

Magyar Honvédség – Honvédkórház
Tudományos Intézet¹

Országos Frédéric Joliot-Curie Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet²

Malathion hatása humán placenta modellsejtekre I. Cito- és genotoxicitás vizsgálata

Dr. Somosy Zoltán¹,
Dr. Galántai Rita Tünde Ph.D.¹,
Dr. Bognár Gabriella²,
Emődy-Kiss Blanka¹,
Dr. Horváth Győző¹ ny. orvosalezredes,
Dr. Gachályi András¹ ny. mérnök-ezredes

Kulcsszavak: placenta sejttes modellje, humán choriocarcinoma sejtvonal (JAR), organofoszfátok, malathion, citotoxicitás, genotoxicitás, apoptózis, micronukleusz

Az organofoszfát típusú vegyületek csoportjába tartoznak különböző peszticidek (pl. malathion) és a vegyi fegyvernek kifejlesztett rendkívül toxikus idegmérgek (szarin, szomán, tabun, VX) is. Az utóbbi időben felmerült, hogy az organofoszfátok a kolinészteráz enzim gátlásán alapuló (kolinerg) idegrendszeri hatásokon kívül más hatásmechanizmusú (nem-kolinerg) változásokat is okozhatnak, amelyek többek között érinthetik a reprodukatív szerveket és ezáltal, terhesség esetén a magzatot is. Jelen vizsgálatunkban a malathion cito- és genotoxikus hatásait tanulmányoztunk emberi placenta sejtek *in vitro* modelljének tekinthető choriocarcinoma sejtvonalon (JAR HTB 144). A kísérleti eredmények alapján megállapítottuk, hogy a malathion már viszonylag alacsony koncentrációkban cito- és genotoxikus, azaz a sejtek apoptotikus és nekrotikus pusztulását, illetve mikronukleuszok kialakulását (DNS károsodást) okozza. Kimutattuk, hogy a kezelés hatására megjelenő elváltozások bystander (szomszéd-sági) hatást mutatnak. Eredményeink alátámasztják a vegyületcsoport reprodukív toxicitására utaló adatokat.

Rövidítések:

OP	organofoszfát
MTT teszt	sejtek életképességének 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromiddal történő vizsgálata
FCS	borjú szérum (fetal bovine serum)
AO	acridine orange fluoreszcens festék
EB	ethidium-bromid fluoreszcens festék
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-nál kifejlesztett sejtenyészítő tápoldat
L-NAME	N-omega-nitro-L-arginin metilészter

Az organofoszfátokban (OP) egy központi foszfát (vagy foszfin) csoporthoz szerves oldalláncok kapcsolódnak. Az első OP-t 1854-ben szintetizálták. A II. világháború alatt már ipari méretekben történt az OP-k előállítás, először mezőgazdasági célból, rovarirtószerként, majd később az idegmérgekként ismertté vált vegyi fegyverek kifejlesztésére is sor került (szarin, szomán, tabun, VX) [1]. Napjainkban világszerte hatalmas mennyiségben használnak OP vegyületeket növényvédőszerként, illetve szúnyogirtásra (pl. malathion, parathion, DDVP) [2]. Bár az OP-k vegyi fegyverként való felhasználását nemzetközi egyezmények tiltják, hadászati vagy terrortámadás során való alkalmazásuk lehetősége mégis folyamatos veszélyt jelent mind a honvédség állományára, mind a civil lakosságra.

Az OP-k szerves oldalláncai a központi foszfor atom elektrofilicitásán, a molekula sztérikus tulajdonságán és lipidoldékonyságán keresztül nagymértékben befolyásolják a vegyület biológiai hatásosságát. Az OP-k egyrészt kolinészteráz gátló, ún. kolinerg hatással rendelkeznek. Ezen alapul az OP vegyi fegyverek működése és az OP rovarirtószer rovarölő hatása is [1, 2]. Vizsgálati adatok szerint az OP expozíciónak azonban nem csak kolinerg hatásai lehetnek, hanem felléphetnek különböző citotoxikus (membránkárosodás, sejthalál) és/vagy genotoxikus hatások (DNS károsodás, kromoszóma aberráció) is. Az egyik széles körben alkalmazott növényvédőszer, a malathion esetében nem-kolinerg hatást *in vitro* vizsgálatokban többféle sejttípuson megfigyeltek és *in vivo* rendszerekben is tapasztaltak [3-17]. Ezek a hatások már olyan alacsony dózisu expozícióknál megjelennek, ahol kolinerg hatással még nem kell számolni [18]. A nem-kolinerg hatások szabadgyök mechanizmusúak [3, 4, 18-20]. A

sejtszintű toxikus hatások szervi szinten is manifesztálódhatnak. Ezzel magyarázhatóak többek között az OP-k neurotoxikus [21], hepatotoxikus [22, 23], kardiotoxikus [24], immunotoxikus [25, 26] hatásai.

Az előbb felsoroltak mellett számos jel mutat arra, hogy az OP-k a reprodukív rendszer különböző elemeire is toxikus hatásúak. Így az OP expozícióval terhelt területeken emelkedett számban figyeltek meg infertilitást, születési rendellenességeket, terhességi komplikációkat, magzati mortalitást, a hormonális egyensúly megbomlását [27-37]. *Levario-Carrillo* [38] az intrauterin növekedési retardáció (IUGR) és a pre-eclampsia gyakoribb előfordulását tapasztalta az OP-vel kezelt régiókban. Mivel a placenta kóros működése ok és okozatként is összefügghet az említett terhességi komplikációkkal, feltételezhető, hogy a környezeti OP terhelésnek kitett terheseknél a magzati károsodások egyik oka a placenta károsodása lehet [39-41]. Ugyanakkor, ebben a kérdéskörben részletes vizsgálatokat eddig nem folytattak.

