

A benzol, egy parkett lakk és egy szintetikus
hígító kromoszómavesztést okoz a *Drosophila*
szárnykezdemény sejtjeiben

PhD értekezés tézisei

Soós István

Interdiszciplináris Orvostudományok
Doktori Iskola
Preventív Medicina Program

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Biológiai Intézet

Témavezető: Prof. Dr. Szabad János

Szeged, 2013

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Tudományos dolgozat

István Soós and János Szabad, Assaying benzene, a parquet varnish, and a synthetic thinner for inducing *in vivo* chromosome loss in *Drosophila* wing primordia cells. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. Accepted for publication.

Szabad J, **Soós I**, Polgár G and Héjja G, Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal tests. Mutation Research **113**, 117-133, 1983.

Ismeretterjesztő dolgozat

Soós István és Szabad János, Kromoszómáink stabilitása. Természet Világa **143**, 386-389, 2012.

Poszter

Szabad J, Venken K, Bellen H and **Soós I**, Detection and quantitative evaluation of chromosome loss induced in *Drosophila* wing primordial cells.

12th International Conference on Preimplantation Genetic Diagnosis. Istanbul, Turkey, May 8-11, 2013. Poster P1.

Előadás

Soós István, Kromoszóma vesztés kimutatása foltos szárnyú muslicákkal. Az élhető város és vidéke szakmai szimpózium a magyar tudomány ünnepe keretében. Békéscsaba, 2012. november 22; p. 46.

Bevezetés

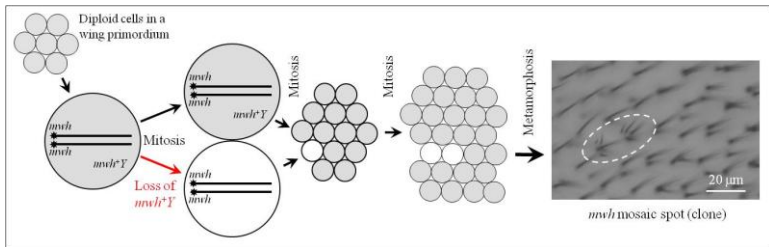
Az emberi halálokok között jelentős szerepet töltenek be a rákos daganatok, mely megbetegedések jó része a sejtek genetikai állományának hirtelen bekövetkező öröklődő változásai, a mutációk következtében alakul ki. A mutációkat okozó úgynevezett mutagén hatások között különösen jelentősek a leginkább emberi tevékenységek során környezetünkbe kerülő szennyező anyagok, melyek általános nézet szerint a daganatok 90%-át okozzák. Mivel a mutagén hatású anyagok egyben rákkeltőek is, a daganatos betegségek megelőzéséhez fontos, hogy ezeket az anyagokat ismerjük fel, és szűrjük ki környezetünkéből. A rákmegelőzéshez hasznos alapot biztosítanak a mutagének azonosítására szolgáló úgynevezett mutagén-tesztek.

A mutációk két csoportjának a pontmutációk és a kromoszómatorések, és azt követő szerkezeti változások kimutatására kidolgozott eljárások széles körben elterjedtek (Zeiger 2004). A mutációk harmadik csoportját képező, gyakran aneuploidiát eredményező kromoszómaszám változások kimutatására kidolgozott eljárások rutinszerűen nem terjedtek el. Azért nem, mert általában nem elég érzékenyek, többnyire bonyolultak, költségesek. Ugyanakkor szükség van

ilyen, a kromoszóma nyerések és/vagy veszteségek kimutatására szolgáló ún. aneuploidia-tesztekre, mivel az aneuploidia következményei között rosszindulatú daganatok kialakulása is szerepel (Pfau and Amon 2012). Szokás az aneuploiditást a rákos daganatok jelzőjének is tekinteni (Gordon et al. 2012).

Kromoszómavesztés kimutatására dolgoztak ki Szabad János és munkatársai (Szabad et al. 2012) egy új eljárást, az úgynevezett CLADS technikát (Chromosome Loss Assay in the Drosophila Soma; 1. ábra), és mutatták be működését négy ismert mutagén (Röntgen-sugárzás, kolhicin, etil-metánszulfonát és formaldehid) esetében.

