. Az élelmiszeripar élelmiszerek fertőtlenítésére, az egészségügy orvosi eszközök sterilizálására használja.

Emberi expozíció elsősorban munkahelyi környezetben inhaláció útján következik be, mely főként az etilén-oxidot 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 kórházak ETO gázsterilizátorait működtetők által elszenvedett expozíciós szint az iparhoz hasonlóan $0,1\text{--}20\text{ mg/m}^3$ között jellemző 8 órás súlyozott átlagban. A legmagasabb légtér-koncentrációk (akár néhány ezer mg/m^3) kialakulása a sterilizálási folyamat végén a sterilizáló ajtajának kinyitásakor és a gáz leengedésekor, valamint a gázpalackok cseréjekor következhet be, és összefüggésbe hozható a sterilizáló nem megfelelő tervezésével, karbantartásával, illetve használatával. Egy magyarországi megyei kórház nővértartózkodójában – ahol ETO gázsterilizátort működtettek 1976–1992 között szabálytalanul – mért légtér koncentrációk $5\text{--}150\text{ mg/m}^3$ tartományban mozogtak.

1.1.2. Akut és krónikus egészségkárosító hatás

Az etilén-oxid akut toxicitása jelentős. Lokális heveny hatásként erősen irritálja a bőrt és nyálkahártyákat. Szisztémásan gyakran idéz elő általános panaszokat, súlyosabb esetben beszédzavarok, inkoordináció léphet fel. Nagy dózisban tüdővizenyőt, narkózist okoz.

Krónikus ETO expozíció katarakta képződését idézi elő szemén, okozhatja a légzőrendszer és a bőr krónikus gyulladását, a bőrre szenzibilizáló hatással lehet. Krónikus kitettség a máj, a perifériás és a központi idegrendszer károsodásához vezet. Az ETO késői toxikus hatásai között említhető, hogy embriotoxikus és teratogén. A munkahelyen etilén-oxiddal exponált nők között megnő a spontán vetélések száma, beszámoltak férfi fertilitást csökkentő hatásáról is.

1.1.3. Genotoxicitás, mutagenitás, rákkeltő hatás

Az etilén-oxid a többi epoxid vegyülethez hasonlóan direkt módon alkiláló anyag. Nagy reaktivitásának köszönhetően a sejtek makromolekuláival – nukleinsavakkal és fehérjékkel – adduktokat képez. Az ETO alkilálni képes egyes fehérjék (pl. hemoglobin) aminosav oldalláncait, valamint a DNS bázisait (purin bázisok) és foszfát csoportjait. A módosulás elsősorban az N-7-guanin helyen következik be N-7-alkil(hidroxi-etil)-guanin képződésével, aminek következtében a guanint a dezoxiribóz gyűrűhöz kapcsoló glikozil kötés destabilizálódik, gyakran spontán bázisvesztést idézve elő. Emellett a módosult bázisokra specifikus N-glikozilázok működése is hozzájárul a purin bázis hiányos helyek számának emelkedéséhez.

Az ETO genotoxikus és mutagén tulajdonságait számos *in vitro* vizsgálat, *in vivo* állatkísérlet és humán epidemiológiai tanulmány bizonyította. A *Salmonella typhimurium* Ames reverz mutációs tesztben az ETO pozitív eredményt adott egyes törzsekkel, képesnek mutatkozott DNS száltöréseket, hipoxantin(guanin)-foszforibozil-transzferáz (*HPRT*) génmutációkat és testvérkromatid kicserélődést indukálni sejt kultúrákban; *HPRT* mutációkat, kromoszómakárosodást, mikronukleusz képződést és testvérkromatid kicserélődést létrehozni állatokban; valamint DNS száltöréseket, kromoszómakárosodást és testvérkromatid kicserélődést előidézni az emberi szervezetben.

Bár az etilén-oxid belélegezve számos daganattípus kifejlődését indukálta állatkísérletekben, az epidemiológiai vizsgálatok ellentmondásos eredményeket szolgáltatottak az anyag humán karcinogén tulajdonságáról. Norman és mtsi. vetették fel az ETO expozíció lehetséges szerepét az emlőrák kialakulásában, de a hipotézis máig vitatott. Amellett, hogy elfogadottan képes leukémiát és limfómát előidézni, számos vizsgálat mutatott rá az ETO egyéb

daganattípusok, például emlőrák kialakulásában betöltött szerepére, míg más tanulmányok negatív eredményre jutottak.