A jelen tanulmányban ezt a kérdést vetjük górcső alá. Kísérleteinkben humán choriocarcinoma (JAR) sejtvonalat vizsgáltunk, amely a placenta sejtek elfogadott modellje. Organofoszfátként malathiont használva a cito- és genotoxikus hatásokat tanulmányoztuk. A sejtek változásait fluoreszcens mikroszkópos technikával követtük. Az alkalmazott ethidiumbromide-acridine orange festési technika segítségével jól elkülöníthetők a korai és késői apoptózis és a nekrotikus sejtek [42, 43]. Áramlási citometriával, illetve MTT redukációs teszttel nyomon követtük a sejtek pusztulását, illetve életképességének malathion hatására történő változását. A vizsgált peszticid DNS-re kifejtett toxicitását pedig a kezelés hatására kialakuló mikronukleuszok gya-

koriság változásának meghatározásával tanulmányoztuk. Ez utóbbi vizsgálatoknál a szabadyók hatásmechanizmus igazolására is végeztünk kísérleteket.

Anyagok és módszerek

A malathiont és az MTT oldatot a Sigma-Aldrich-től vásároltuk, a dimetil-szulfoxidot (DMSO – gázkromatográfiához kat.sz.: 1.09678.0100) pedig a Merck-től szereztük be. A malathion törzsoldatát (200 mg/ml) DMSO-ban készítettük el, és $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az RPMI-1640 tápoldat, az antibiotikumok (penicillin és streptomycin), továbbá a borjú sérum (fetal bovine serum, FCS) a GIBCO termékei voltak. Az acridine orange (AO) és ethidiumbromide (EB) fluoreszcens festékeket a Chroma Gesellschaft Schmid Co., illetve a Sigma-Aldrich-től vásároltuk.

A JAR sejtek malathionnal történő kezelése. A JAR choriocarcinoma sejt vonalat [44] az LGC Promochem-től szereztük be. A sejteket (100 IU/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin) antibiotikumot és 10 % FCS-t is tartalmazó RPMI-1640 tápoldatban tenyésztettük standard steril inkubátorban 37°C -on, 5 % széndioxidot tartalmazó atmoszférában. A mikroszkópos mérésekhez és az életképesség vizsgálatához a sejteket 24, illetve 96 lyukú tenyésztő edényekbe (FALCON) osztottuk szét, a mikronukleusz gyakoriság mennyiségi meghatározásához pedig a Petri-csészét használtunk. (Az előbbi felsorolás sorrendjében a sejtuszuspenzió térfogata 1 ml, 0,2 ml, és 8 ml sejtuszuspenzió/lyuk, illetve flaska volt.) A mikroszkópos vizsgálatához a sejteket a malathion hozzáadását megelőzően 24 órán keresztül 12 mm átmérőjű üveglapokon (Thermo Scientific Menzel-Gläser, Germany) tenyésztettük. A malathion kezelést 10, 25, 50, 100, 200

és 400 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációknál 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 és 24 órán át végeztük. (A megfelelő térfogatú malathion törzsoldatot a tenyésztő médiumhoz mértük hozzá.) Egy másik kísérleti sorozatban az előbb említett malathion koncentrációkkal 1 órán át végeztünk kezelést, majd a malathion tartalmazó tápoldatot malathion mentesre cseréltük le, és a sejtek inkubációját 1, 2, 4, 6, 8 és 24 órán át tovább folytattuk.

A malathion citotoxicitását fluoreszcens mikroszkópos technikával, MTT életképesség vizsgálattal és sejtszám-változás áramlási citometriával történő meghatározásával tanulmányoztuk. A genotoxicitás vizsgálata mikronukleusz test segítségével történt.

1. *A sejtpusztulás tanulmányozása acridine orange-ethidiumbromid fluoreszcens festéssel* [45]. A malathion kezelést követően az üveglapocskákat a rájuk kitapadt sejtekkel együtt eltávolítottuk a tenyésztő edény lyukaiból, és 200 μl festék-keverékkel (desztillált vízben oldott AO (3 $\mu\text{g/ml}$) és EB (10 $\mu\text{g/ml}$)) inkubáltuk 5 percig. Ezt követően a festéket foszfát pufferrel (PBS 1x pH 7,2) mostuk le és a sejteket azonnal Zeiss Axioplan fluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk 250-szeres nagyítással. A fényképeket Konica Minolta Dimage A200 digitális fényképezőgéppel készítettük.

Az AO festéket az életképes és nem-életképes sejtek is felveszik. Ultraibolya fénnel történő megvilágítás hatására a kettősszálú DNS-hez kapcsolódott festék zölden fluoreszkál, egyszálú nukleinsavhoz (RNS) kötődve pedig vörös fényt bocsát ki. Az EB-t csak az életképtelen, a membránjuk féligáteresztő képességét elveszített sejtek veszik fel. A felvett és a DNS-hez kötődött EB molekulák emissziója a vörös tartományba esik. Ennél a festési eljárásnál a különböző fluoreszcencia emisszió alapján