A CLADS eljárás során mwh^+Y kromoszómát hordozó mwh/mwh muslica lárvák vannak kitéve kezelésnek. Ha szárnyaikon a kezelés hatására az mwh mozaik foltok gyakorisága egy kezeletlen kontroll mintához képest megemelkedik, az a kezelés kromoszómavesztést indukáló hatását jelenti. A foltok gyakorisága és mérete alapján a hatás erőssége is jellemezhető.



1. ábra: A CLADS technika elvi alapjai. Az Y kromoszómába ültetett mwh^+ transzgén megakadályozza az mwh mutáns fenotípus kifejeződését, az egyébként mwh homozigóta sejtekben. Ha a szárnykezdemény sejtek mitotikus osztódása során az mwh^+Y kromoszóma elvész, a sejtben az mwh tulajdonság megnyilvánul. Minden mwh homozigóta sejt 2-7 szörszálat növeszt a szokásos egyetlen helyett. A leánysejt utódsejtjei mwh mozaik foltot képeznek a szárnyon.

PhD munkám célkitűzése volt hogy:

- igazoljam a CLADS technika környezeti minták vizsgálatára való alkalmasságát,
- megvizsgáljam és igazoljam a CLADS technikával a benzol aneuploidiát okozó hatását,
- megvizsgáljam egy általánosan használt parkett lakk gőzeinek kromoszómavesztést okozó hatását, és
- megvizsgáljam egy széles körben használt szintetikus hígító gőzeinek kromoszómavesztést okozó hatását.

Anyag és módszer

A vizsgálatokat *Drosophila melanogaster* w/mwh^+Y ; mwh/mwh törzsének felhasználásával végeztük. (Ahol w egy recesszív marker mutációt hordozó X kromoszóma jele.) 84-92 órás lárvákat tettünk ki különböző koncentrációban ill. különböző ideig a vizsgált anyagok gőzei hatásának. A kezelés toxikusságának jellemzésére megállapítottuk, hogy a lárvák hány százaléka fejlődött imágóvá. Az imágóvá fejlődött hímek szárnyait izoláltuk, preparáltuk és mikroszkóppal 400x-os nagyítással vizsgáltuk, mwh foltokat kerestünk rajtuk. Az adatokat statisztikai módszerekkel értékeltük.

Munkánk során három anyag hatását vizsgáltuk:

1. Benzol - amely közismert mutagén, rákkeltő anyag - pozitív referenciaként szolgált.
2. A Monolakk egykomponensű parkett lakk, az Akzo Nobel coating Co. terméke.
3. Supralux H-100 szintetikus hígító, az Akzo Nobel coating Co. terméke.

A kezelendő lárvákat a „kezelés” idejére légmentesen elzárt térben tartottuk a három fenti anyag gőzében.

Eredmények

Vizsgálataink során a benzol és a parkett lakk bizonyult toxikusnak a muslica lárvákra. A benzol hatása már kis koncentrációban, illetve rövid idejű kezelés esetén is megnyilvánult. A parkett lakk toxicitása csak hosszabb ideig való kitétség esetében volt megfigyelhető (1. táblázat). A benzollal történő kezelés után az egyedek többsége a bábozódás után pusztult el.

1 táblázat. A toxicitás jellemzői

Kezelés		Túlélés (%)	
Kontroll		78.2±1.8	
Benzol (µg/ml)	0.005	77.0±1.2	
	0.016	68.1±1.6**	
	0.047	59.0±2.6**	
	0.140	26.0±2.0**	
	0.175	9.4±3.6**	
	0.175	1 óra	66.5±2.8**
		2 óra	46.7±4.7**
		4 óra	19.2±2.8**
Parkettlakk	2 óra	-	
	6 óra	78.5±2.0	
	12 óra	76.3±2.1	
	24 óra	68.0±5.3**	
Hígító (H-100)	1 óra	-	
	2 óra	-	
	4 óra	-	
	8 óra	79.0±3.9	

** szignifikánsan különbözik a kontrolltól; P<0,01; t- próba)

A benzol hatékonyan indukálta az *mwh*⁺*Y* kromoszóma vesztését. A nagyobb koncentrációban illetve hosszabb ideig tartó kezelés szignifikánsan emelte az *mwh* foltok gyakoriságát (2. táblázat).

