

TOXICITY AND GENOTOXICITY OF HALOGENATED ALIPHATIC HYDROCARBONS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

TOXICITA A GENOTOXICITA HALOGENOVANÝCH ALIFATICKÝCH UHLOVODÍKŮ U *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Pavlu J., Chroust K.

Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika.

E-mail: pavlu@node.mendelu.cz, chroust@sci.muni.cz

ABSTRACT

Halogenated aliphatic hydrocarbons represent important industrial chemicals playing a great role as environmental pollutants. Hazard identification of this compound is fundamental to human health protection and environment protection.

Two halogenated aliphatic hydrocarbons, 1,2-dichloroethane and 1-iodopropane, were evaluated for toxic and genotoxic effects using the wing spot test, the variant of somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. N-methyl-N-nitrosourea served as the positive control and distilled water as the negative control.

Tested compounds expressed toxic effect at larval stages of *D. melanogaster*. Comparing values LC50 (50% lethal concentrations), 1-iodopropane was more toxic than 1,2-dichloroethane.

For genotoxicity evaluation of tested compounds was used the wing spot test, which allow to assess induced genetic change via formation of mosaic spots on the wings of trans-heterozygote flies carrying genetic markers *mwh* and *flr3*. 1-iodopropane did not show any genotoxicity at 50% lethal concentration and gave positive results only at a higher concentration. 1,2-dichloroethane was relatively high genotoxic at 50% lethal concentration and induced some twin spots, which were produced by mitotic recombination exclusively. MNU induced high number various spots, which documented its strong mutagenic and recombinogenic activity.

Additional, the stability of transgene *lacZ* in strain P-1152 was analysed after induction gametic mutations in treatment with 1,2-dichloroethane. It was employed SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) in assessment of transgene stability in offspring of exposed individuals at the molecular level. Any mutations weren't detected in the transgene.

Key words: genotoxicity testing, SMART, wing spot test, *Drosophila melanogaster*, halogenated aliphatic hydrocarbons

ÚVOD

Halogenované alifatické uhlovodíky reprezentují jednu z nejdůležitějších skupin průmyslových chemikálií a patří mezi nebezpečné kontaminanty životního prostředí. Identifikace rizika těchto látek je důležitá z hlediska ochrany zdraví člověka a ochrany životního prostředí.

MATERIÁL A METODIKA

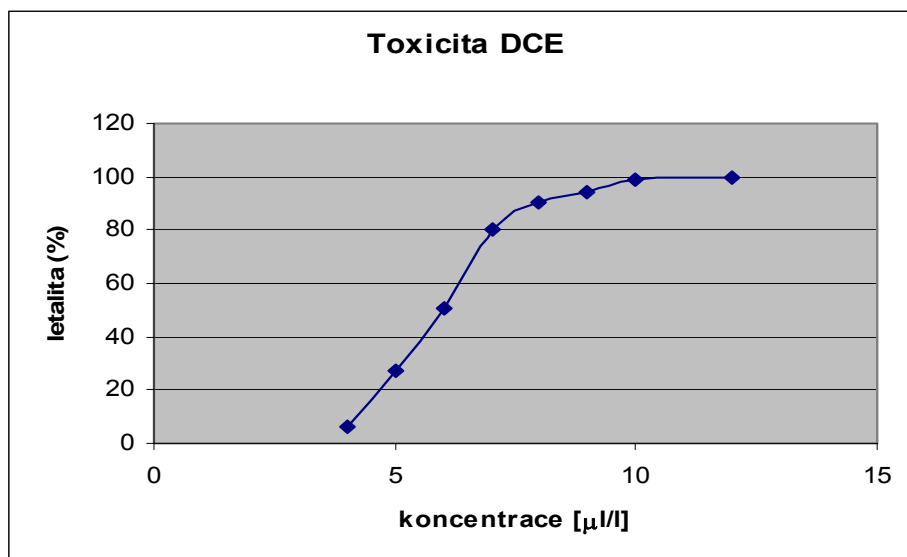
Testované chemické látky: 1,2-dichloroethan, 1-iodopropan, N-methyl-N-nitrosomočovina (MNU) jako pozitivní kontrola,

Ke sledování genotoxicity testovaných látek byl použit wing spot test, varianta testu na somatické mutace a rekombinace (SMART) u *Drosophila melanogaster*. K expozici larev 3. instaru (stáří 72 hodin) docházelo potravní (MNU) nebo inhalační cestou (u halogenovaných alifatických uhlovodíků), doba expozice byla 48 hodin. Genotoxické účinky testovaných látek byly hodnoceny při letální koncentraci LC50, při které uhynulo 50% exponovaných jedinců, a dále i při koncentracích vyšších. Genetické změny standardních alel markerových genů, které byly indukované v buňkách imaginálních disků larvy transheterozygotní pro mutace *mwh* a *flr3*, se projevily jako skvrny na křídlech dospělého. Zvýšení četnosti skvrn oproti negativní kontrole (destilovaná voda) pak odpovídalo genotoxické aktivitě testovaných látek.