Daganatos betegségek, köztük emlőrák, halmozódását figyelték meg az egri Markhot Ferenc Kórház dolgozói között. A rákos megbetegedések fokozott incidenciájának hátterében Tompa és mtsi. nem megfelelően üzemeltetett gázsterilizátorból származó ETO expozíciót feltételeztek. Az exponált személyek perifériás limfocitáiban kimutatták a kromoszómakárosodások és testvérkromatid kicserélődések szintjének megemelkedését. Az ETO emlőrák kialakulásában feltételezett szerepét szintén alátámasztotta egy, a kórházi kohorszon Kardos és mtsi. által végzett, indirekt standardizáláson alapuló epidemiológiai vizsgálat, amely a halálozási arányszám statisztikailag erősen szignifikáns növekedését találta a kérdéses, expozíciónak kitett populációban (SHH = 251–273%).

1.1.4. A rákkeltő hatás munkaegészségügyi vonatkozásai

A kémiai biztonságról szóló 2000. évi XXV. Törvény alapján a 25/2000. EüM-SzCsM együttes rendelet 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 állapít meg, amit a legrövidebb időre sem szabad túllépni a munkahelyeken. Az ETO esetében Magyarországon ez 1,8 mg/m³ (1 ppm). Az Egyesült Államok Munkaegészségügyi és Munkabiztonsági Hivatala (OSHA) által etilén-oxidra meghatározott kötelező érvényű munkalégtér határérték (permissible exposure limit, PEL) megegyezik a hazánkban alkalmazottal (1,8 mg/m³), az Egyesült Királyságban megállapított határérték (maximum exposure level, MEL) viszont magasabb (10 mg/m³).

1.2. Üstökös elektroforézis

A DNS károsodás mértékének egyedi sejtekben történő meghatározását a sejszintű DNS gél elektroforézis (üstökös elektroforézis) kifejlesztésével Östling és Johanson valósította meg. A módszer tökéletesítése Singh és mtsi. nevéhez fűződik, akik bevezették az alkalikus közegben végzett DNS denaturálást és elektroforézist, lehetővé téve 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.

1.2.1. Módszer, alkalmazás

Az üstökös elektroforézis alkalikus változata szenzitív és viszonylag egyszerű módszer a DNS egyszeres és kétszeres száltöréseinek, valamint lúglabilis sérüléseinek kimutatására. A mikroszkóp tárgylemezre felvitt agaróz gélbe ágyazott sejtek citoplazmájának magas só és detergens koncentrációjú, lúgos közegben végzett emésztése után visszamaradó sejtmag DNS tartalmának kettős hélix szerkezete alkalikus közegben felbomlik, lehetővé téve az egyszeres száltörések, sőt a magas pH-n egyszeres száltöréssé alakuló lúglabilis sérülések kimutatását is. Az elektroforézis folyamán az alacsony feszültségű elektromos mezőben a károsítatlan nagyméretű DNS molekula helyben marad, míg a sérült, letört láncdarabok az anód felé vándorolva „csóvát” képeznek, melynek mérete (a migráció mértéke) arányos a DNS károsodás szintjével.

Az üstökös elektroforézis 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. Érzékenysége miatt az üstökös elektroforézis hasznos eszköznnek bizonyult molekuláris epidemiológiai tanulmányokban is, elsősorban a genotoxikus anyagokkal exponált személyekből származó minták sejtjeiben jelenlévő DNS károsodás meghatározására.

1.2.2. 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 (Cr^{VI}) végzett kísérleteink során történt. Az IARC által bizonyítottan humán rákkeltőként jellemzett Cr^{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^{VI} expozíció genotoxikológiai hatásának tanulmányozására. Vizsgálatainkban a Cr^{VI} DNS károsító hatását két sejtpopuláción jellemeztük, humán perifériás limfociták és II típusú pneumociták (A549 humán tüdő karcinóma sejtvonal; ECACC No. 86012804) tenyészetin. 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 μM volt a limfociták, illetve 10 μM 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^{VI} 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.