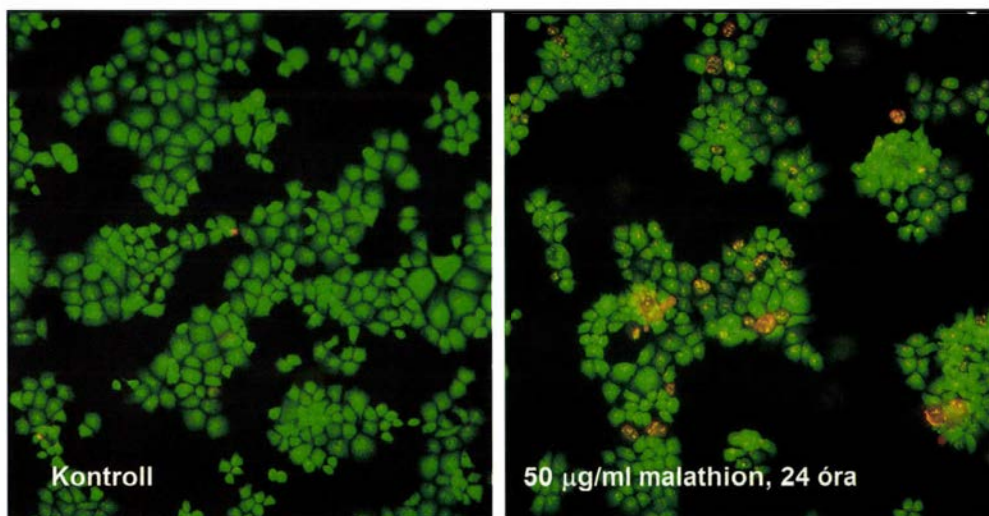
négyféle sejttállapotot különböztethetünk meg: (1) Élő sejtek, amelyek sejtmagja fényes zöld és szervezett struktúrával rendelkezik. (2) A korai apoptotikus sejteket a kompakt, zöld sejtmag és a perinukleáris kromatin kondenzáció jellemzi. (3) A késői apoptotikus sejtek esetében a sejtmag narancssárgás vagy vöröses, kondenzált vagy fragmentált kromatinnal. (4) A nekrotikus sejtek szervezett struktúrával rendelkeznek és narancssárgától vöröses színűre festődhetnek [46].

2. *Életképesség vizsgálata MTT teszttel* [46]. Ez a kolorimetriás módszer a tetrazolium só (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT)) kék formazán kristállyá történő átalakulásán alapul. A reakciót az élő sejtek ép mitokondriumában található dehidrogenáz enzim katalizálja. A formazán detektálása spektrofotometriai úton történik. Az MTT tesztet 96 lyukú tenyésztőedényben végeztük ($\sim 1,5 \times 10^4$ sejt/lyuk). Miután a sejteket 0,2 mg/ml koncentrációjú MTT oldattal 2 órán át inkubáltuk (37°C , 5 % CO_2), a kialakult formazán kristályokat 150 μl savas (6 μl cc. HCl/ml) izopropanolban oldottuk fel. Ezután Anthos/Dialab 2010 microplate reader (Anthos Labtec Instruments GmbH, Ausztria) segítségével 570 nm-en megmértük a sejtuszpenziók optikai denzitását (referenciaként a 620 nm-es mért érték szolgált). Az eredményeket %-ban fejeztük ki. 100 %-nak a kontroll (a malathionnal nem kezelt sejtek) esetében kapott formazán oldat optikai denzitását vettük.

3. *Áramlási citometriás vizsgálatok*. A sejteket megfelelő ideig kisméretű Petri-csészében tenyésztettük (35/10 mm) és kezeltük malathionnal (37°C , 5 % CO_2 ; Forma-Scientific Water-Jacketed Incubator 3250). A malathion eltávolítását követően a sejteket 1 ml 4°C -os tápoldattal mostuk, majd

6 percen át 800 μl tripszinnel emésztettük. Ezután 900 μl PBS-EDTA (PBS 1x, 2 mmol/l-es etilén-diamin-tetraecetsav, pH 7,2) és mechanikus mozgatás segítségével a sejteket centrifugacsőbe vittük át, majd további 10 ml PBS-EDTA hozzáadása után 8 percen át 250 g-vel centrifugáltuk. A cső alján összegyűlt sejtekről a PBS-EDTA-t leöntöttük, majd a sejteket újra mostuk és centrifugáltuk. A második centrifugálás után a PBS-EDTA-t *Pasteur* pipettával teljesen eltávolítottuk, és 400 μl PBS-EDTA-t mérünk a sejtekhez. Az így kapott mintákon áramlási citométerrel (BD FACSCalibur) megmértük a 20 s alatti eseményszámokat. A kiértékelés CellQuest Pro programmal történt.

4. *Mikronukleusz teszt* [47, 48]. A mikronuleusz teszt során a sejtek osztódását – megfelelő koncentrációjú malathionnal – megfelelő kezelést követően – cytochalasin-B-vel az interfázisban leállítottuk, így két-magvú sejteket kaptunk. Annak eldöntésére, hogy a mikronukleuszok sejt kultúrában való megjelenése egyenletes vagy csoportos eloszlást mutat-e, *in situ* vizsgálatot végeztük. Ezeknél a méréseknél a sejteket 12 mm átmérőjű üveglapon tenyésztettük. A malathion kezelést követően a sejteket foszfát pufferral (PBS 1x,) mostuk, majd 3 x 10 percig rögzítettük vízmentes (100 %-os) metanolban. Ezt követően a sejteket 0,003 % (w/v) acridine orange festékkoldattal 5 percig festettük [49], a preparátumokat a PBS-es mosás után levegőn szárítottuk. Ennél az eljárásnál a mikronukleuszok színes keretek testecskékként látszanak a citoplazmában, és jól elkülöníthetőek a sejtmagtól. A mikronukleuszok számszerű elemzését sejtuszpenzióban végeztük. Ilyenkor a sejtek tenyésztése *Petri*-csészében történt. A malathion kezelést követően a sejteket mechanikusan távolítottuk el a tartóedényből, majd az így kapott sejtuszpenziót centri-



1. ábra: *Acridineorange ethidiumbromidos festés eredménye kontroll és 50 µg/ml malathionnal 24 órán át kezelt sejteknél*

fugálás után az előbb leírt módon festettük. A mikronukleusz gyakoriság meghatározásánál csak a két-magvú sejteket vettük figyelembe, és minden koncentráció-, illetve időpontnál legalább 1000 két-magvú sejtet vizsgáltunk meg. Az eredményt ezrelékben fejeztük ki (%).

Kataláz és nitrogénoxid szintáz inhibitor hatása a mikronukleuszok mennyiségére. 50 µg/ml malathionnal történő kezelést követően a nitrogénoxidokból képződő szabad gyökök mennyiségének befolyásolása céljából 5,0 µmol/l N-omega-nitro-L-arginin metil észtert (L-NAME) adtunk a mintához, a hidrogénperoxid bontására pedig 5 000 U/ml marha májból származó katalázt használtunk. Az alkalmazott koncentrációkat a témával kapcsolatos közlemények alapján határoztuk meg [50, 51].