Ez az összefüggés arra enged következtetni, hogy a benzol toxikussága éppen a kromoszómavesztést okozó hatásával kapcsolatos. E feltevést az is alátámasztja, hogy a lárvák többsége a bábozódást követően pusztult el. Ez arra is utal, hogy a benzol a mitotikusan osztódó imágókorong sejtek és neuroblasztok működését zavarja meg, a lárvális sejtekre nincs, vagy csak kicsi hatása lehet (Yan and Li 2011).

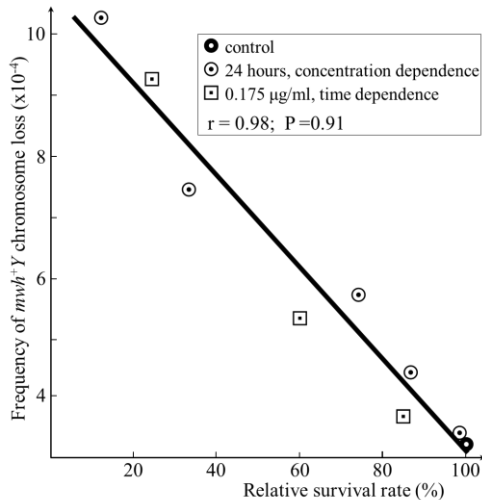
A parkett lakk esetében a 24 órás kitettségnél emelkedett szignifikáns mértékben a foltképződés gyakorisága. A szintetikus hígító gőzei már 4 és 8 órás kezelés esetén is szignifikánsan emelték az *mwh* foltok gyakoriságát.

2. táblázat. Az *mwh* mozaikosság jellemzői

Kezelés		Szárnny	Mozaik folt	A mozaik foltok gyakorisága	Az egyetlen sejtől álló foltok gyakorisága	A mozaik foltok átlagos mérete (sejt/folt)	A foltok indukciójának gyakorisága	
		<i>N</i>	<i>n</i>	<i>n/N</i>		<i>m</i>	$f = n \cdot 2m/NC$	
Control in Szabad et al., 2012		108	164	1.5	96 (0.9)	1.70±0.97	1.7x10 ⁻⁴	
Control		64	259	4.0	216 (3.4)	1.17±0.78	3.2x10 ⁻⁴	
Benzene (µg/ml)	24 hours	0.005	40	188	4.7	163 (4.1)	1.14±0.74	3.6x10 ⁻⁴
		0.016	30	173	5.8	147 (4.9)	1.14±0.71	4.4x10 ⁻⁴
		0.047	30	218	7.3*	179 (5.9*)	1.18±0.79	5.7x10 ⁻⁴
		0.140	12	107	8.9*	84 (7.0*)	1.24±0.85	7.4x10 ⁻⁴
		0.175	18	227	12.6**	180 (10.0**)	1.22±0.81	10.3x10 ⁻⁴
	0.175	1 hour	38	176	4.6	145 (3.8)	1.18±0.76	3.6x10 ⁻⁴
2 hours		12	80	6.7	65 (5.4)	1.20±0.79	5.3x10 ⁻⁴	
4 hours		20	236	11.8**	195 (9.8**)	1.17±0.76	9.2x10 ⁻⁴	
Parquet varnish (Supralux)	2 hours	36	189	5.3	166 (4.6)	1.13±0.74	4.0x10 ⁻⁴	
	6 hours	40	188	4.7	160 (4.0)	1.14±0.72	3.9x10 ⁻⁴	
	12 hours	38	226	5.9	193 (5.1)	1.15±0.75	4.6x10 ⁻⁴	
	24 hours	28	216	7.7*	176 (6.3*)	1.22±0.81	6.3x10 ⁻⁴	
Thinner (H-100)	1 hour	38	180	4.7	157 (4.1)	1.15±0.80	3.6x10 ⁻⁴	
	2 hours	40	202	5.1	177 (4.4)	1.15±0.79	3.9x10 ⁻⁴	
	4 hours	44	310	7.0*	248 (5.6*)	1.19±0.76	5.9x10 ⁻⁴	
	8 hours	12	107	8.9*	87 (7.3*)	1.19±0.78	7.1x10 ⁻⁴	

* és **, szignifikánsan különbözik a kontrolltól, P<0,05 és P<0,01 (χ^2 próba)

A benzol toxicitása és kromoszómavesztést okozó hatása közt lineáris összefüggés tapasztalható (2. ábra).



2.ábra: A benzol toxicitása (a lárvák túlélési %-ában ábrázolva) és a *Drosophila* szárnykezdemény sejtekben kromoszómavesztést indukáló hatása közötti összefüggés.