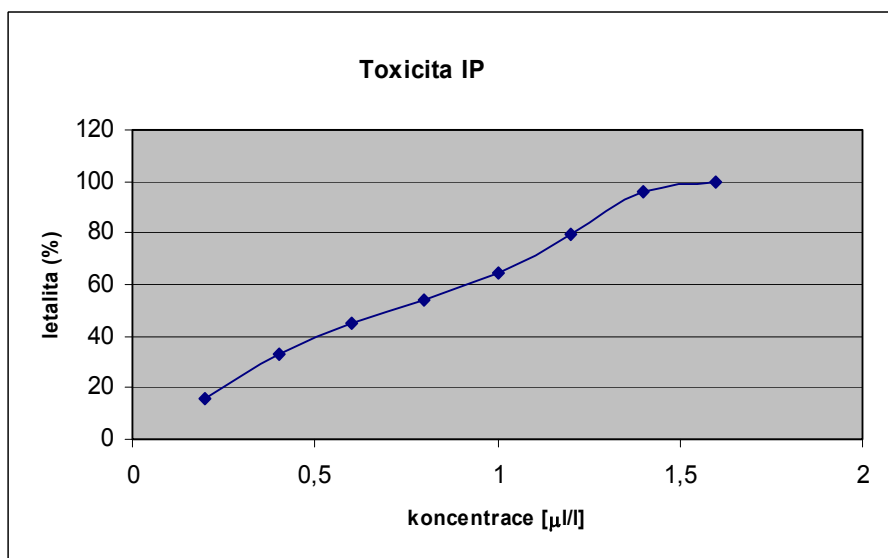
U kmene *D. melanogaster P-1152* byla na molekulární úrovni sledována stabilita transgenu *lacZ*. Gametické mutace byly u larev 2. instaru (stáří 48 hodin) indukovány 1,2-dichloroethanem (koncentrace 6 $\mu\text{l/l}$, expozice 48 hodin) a detekovány u jedinců následující generace. Mutace v analyzovaných úsecích transgenu byly po amplifikaci PCR detekovány pomocí konformačního polymorfismu jednořetězců (SSCP, Single Strand Conformational Polymorphism).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Testované látky vykazaly toxické účinky na larvální stádium *D. melanogaster*. Dle LC50 (koncentrace látky způsobující úhyn 50% jedinců) byl 1-iodopropan s LC50 = 0,8 $\mu\text{l/l}$ řádově toxičtější než 1,2-dichloroethan s LC50 = 6 $\mu\text{l/l}$. Relativní toxicita těchto sloučenin odpovídala základním pravidlům vyvozeným z analýz QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) halogenovaných alifatických uhlovodíků, podle kterých lze podle struktury orientačně predikovat toxické účinky těchto sloučenin.



Graf 1 Křivka toxicity 1,2-dichloroethanu



Graf 2 Křivka toxicity 1-iodopropanu

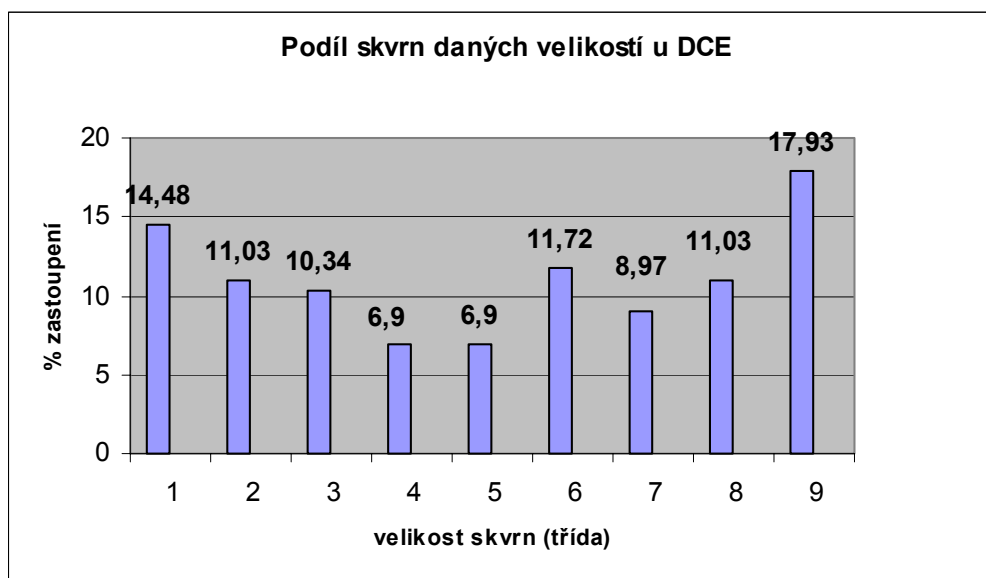
1-iodopropan nebyl při koncentraci LC_{50} genotoxický, genotoxické účinky vykázal až při koncentraci vyšší. 1,2-dichloroethan byl při koncentraci LC_{50} relativně vysoce genotoxický a indukoval i dvojitě skvrny vznikající výlučně mitotickými rekombinacemi. MNU indukovala vysoký počet skvrn všech typů, čímž prokázala svoji vysokou mutagení a rekombinogení aktivitu a byla tak potvrzena účinnost použitého testu SMART.