Eredmények

A malathion citotoxicitása. A malathion hatására bekövetkező, különböző típusú sejtpusztulás folyamatában lévő sejtek továbbá

az élő sejtek megjelenítése AO-EB festés segítségével történt.

Kísérleteink során a sejtenyészetet 10, 30 perc, 1, 4, 6, 8, 24 és 48 órán keresztül 10, 25, 50, 100, 200 és 400 µg/ml koncentrációjú malathionnal kezeltük. A kezeletlen sejtek esetében (1. ábra, bal oldal) az élő sejtekre jellemző fluoreszcencia figyelhető meg, csak elszórtan láthatók korai- vagy késői apoptotikus sejtek, melyeket kondenzált kromatin és fragmentált sejtmag jellemez. A malathionnal történt kezeléseknél, a 25 - 400 µg/ml koncentráció tartományban 4 óra elteltével kismértében nőtt a korai apoptotikus sejtek száma. 6-8 órás kezelést követően viszont már jelentősen emelkedett azoknak a sejteknek a száma, amelyeknél az apoptózis folyamatára jellemző morfológiai változások voltak megfigyelhetők, valamint már nekrotikus sejtek is megjelentek. Megfigyelésünk szerint a malathion apoptózist kiváltó hatása a kezelési koncentráció növelésével egy ideig nőtt, majd a magas koncentrációknál (100, 200 és 400 µg/ml) már nem változott. Nekrózis

esetében ilyen összefüggést nem tapasztaltunk, s az így elpusztult sejtek mennyisége becslésünk szerint a kezelési koncentrációk növekedésével párhuzamosan emelkedett.

Eredményeinkkel kapcsolatban fontos megjegyezni, hogy a malathion már olyan alacsony koncentrációknál (25, 50 $\mu\text{g/ml}$) is apoptózist indukált, ahol kolinerg hatással még nem kell számolni.

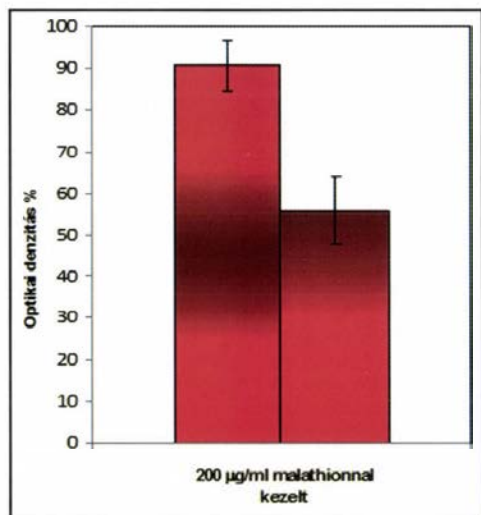
Wang és mtsai (2010) AO festést követően, *in situ* végzett kvalitatív vizsgálatokat is leírtak. Az előzetes mikroszkópos vizsgálataink szerint esetünkben a kezelések során a pusztuló sejtek nagy számban válnak le az aljzatról, s kerülnek a tápoldatba, amely jelenség a mennyiségi vizsgálatok eredményeit bizonytalanná teszi. Ezért a sejtek életképességének változását, amely összefügg a sejtpusztulás mértékével, MTT redukciós teszttel határoztuk meg, ahol a mérés sejtuszpenzióban történik, így az eredményre nincsen hatással a kezelés következtében kialakuló sejt-aljat kapcsolat változása. Az életképesség vizsgálatokat az AO-EB festési technikánál megadott malathion koncentrációknál és inkubálási időknél végeztük el. Az 2.A ábra a 24 órás inkubálás eredményét mutatja 50, illetve 200 $\mu\text{g/ml}$ malathion koncentrációnál. Látható, hogy az életképes sejtek aránya malathion kezelés hatására csökken. Érdeemes megemlíteni, hogy az életképes sejtek aránya nagyobb malathion koncentrációnál nagyobb mértékben csökkent. Ezt a tendenciát lehetett megfigyelni abban a kísérletsorozatban is, ahol 1 órás malathion kezelés után malathion-mentes tápoldatban folytattuk a sejtek inkubálását. Ebben az esetben azonban az életképes sejtek száma kisebb mértékben csökkent.

Tekintettel arra, hogy az MTT tesztnél minden mérési pontnál a kontrollra ka-

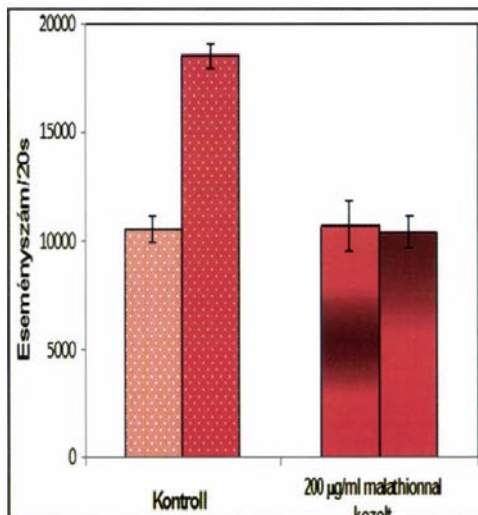
pott értéket tekintjük 100 százaléknak, ez a mérés nem szolgáltat információt az életképes sejtek abszolút számának változására. Az életképesség csökkenését okozhatja a sejtpusztulás miatti sejtszám csökkenés, de előidézheti a sejtek osztódásának, a sejtek proliferációjának malathion kezelésektől előidézett gátlása is. Ezért a sejtszám változásának tanulmányozására áramlási citometriás vizsgálatokat is végeztünk. A 24 órás, 200 $\mu\text{g/ml}$ malathion koncentrációnál kapott kezelés eredményét a 2.B ábrán mutatjuk be. Amint látható, a kezeletlen sejtek száma közel duplájára nőtt, míg a malathionnal kezelt sejtek száma változatlan maradt. Ezek alapján megállapítható, hogy a malathion a JAR sejtek szaporodását gátolja.