Mind a kontroll esetében, mind a kezelések során a vártnál lényegesen több egysejtes *mwh* folt alakult ki. Ezeknek a foltoknak a létrejötte a légmentes környezettel lehet kapcsolatos. Már egy-két órás légmentes környezetben tartás is növelte az egy sejtés foltok

előfordulásának gyakoriságát. Kérdés, hogy a csökkenő O_2 és/vagy növekvő CO_2 koncentráció mellett az mwh^+ transzgen csökkent kifejeződése, vagy az mwh^+Y kromoszóma elvesztése eredményezte az egysejtes foltok gyakoriságának növekedését. Valószínűleg az átalakuláshoz közeledve a sejtek könnyebben elveszítik kromoszómáikat, de a kromoszómák elvesztése ellenére a géntermékek perduranciája következtében a már nem osztódó aneuploid sejtek megőrzik életműködéseiket (Garcia-Bellido and Merriam 1971). Azt, hogy a kifejlett szárnykezdemény sejtjei kevésbé érzékenyek a kromoszómavesztésre az a megfigyelés is alátámasztja, hogy a 2 vagy több sejtből álló mwh foltok gyakorisága nem különbözött a (i) korábbi és a jelen kontroll esetében, valamint (ii) a kontroll és a foltgyakoriságot szignifikánsan nem emelő kezelések esetében.

Azok a kezelések melyek szignifikánsan emelték a foltgyakoriságot, egyaránt emelték azt az egy és többsejtes foltok esetében is. Az egysejtes mwh foltok mind a légmentes környezet, mind a benzol, a parkett lakk illetve a hígító gőzeinek hatására képződhetnek.

Habár a parkett lakk és a hígító gőzeinek hatása aránylag gyenge volt, bebizonyosodott, hogy kromoszómavesztés indukálására képesek. Minden valószínűség szerint nemcsak a *Drosophila* szárnykezdemény sejtjeiben, hanem más sejtfeleségekben is okozhatnak aneuploidiát. Mindezek alapján meglepő, hogy a termékek használati utasításában nem szerepel, hogy szabad levegőn illetve megfelelő védőmaszk alkalmazásával kell velük dolgozni

Összegzés

A vizsgálataink során bebizonyosodott, hogy az általunk használt CLADS eljárás a korábban kidolgozott aneuploidia-tesztek sok hátrányát legyőzi, és alkalmas környezetből vett minták kromoszómavesztést okozó hatását kimutatni.

A környezeti minta vizsgálata során a célsejtek száma 5-6000 is lehet egy szárnykezdeményben. A kezelés után, a szárny kifejlődéséig további három sejtosztódás történik, amikor is mozaik foltok képződhetnek

Az *mwh* marker mutáció lehetővé teszi a 30 000 szárnysejt között egyetlen sejtből álló folt észlelését is.

A CLADS eljárás alkalmas a kromoszómavesztést okozó hatás erősségének a jellemzésére is.

A teszt hiányossága, hogy a kromoszóma számbeli változások közül csak a kromoszómavesztés kimutatására alkalmas, a kromozómanyerés kimutatására nem.

Irodalom

García-Bellido A, Merriam JR, Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, **24**: 61-87, 1971.

Gordon DJ, Resio B, Pellman D, Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet.* **13**, 189-203, 2012.

Pfau SJ, Amon A, Chromosomal instability and aneuploidy in cancer: from yeast to man. *EMBO Reports* **13**.,515-527, 2012.

Szabad J, Bellen HJ, Venken KJT, An assay to detect in vivo Y chromosome loss in *Drosophila* wing disc cells. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **2**, 1095-1102, 2012.

Yan SJ, Li WX, Using *Drosophila* larval imaginal discs to study low dose radiation-induced cell cycle arrest. *Methods Mol. Biol.* **782**, 93-103, 2011.

Zeiger E, History and rationale of genetic toxicity testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environ. Mol. Mutagen.* **44**, 363-371, 2004.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Szabad Jánosnak a Ph.D munkámhoz nyújtott szakmai útmutatásáért, segítőkész munkájáért.. Köszönöm Kissné Ani technikai munkáját. Hálás vagyok családomnak türelmükért és támogatásukért. A program a Szabad János által nyert OTKA pályázat (NI69180) keretében valósult meg.