Tab. 1 Genotoxicita testovaných chemických látek

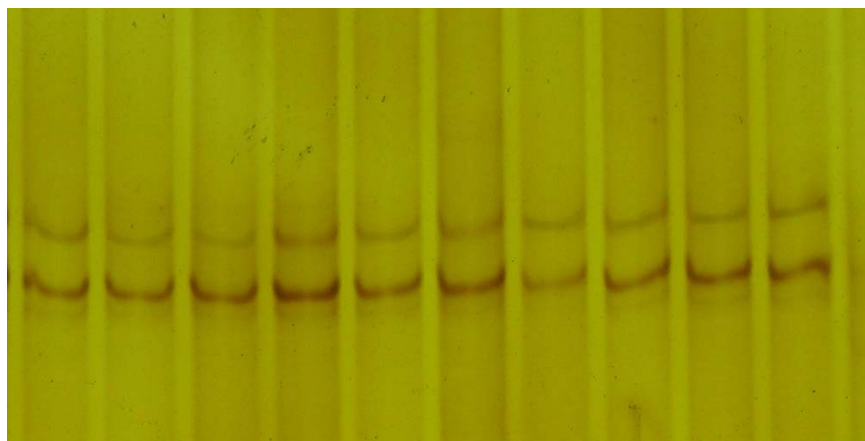
	Negativní kontrola (voda)	MNU	1-iodopropan		1,2-dichloroethan	
Koncentrace	-	LC ₅₀	0,8 µl/l	1 µl/l	6 µl/l	9 µl/l
Počet malých skvrn na křídlo (1-2 buňky)	0,21	7,29	0,22	0,39	0,58	0,60
Počet velkých skvrn na křídlo (3 a více buněk)	0,15	8,28	0,11	0,23	1,66	1,69
Počet dvojitých skvrn na křídlo	0,00	0,45	0,00	0,00	0,03	0,04
Celková četnost skvrn na křídlo	0,35	16,02	0,33	0,57	2,26	2,33
Počet hodnocených křídel	69	65	54	49	64	52
Genotoxicita*		+	-	+	+	+

*Statistická významnost $P < 0,05$ hodnocená proti negativní kontrole

Velikost skvrn odráží počet buněčných dělení, které nastaly po indukci genetických změn v buňkách imaginálního disku křídla, podle velikosti skvrn (tedy počtu dělení mutanční buňky) lze odhadnout dobu nástupu genetických změn v průběhu vývoje křídla. Nástup genetických změn byl po expozici 1,2-dichloroethanem velmi časný.



Stabilita transgenu *lacZ* u kmene *P-1152* byla sledována po indukci gametických mutací 1,2-dichloroethanem, u kterého lze vzhledem k jeho schopnosti časné indukce somatických genetických změn očekávat získání vysoké proporce mutantních gamet. Metodou konformačního polymorfizmu jednořetězců nebyla u žádného z celkem 207 analyzovaných fragmentů transgenu detekována mutace. S ohledem na nízký počet analyzovaných vzorků a vzácnost mutačních změn však nelze konstatovat, že transgen *lacZ* je u *D. melanogaster* kmene *P-1152* stabilní.



Obr. 1 Negativní výsledek SSCP analýzy

ZÁVĚR

Testované halogenované alifatické uhlovodíky vykazaly u *D. melanogaster* toxické účinky, výrazně genotoxický však byl pouze 1,2-dichloroethan, zatímco 1-iodopropan indukoval genetické změny pouze při vysokých koncentracích.

U *D. melanogaster* kmene *P-1152* nebyla v transgenu *lacZ* detekována žádná mutace.

LITERATURA

Frei H. J., Würigler F. E. (1988): Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive results. *Mut. Res.*, 203:297-308.

Graf U., Würigler F. W., Katz A. J., Frei H. J., Juon H., Hall C. B., Kale P. G. (1984): Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.*, 6:153-188.

Jowett T. (1991): Transgenic *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for studying of mammalian drug metabolism. *BioEssays*, 13:683-689.

Nollau P., C. Wagener C. (1997): Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clinical Chemistry*, 43:1114-1128.