A *malathion genotoxicitása*. A mikronukleusz gyakoriság meghatározásakor a fluoreszcens mikroszkópos mennyiségi vizsgálatnál előbbiekben említett technikai akadállyal szembesültünk, ezért *in situ* csak a vizuális megfigyelésre került sor, a kvantitatív elemzéseket pedig sejtuszpenzióban, izolált sejteken végeztük el. Eredményeink azt mutatták, hogy a malathion kezelés 50 $\mu\text{g/ml}$ alatti koncentrációknál nem okoz szignifikáns mikronukleusz gyakoriság növekedést. 50 $\mu\text{g/ml}$ -nél, illetve e fölött viszont már a mikronukleuszok kialakulása szignifikánsan gyakoribbá vált 24 órás inkubálási időt vizsgálva (3., 4. ábra). Ezt a változást lehetett az 1 órás elő-inkubálásnál is megfigyelni, csak kisebb mértékben. Eredményeink azt mutatják, hogy a malathion dózisfüggő módon genotoxikus hatású a placenta modellsejtekre.

50 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú malathionnal történő kezelés után meghatároztuk, hogy a hidrogénperoxid 5 000 U/ml katalázzal történő enzimatis bontása, illetve az 5,0 $\mu\text{mol/l}$ -es L-NAME kezelés (a nitrogénoxid



2.A ábra: Az életképesség változása 50 µg/ml és 200 µg/ml malathion kezelés hatására, illetve az 1 órás 200 µg/ml malathion kezelést követően malathion mentes tápoldatban történő tenyésztés során. Az első oszlop a 6 órás, a második oszlop pedig a 24 órás kezelés eredményét mutatja. (100 százaléknak a kontroll sejteknél mért optikai denzitást tekintettük.)

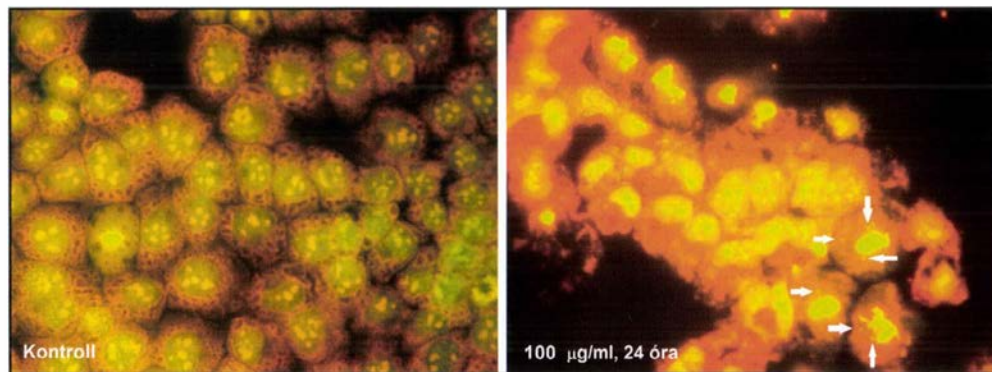


2.B ábra: A sejtek számának változása kezeletlen és 200 µg/ml malathionnal kezelt sejtkultúrában. Az első oszlop a 4 órás, a második pedig a 24 órás sejtenyésztés eredményét mutatja.

kataláz kezelés esetén haladta meg a kapott csökkenés a metódika 20 százalékos hibahatárát.

Megbeszélés

Munkánkban elsőként mutattuk ki és közöltünk mennyiségi adatokat arról, hogy *in vitro* körülmények között a malathion citotóxicus a placenta sejtek modellje-



3. ábra: Mikronukleuszok *in situ* megfigyelése acridine-orange festéssel kontroll és 24 órán át 50 µg/ml malathionnal kezelt sejteknél

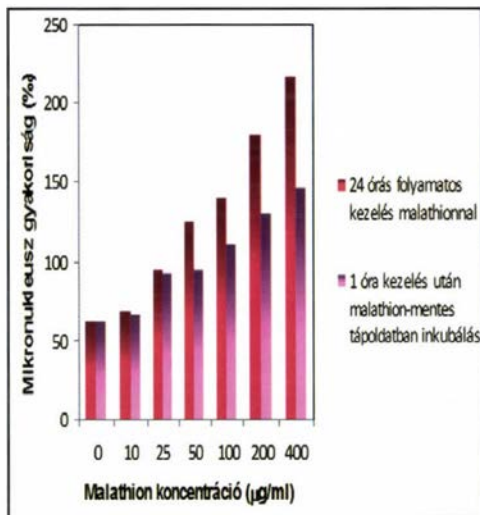
ként elfogadott JAR sejtekre. A malathion alacsonyabb koncentrációtartományban (25-100 $\mu\text{g/ml}$) elsősorban apoptózist okoz. Irodalmi adatok alapján megállapítható, hogy OP vegyületekre más sejtvonalaknál is hasonló eredményt kaptak, és a hatás dózis-, illetve időfüggőnek bizonyult [3,7,8,18,52]. Kisebb dózisosknál más OP-k hatására is az apoptózis volt a domináns sejtpusztulási mechanizmus, nagyobb dózisosknál pedig főként nekrozis lépett fel [7, 12].