2. 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?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3. 1. Sejtkultúrák

A humán limfoblasztok (HL-60 humán promielocitás leukémia sejtvonal; ECACC No. 93021013) tenyésztése 20% borjú savóval kiegészített RPMI 1640 médiumban történt. A többi sejtvonal letapadó sejtréteggént nőtt: a humán emlő laphámsejtek (BT-474 humán epiteloid ductális emlő karcinóma sejtvonal; ATCC No. MTB-20) RPMI 1640 médiumban (20% borjú savó), a humán keratinociták (HaCaT spontán transzformálódott humán keratinocita sejtvonal; Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) és méhnyak laphámsejtek (HeLa humán méhnyak epiteloid karcinóma sejtvonal; ECACC No. 93021013) pedig DMEM médiumban (10% borjú savó). Az összes sejtkultúrát 25 cm²-es sejtenyésztő flasksokban, 37°C hőmérsékletű, 5%-os CO₂ és magas páratartalmú légkört biztosító inkubátorban tenyésztettük.

Az emberi vérminták ismételten ugyanattól az egészséges, nem dohányzó felnőtt férfi donortól származtak, és vérvétel után közvetlenül kerültek felhasználásra. A limfocitákat szeparálás után 10% borjú savóval kiegészített RPMI 1640 médiumban szuszpendáltuk.

A sejtek életképességének meghatározásához a sejtmembrán sértetlenségét kimutató tripan kék tesztet használtuk vizsgálataink folyamán. 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.

3.2. 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 membrános kupakú üvegcsébe mérve 4°C-os PBS pufferben (pH 7,5) nyelettük el. A törzsoldatból hígítások a sejtenyésztő 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 2×10^5 sejt/ml médium sejtsűrűségű tenyészeit műanyag csőben kezeltük 37°C -on 1 óráig. A letapadó emlő laphámsejtek, keratinociták és méhnyak laphámsejtek 12 lyukú sejtenyészítő plate felszínén nőttek konfluens sejtréteggé, mielőtt a kultúrákat 37°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 centrifugálást követően választottuk le. Minden sejt-kultúrát mosás után szérumentes médiumban 1000 sejt/ μl médium sűrűségben szuszpendáltunk az üstökös elektroforézishez.

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

3.3. Üstökös elektroforézis

A genotoxicitás vizsgálatához az üstökös elektroforézis alkalikus változatát használtuk a következő módosításokkal: egyik oldalukon érdesített tárgylemezeket 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 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 ($\text{pH} > 13$). Az elektroforézis ugyanebben a közegben zajlott horizontális elektroforézis kádban 20 percig szobahőmérsékleten $0,8 \text{ V/cm}$ ($\sim 300 \text{ mA}$)

feszültségű elektromos térben. A lemezeket ezután 3×5 percig mostuk neutralizáló pufferben, majd szárítás után etidium-bromiddal festettük. Minden mintából két párhuzamos lemez készült.

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

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 ($\text{tail moment} = \text{csóva DNS tartalom}(\%) \times \text{csóvahossz}$) automatikusan származtatta. A képanalizáló szoftver mérési programja a háttérintenzitásra történő korrekció után kijelezte az egész kép intenzitásgörbáját, majd a legnagyobb intenzitást mutató pontra tükrözve meghatározta a fej intenzitását. A két intenzitásgörbe különbsége adta a csóva intenzitását. 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.

3.4. Statisztikai elemzés

Az etilén-oxid különböző dózissai által 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.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Etilén-oxid citotoxicitás

A vizsgált sejttípusok életképességét a 0–1000 μM 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 μM 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.

4.2. Etilén-oxid genotoxicitás

Az etilén-oxid genotoxikus tulajdonságának elemzése különböző humán sejtvonalakban a DNS károsodást jelző paraméterek dózis-hatás görbéinek összehasonlításával történt. A tail moment (TM), csóva DNS tartalom és csóvahossz (TL) értékek statisztikailag szignifikáns emelkedése volt megfigyelhető a 0–100 μM koncentráció tartományban.

Hasonló dózis-hatás görbét nyertünk a keratinocita és méhnyak laphámsejt kultúrákon. A kezeletlen sejtek DNS károsodási értékeihez képest (keratinocitáknál TM 1,94; TD 12,88%; TL 13,9 μm ; méhnyak laphámsejtekénél TM 2,17; TD 11,6%; TL 11,75 μm) minimális emelkedést figyeltünk meg 50 μM -os etilén-oxid koncentráció értékig; jelentős növekedés csupán az 50–100 μM tartományban volt kimutatható. A vizsgált koncentrációtartományban észlelt maximális károsodás a többi vizsgált sejttípushoz viszonyítva e kultúrákban adódott a legkisebbnek (mintegy kétszeres TM, 1,5-szeres TD és TL növekedés). A DNS károsodás statisztikailag szignifikáns növekedését 50 μM 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 μM a csóvahossz paramétereknél (14,76 μm , $p < 0,05$ és 19,6 μm , $p < 0,01$).