Mint ismeretes, az apoptózis egy komplex, programozott sejthalál, amely jól meghatározott sorrendben, egymást követő, molekuláris szintű események energiafüggő láncolatából áll. Inicializációja történhet a sejtek plazmamembránján levő membrándoméneken keresztül, de történhet mitokondriális mechanizmussal is [53]. A membrán szintű inicializáció az ún. halálligandumok membránreceptorhoz történő kapcsolódásán alapul, a mitokondriális mechanizmus viszont a szabadgyökök felgyűlésével függ össze. Különböző gyökfogyó vegyületekkel történő kezeléseknél kapott eredmények alapján elmondható, hogy a malathion cito- és genotoxikus hatása – más OP-khez hasonlóan – szabadgyök mechanizmuson keresztül történik [3, 4, 19]. Ezek az eredmények az apoptózis mitokondriális mechanizmusára utalnak. A saját előzetes eredményeink is alátámasztják ezt a hatásmechanizmust. Érdekes, hogy az általunk használt két gyökfogyó közül csak a kataláz (hidrogénperoxid elimináció) volt hatásos (5. ábra). Ez azt jelentheti, hogy a nitrogénoxidból származó szabadgyökök ebben az esetben kimutatható szerepet nem játszanak. A mitokondriális utat támasztják alá Saleh és munkatársainak azon eredményei is [52], ahol malathion vagy más OP kezelést követően a kaszpáz 9 aktivitásának változását tapasztalták. Vannak

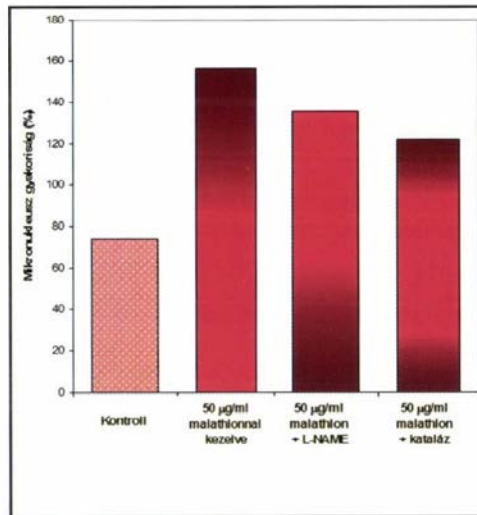
azonban olyan irodalmi adatok is, amelyek szerint malathion, illetve más OP hatására a kaszpáz 8 aktivitása növekszik [3,18]. Ez viszont a halál receptor útra jellemző változás. Elméleti megfontolások és kísérleti adatok alapján tehát a JAR sejtek esetében mindkét előbbieken vázolt hatásmechanizmus számításba jöhet. A kérdés tisztázása további kísérleteket igényel.

Ismert tény, hogy az apoptózis fontos szerepet játszik a placenta normális fejlődésében [54, 55]. Arra is találhatók irodalmi adatok, hogy az apoptózis bizonyos klinikai kórképek, mint pl. a pre-eclampsia és az intrauterin növekedési retardáció kialakításában is részt vesz [56]. Ha mindezekhez hozzávesszük, hogy ilyen kóros elváltozásokat malathion és más OP-k esetében is megfigyeltek [38, 57], akkor nagyon kézenfekvő, hogy az OP-k apoptózist kiváltó hatása húzódik meg az előbb említett kóros jelenségek hátterében.

Kísérleteink segítségével azt is sikerült kimutatni, hogy a malathion genotoxikus a JAR sejtekre. Az általunk alkalmazott mikronukleusz teszt egy elfogadott módszer a DNS károsodás kimutatására [47, 48]. A kettős-magvú (citokinézisben gátolt) sejtekben a mikronukleusz gyakoriság nagyobb malathion koncentrációknál kismértékben emelkedett. Az apoptózis kiváltásához hasonlóan feltételezhető, hogy a genotoxikus hatásokban is a malathion kezelés által indukált szabadgyök képződés játszik szerepet [16]. Fontos megjegyezni, hogy a cito-, és genotoxikus hatás olyankor is kimutatható, amikor malathionnal csak egy órán át történik a kezelés, és ezt követően a sejtek inkubálása malathion-mentes tápoldatban folytatódik. A hatás megjelenése azt mutatja, hogy a JAR sejtek malathion felvétele viszonylag gyors, hiszen egy óra alatt is tapasztalható irreverzibilis változás.



4. ábra: A mikronukleusz gyakoriság változása különböző koncentrációjú, folyamatos (1. oszlop), illetve 1 órás (2. oszlop) malathion kezelés hatására



5. ábra: Nitrogénoxid szintáz gátló anyag (5 µmol/l L-NAME) és 5 000 µ/l kataláz hatása az 50 µg/ml malathion kezelésnél tapasztalt mikronukleusz gyakoriságra

Ez a megfigyelés nagy jelentőségű lehet a rövid malathion expozíciók rizikóbecslésével kapcsolatban.

Az utóbbi években kimutatták, hogy a különböző toxikus kémiai vagy fizikai hatások a közvetlen sejtkárosításon felül úgynevezett szomszédosági (bystander) hatást is produkálnak [58]. Ez a fogalom azt jelenti, hogy a közvetlenül károsodott sejtek közelében levő, a károsító ágens által nem érintett sejtek gyakran a közvetlenül károsodott sejtekhez hasonló elváltozásokat mutatnak. Így a kezelthez hasonlóan apoptózissal, programozott sejthalállal elpusztulhatnak, DNS károsodás alakulhat ki bennük, stb. Ez a hatás megsokszorozhatja a károsodott sejtek számát, azaz az adott ágens hatását. Egyik általános elfogadott ismérve a szomszédosági hatásnak, hogy ilyenkor a végpontok csoportokban jelennek meg [59]. Azok a megfigyeléseink, hogy mind

a malathion kezelést követően látható elpusztult sejtek (1. ábra jobb oldal), mind a mikronukleuszt tartalmazó sejtek (3. ábra jobb oldal) csoportosan helyezkednek el, esetünkben is szomszédosági hatásra utalnak. Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a malathion cito- és genotoxikus hatása a JAR sejtekre, mely elváltozások szomszédosági hatásként is megjelennek.

IRODALOM

- [1] Chambers, W. H.: Organophosphorus compounds: an overview. In: Chambers, J. E., Levi, P. E. (Szerk.), Organophosphates, Chemistry, Fate, and Effects. Academic Press, San Diego, CA, 1992, p. 3–17.
- [2] Kamrin, M. A.: Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact, and Fate. New York: Lewis Publishers, 1997.
- [3] Ahmed, T., Tripathi, A. K., Suke, S. G., et al.: Role of HSP27 and reduced glutathione in modulating malathion-induced apoptosis of human peripheral blood mononuclear cells:

- Ameliorating effect of N-acetylcysteine and curcumin. *Toxicol. In Vitro*, 2009, 23: 1319-1325.
- [4] *D., Bagchi, M., Hassoun, E. A., Stohs, S.J.*: *In vivo* and *in vitro* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 1995, 104: 129-240.
- [5] *Blasiak, J., Jaloszynski, P., Trzeciak, A., Szyfter, K.*: *In vitro* studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutat. Res.*, 1999, 445: 275-283.
- [6] *Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A.R., et al.*: Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis*, 2006, 2: 93-103.
- [7] *Carlson, K., Jortner, B. S., Ehrich, M.*: Organophosphorus compound-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2000, 168: 102-113.
- [8] *Das, G. P., Shaik, A. P., Jamil, K.*: Estimation of apoptosis and necrosis caused by pesticides *in vitro* on human lymphocytes using DNA diffusion assay. *Drug Chem. Toxicol.*, 2006, 29: 147-156.
- [9] *Dulout, F. N., Olivero, O. A., von Guradze, H., Pastori, M. C.*: Cytogenetic effect of malathion assessed by the micronucleus test. *Mutat. Res.*, 1982, 105: 413-416.
- [10] *Flessel, P., Quintana, P. J., Hooper, K.*: Genetic toxicity of malathion: a review. *Environ. Mol. Mutagen.*, 1993, 22: 7-17.
- [11] *Giri, S., Prasad, S. B., Giri, A., et al.*: Genotoxic effects of malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays *in vivo*. *Mutat. Res.*, 2002, 514: 223-231.
- [12] *Li, Q.*: New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity. *Nippon. Med. Sch.*, 2007, 74: 92-105.
- [13] *Moore, P. D., Yedjou, C. G., Tchounwou, P. B.*: Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG(2)) cells. *Environ. Toxicol.*, 2010, 25: 221-226.
- [14] *Réus, G. Z., Valvassori, S. S., Nuernberg H., et al.*: DNA damage after acute and chronic treatment with malathion in rats. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56: 7560-7565.
- [15] *Salvadori, D. M., Ribeiro, L. R., Pereira, C. A., Beçak, W.*: Cytogenetic effects of malathion insecticide on somatic and germ cells of mice. *Mutat. Res.*, 1988, 204: 283-287.
- [16] *Shadnia, Sh., Azizi, E., Hosseini, R., et al.*: Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2005, 24: 439-445.
- [17] *Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., et al.*: Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. *Mutation Res.*, 1997, 388: 85-95.
- [18] *Masoud L., Vijayasathy, C., Fernandez-Cabezudo, M., et al.*: Effect of malathion on apoptosis of murine L929 fibroblasts: a possible mechanism for toxicity in low dose exposure. *Toxicology*, 2003, 185: 89-102.
- [19] *Banerjee, B. D., Seth, V., Bhattacharya, A., et al.*: Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol. Lett.*, 1999, 107: 33-47.
- [20] *Jia, Z., Misra, H. P.*: Reactive oxygen species in *in vitro* pesticide-induced neuronal cell (SH-SY5Y) cytotoxicity: role of NFkappaB and caspase-3. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, 42: 288-298.
- [21] *Abou-Donia, M. B.*: Organophosphorus Ester-Induced Chronic Neurotoxicity, *Archives of Environmental Health*, 2003, 58: 484-497.
- [22] *Kalender, S., Uzun, F. G., Durak, D., et al.*: Malathion-induced hepatotoxicity in rats: the effects of vitamins C and E. *Food Chem. Toxicol.*, 2010, 48: 633-638.
- [23] *Binukumar, B. K., Gill, K. D.*: Cellular and molecular mechanisms of dichlorvos neurotoxicity: cholinergic, noncholinergic, cell signaling, gene expression and therapeutic aspects. *Indian. J. Exp. Biol.*, 2010, 48: 697-709.
- [24] *Yavuz, Y., Yurumez, Y., Ciftci, I. H., Buyukokuroglu, M.*: Effect of diphenhydramine on myocardial injury caused by organophosphate poisoning. *Clin. Toxicol. (Phila.)*, 2008, 46: 67-70.