A kezeletlen humán perifériás limfocitákra a többi sejttípushoz képest alacsony DNS károsodási szint volt jellemző (TM 1,23; TD 8,57%; TL 10,12 μm). A mért paraméterek dózis-hatás görbéinek lefutása közel lineárisnak adódott, és az értékek a legmagasabb emelkedést mutatták a vizsgált sejttípusok között a 0–100 μM 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 μM etilén-oxid kezelésnél (TM 2,11, $p < 0,001$; TD 11,09%, $p < 0,01$), míg a csóvahossz értékekkel jellemezhetően az 50 μM -os kezelés után következett be (TL 17,59 μm , $p < 0,05$).

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

5. 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 ETO expozíció célsejtjeinek nem tekinthető humán fibroblasztok *in vitro* tenyésztésében, az eredmények vizuális értékelésével. 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 ETO expozíció emberben bizonyítottan főként leukémia és limfóma kialakulását idézi elő. Az emlő laphámsejtek tanulmányozásának oka az egri Markhot Ferenc Kórház nővéreinek körében megfigyelt emlőrákos esetek és az őket ért ETO 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 ETO expozícióval összefüggésben még nem írták le.

Az etilén-oxid rákkeltő tulajdonságának sejt- illetve szerv-specifitása heves viták tárgya. Az ETO expozícióval összefüggő leggyakrabban megfigyelt neopláziák a vérképző rendszeri malignómák. Epidemiológiai eredmények alapján Norman és mtsi. felvetették, hogy munkahelyi etilén-oxid expozíció hatására emlőrák alakulhat ki, az ETO expozíció és emlőrákos mortalitás közötti pozitív dózis-hatás összefüggésre Steenland és mtsi. is szolgáltattak a közelmúltban adatokat. Más vizsgálatok azonban nem támasztották alá ezt a feltételezést. Az ETO emlőrák kialakulásában játszott lehetséges szerepére utaló adatokat

Magyarországon Müller és Bertók közölt, s e feltételezést később *in vivo* genotoxikológiai és epidemiológiai vizsgálatok is alátámasztották. Eredményeink további megerősítést – bár nem közvetlen bizonyítékot – szolgáltatnak arra, hogy etilén-oxid expozíció hozzájárulhat emlőrák kialakulásához.

Nagymértékű DNS károsodás létrejöttét figyeltünk meg 20 μM etilén-oxiddal kezelt emlő laphámsejtekben, ami hasonlóan mutatkozott a limfoblasztokban és perifériás limfocitákban tapasztalt hatáshoz. A keratinociták és méhnyak laphámsejtek ETO hatással szembeni érzékenysége jelentősen kisebb volt, mivel a tail moment és csóva DNS tartalom értékeik csupán 50 μM feletti dózisoknál emelkedtek meg szignifikánsan. Ráadásul ezekben a sejtekben csak 100 μM 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 ETO kezelésnél következett be. Alkalikus elúciós technikát alkalmazva szignifikáns DNS károsodást 1 mM-os ETO expozíciónál lehetett megfigyelni humán perifériás limfocitákban és 0,5 mM-nál kínai hörcsög ovárium sejtekben. 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 ETO hozzávetőleges belső dózisát állatkísérletekből származó toxikokinetikai adatok alapján. A 8 órás, 1,8 mg/m^3 (1 ppm) légtér-koncentrációjú ETO 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 ETO koncentrációk a korábban alkalmazott magas dózisoknál pontosabban reprezentálhatják az exponált egyénekben kialakuló plazmaszinteket.

A DNS károsodás növekedése a 0–100 μM 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 sejtcsoportoknak 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 μM) az ETO 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 μM dózistartományban megfigyelt lassú növekedése csakúgy, mint a szignifikáns genotoxikus hatás kifejtéséhez keratinocitákban és méhnyak laphámsejtekben szükséges magas ETO 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 dózisos 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 ETO az emberi szervezetben mind spontán, mind enzimátikus 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 sejtjeire, 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 munkahelyi 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 egyéb génkárosító anyagok 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.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS AJÁNLÁSOK

Következtetések:

1. Az etilén-oxid 0–1000 μM 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, limfoblasztok 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 limfoblasztokhoz 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.

7. 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)