- [25] Davea, J. R., Connors, R. A., Genovesa, R. F., et al.: DNA fragmentation in leukocytes following repeated low dose sarin exposure in guinea pigs. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007, 64: 2823 – 2828.
- [26] Johnson, V. J., Rosenberg, A. M., Lee, K., Blakley, B. R.: Increased T-lymphocyte dependent antibody production in female SJL/J mice following exposure to commercial grade malathion. *Toxicology*, 2002, 170: 119-129.
- [27] Ambali, S. F., Abbas, S. O., Shiitu, M., et al.: Effects of gestational exposure to chlorpyrifos on implantation and neonatal mice. *J. Cell. Animal. Biol.*, 2009, 3: 50-57.
- [28] Bretveld, R. W., Thomas C. M., Scheepers, et al.: Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2006, 4: 30-44.
- [29] Greenlee, A. R., Ellis, T. M., Berg, R. L.: Low-dose agrochemicals and lawn-care pesticides induce developmental toxicity in murine preimplantation embryos. *Environ. Health Perspect.*, 2004, 112: 703-709.
- [30] Kaur, S., Dhanju, C. K.: Biochemical effects of some organophosphorus pesticides on the ovaries of albino rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 2005, 49: 148-152.
- [31] Khan, M. Z., Law, F. C. P.: Adverse effects of pesticides and related chemicals on enzyme and hormone systems of fish, amphibians and reptiles: A review. *Proc. Pakistan Acad. Sci.*, 2005, 42: 315-323.
- [32] Kumar, R., Uppal, R. P.: Effect of malathion on estrous cycle and reproductive performance of rats. *J. Environ. Biol.*, 1986, 7: 35-39.
- [33] Ozmen, G., Akay, M. T.: The effects of malathion on some hormone levels and tissues secreting these hormones in rats. *Vet. Hum. Toxicol.*, 1993, 35: 22- 24.
- [34] Prakash, N., Narayana, K., Murthy, G. S., et al.: The effect of malathion, an organophosphate, on the plasma FSH, 17 beta-estradiol and progesterone concentrations and acetylcholinesterase activity and conception in dairy cattle. *Vet. Hum. Toxicol.*, 1992, 34: 116-119.
- [35] Recio, R., Ocampo-Gomez, G., Moran-Martínez, J., et al.: Pesticide exposure alters follicle-stimulating hormone levels in Mexican agricultural workers. *Environ. Health Perspect.*, 2005, 113: 1160-1163.
- [36] Sanborn, M. D., Cole, D., Abelsohn, A., Weir, E.: Identifying and managing adverse environmental health effects: 4. Pesticides. *Can. Med. Assoc. J.*, 2002, 166: 1431-1436.
- [37] Whorton, D., Krauss, R. M., Marshall, S., Milby, T. H.: Infertility in male pesticide workers. *Lancet*, 1977, 2: 1259-1261.
- [38] Levario-Carrillo, M., Amato, D., Ostrosky-Wegman, P., et al.: Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation. *Chemosphere*, 2004, 55: 1421-1427.
- [39] Bamberger, A. M., Schulte, H. M., Thuncke, I., et al.: Expression of the apoptosis-inducing Fas ligand (FasL) in human first and third trimester placenta and choriocarcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1997, 82: 3173-3175.
- [40] Cross, J. C.: Placental function in development and disease. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2006, 18: 71-76.
- [41] Moffett, A., Loke, C.: Immunology of placenta in eutherian mammals. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, 6: 584-594.
- [42] Cohen, J. J.: Apoptosis. *Immunol. Today*, 1993, 14: 126-130.
- [43] Ribble, D., Goldstein, N. B., Norris, D. A., Shellman, Y. G.: A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol.*, 2005, 5: 12-19.
- [44] Patillo, R. A., Ruckert, A. C., Russa, R. O., et al.: The JAR cell line: continuous multihormone production and controls. *In Vitro (Rockville)*, 1971, 6: 398-405.
- [45] McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., et al.: The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. *Methods Cell. Biol.*, 1995, 46: 153-185.
- [46] Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 1983, 65: 55-63.
- [47] Fenech, M.: Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay. *Nat. Protoc.*, 2007, 2: 1084-1104.
- [48] IAEA. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment- a Manual. International Atomic Energy Agency Vienna. Technical Reports series nr. 405., 2001, p. 81-86.
- [49] Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate Jr., M.: An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat. Res.*, 1983, 120: 241-247.

- [50] *Chen, J., Zhang, Z. G., Li, Y., Wang, Y., et al.:* Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann. Neurol.*, 2003, 53: 743-51.
- [51] *Zweier, J. L., Kuppusamy, P., Lutty, G. A.:* Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1988, 85: 4046-50.
- [52] *Saleh, A. M., Vijayasathy, C., Masoud, L., et al.:* Paraoxon induces apoptosis in EL4 cells via activation of mitochondrial pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2003, 190: 47-57.
- [53] *Elmore, S.:* Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 2007, 35: 495-516.
- [54] *Smith, S. C., Baker, P. N., Symonds, E. M.:* Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1997, 17: 57-65.
- [55] *Straszewski-Chavez, S. L., Abrahams, V. M., Mor, G.:* The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr. Rev.*, 2005, 26: 877-897.
- [56] *Ishihara, N., Matsuo, H., Murakoshi, H., et al.:* Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2002, 186: 158-166.
- [57] *Crocker, I. P., Cooper, S., Ong, S. C., et al.:* Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts in normal pregnancy to those complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am. J. Pathol.*, 2003, 162: 637-643.
- [58] *Hamada, N., Matsumoto, H., Hara, T., et al.:* Intercellular and intracellular signaling pathways mediating ionizing radiation-induced bystander effects. *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, 2007, 48: 87-95.
- [59] *Reznikov, K., Kolesnikova, L., Pramanik, A., et al.:* Clustering of apoptotic cells via bystander killing by peroxides. *FASEB J.*, 2000, 12: 1754-64.

**Z. Somosy M.D.,
Rita T. Galántai M.D., Ph.D.,
Gabriella Bognár M.D.,
Blanka Emödy-Kiss,
Lt.Col. (ret.) Gy. Horváth M.D.,
Col. (ret.) (eng.) A. Gachályi**

Effect of malathion on placental model cells I.

Study of cyto- and genotoxicity

Certain pesticides (e.g. malathion) and the highly toxic chemical warfare nerve agents (e.g. tabun, sarin, soman, VX) belong to the chemical group, the so-called organophosphate agents. These compounds can inhibit the acetylcholinesterase enzyme (cholinergic effect) resulting in characteristic effects on the nervous system. However, some recently published data have suggested that the reproductive system and the fetus can also be affected by organophosphates through noncholinergic action mechanisms.

In the present study we investigated the cell damaging effects of malathion on human choriocarcinoma (JAR HTB 144) cells, as an accepted *in vitro* model for the placental cells. Our results showed that malathion treatments, even at lower doses, resulted in apoptotic and necrotic death of the cells and caused the formation of micronuclei indicating the damage of DNA. These changes were multiplied by bystander effect.

Key-words: placental model cells, human choriocarcinoma cell line (JAR), organophosphates, malathion, cytotoxicity, genotoxicity, apoptosis, micronucleus

*Dr. Somosy Zoltán
1134 Budapest, Róbert Károlyi krt. 44.*