

Magyar Honvédség – Honvédkórház¹, Tudományos Intézet
Országos Frédéric Joliot-Curie Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet²

Malathion hatása humán placenta modellsejtekre II. Gázkromatográfiás-tömegspektrometriás vizsgálatok.

Dr. Galántai Rita Tünde¹ Ph.D.,
Dr. Somosy Zoltán¹,
Emődy-Kiss Blanka¹,
Dr. Bognár Gabriella²,
Dr. Horváth Győző¹ ny. orvosalezredes,
Draskovits-Papp Zsófia¹,
Dr. Gachályi András¹ ny. mérnök-ezredes

Kulcsszavak: choriocarcinoma (JAR) sejtvonal, organofoszfátok, malathion, malaoxon, gázkromatográfia, tömegspektrometria

Jelen munkánkban gázkromatográfiás elválasztást és tömegspektrometriás detektálást alkalmazva vizsgáltuk a malathion coriocarcinoma sejtekre gyakorolt cito- és genotoxikus hatásának mechanizmusát és a peszticid kísérleti rendszerünkben való stabilitását.

Méréseink alapján megállapítható, hogy a malathion jelentős részének sejtek általi felvétele a kezelés első órájában megtörténik, későbbi időpontokban pedig, feltehetően a sejtek pusztulásával magyarázhatóan, a felvett malathion egy része bomlatlan formában visszajut a médiumba, ahol – a közeg összetételétől függő sebességgel – bomlást szenved. A vizsgált placenta eredetű sejtekben a malathion nem alakul át biológiailag aktív, a kolinerg hatás kiváltása szempontjából jelentős metabolitjává, malaoxonná. Mindezek alapján valószínű, hogy a biológiai vizsgálatokban tapasztalt cito- és genotoxikus hatásokat [1] maga a malathion okozza.

Rövidítések:

OP	organofoszfát
GC-MS	gázkromatográfiás elválasztás tömegspektrometriás detektálással
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-nál kifejlesztett sejtenyésző tápoldat
FCS	borjú szérum (fetal bovine serum)
CYP	citokróom P450 izoenzim

Bevezetés

Az organofoszfotionátok, köztük a malathion is, vizes közegben nem stabil vegyületek. Egyrészt hidrolízis következtében biológiailag inaktív bomlástermékek kép-

ződhetnek [2], másrészt – megfelelő citokróom P450 izoenzim közreműködésével – a kiindulási vegyület oxon származéka keletkezhet, amely jelentős biológiai aktivitással rendelkezik. Ez a metabolit malathion esetében a malaoxon. A malathion-malaoxon

átalakulás következtében fellépő biológiai aktivitás, toxicitás jelentős növekedésére számos irodalmi adat ismeretes. Így például patkányoknál orális expozíció esetén a malathion LD_{50} értéke 10 000-12 000 mg/kg, malaixonnál viszont már 158 mg/kg mennyiség is elpusztítja a kísérleti állatok 50 százalékát [3-4]. Számos szerző a malathion kolinészteráz gátló (kolinerg) hatását elsősorban a malaixonnak tulajdonítja [5-7], ugyanakkor arra nem áll rendelkezésre kísérleti adat, hogy a malathion cito- és genotoxikus hatásaiban az anyavegyület vagy/és a biológiailag aktív metabolit, a malaixon játszik-e szerepet.

Bár a malathion csak korlátozott perzisztenciájú peszticid, kiterjedt használata miatt mégis komoly környezeti kockázatot jelent a világ számos pontján. Ezzel magyarázható, hogy a malathion kimutatására nagyon sokféle minta esetében dolgoztak ki metodikákat. Ha csak az elmúlt évek irodalmát tekintjük át, akkor is látható, hogy számos vizsgálatot végeztek különböző típusú mintákból (mint például humán szérum, vér, plazma, zöldségek, gyümölcsök, gyermektápszerek, vízminták, levegő, termőföld, stb.) a malathion tartalmának meghatározására [8-15]. Számos szerző a malathion különböző sejttípusokra való hatását gyakran *in vitro* kísérletekben vizsgálta, ezekben a sejtrendszerekben azonban nem történt meg a malathion átalakulásainak nyomon követése. Fontos tisztázni, hogy az *in vitro* kísérleti rendszerekben tápoldatként használt vizes közeg, amely számos biológiailag aktív vegyületet, enzimeket is tartalmaz, mennyiben módosítja a malathion koncentrációját a sokszor hosszú órákig vagy akár napokig tartó vizsgálatok során. A tápoldat, illetve a sejtek peszticid tartalmának meghatározása arra a nagyon fontos kérdésre is választ adhat,

hogy lejátszódhat-e az adott sejt kultúrában a malathion-malaixon átalakulás. Az ilyen irányú vizsgálatok eredménye alapján megmondható, hogy a megfigyelt biológiai változásokat az anyavegyület vagy/és aktív metabolitja váltja-e ki. Ezek a kérdések a JAR sejtek malathion hatására bekövetkező – előző közleményünkben ismertetett [1] – *in vitro* cito- és genotoxikus hatások vizsgálata során is felvetődtek. Megválaszolásukra a biológiai mérésekkel párhuzamosan a sejteket, illetve a sejtek médiumát gázkromatográfiás tömegspektrometriai (GC-MS) vizsgálatoknak vetettük alá. A GC-MS módszer érzékenysége miatt, amint azt jelentős számú irodalmi adat is bizonyítja, jól alkalmazható már nyomokban megjelenő OP-k önmagukban, illetve keverékekben történő kimutatására [12, 13, 16-21].

GC-MS méréseink során időben követjük a biológiai kísérlet különböző fázisait, külön figyelmet fordítva arra, hogy egyes, jól körvonalazható biológiai változásokkal párhuzamosan (pl. a sejtek pusztulása) milyen malathion koncentráció változások tapasztalhatók. Emellett azt a fontos kérdést is megvizsgáltuk, hogy a malathion kezeléseket követően megjelenik-e a sejtekben, illetve a tápoldatban a malaixon. Ezeket a méréseket a malaixon standard vegyület tápoldatbeli bomlékonyságának mérésével is kiegészítettük. Eredményeink alapján következtetni lehet arra, hogy esetünkben a malathion és/vagy ismert toxikus oxon származéka felelős-e a cito- és genotoxikus hatásokért.

Anyagok és módszerek

A malathion és a sejtek tenyésztésére használt anyagok beszerzését, a malathion törzsoldat készítését, az előző cikkben ismertettük [1]. A malaixont a Sigma-Aldrich-től vásá-

roltuk, a dimetil-szulfoxidot (DMSO)* és az n-hexánt** pedig a Merck-től szereztük be. Minden szerves oldószer gáz-kromatográfiás tisztaságú volt.

Sejtek tenyésztése, malathion kezelése

A sejtek tenyésztése és malathion kezelése a cito- és genotoxikus hatás vizsgálatánál leírt módon történt [1]. Kísérleteink során a sejtenyészetet 10, 30 perc, 1, 4, 6, 8, 24 órán keresztül kezeltük 10, 25, 50, 100, 200 és 400 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú malathionnal. További kísérleteinkben az előzőekben alkalmazott malathion koncentrációkkal egy órás kezelést végeztünk, majd a sejteket peszticidet nem tartalmazó médiumban tenyésztettük tovább. A malathion-mentes tápoldatból történő mintavételi időpontok az előzőekben megadottakkal azonosak voltak. A malathion inkubálását borjú savót tartalmazó, illetve nem tartalmazó RRPPI-1640 médiumban is elvégeztük, az előzőekben felsorolt mintavételi időpontokkal. Minden típusú kísérletből 3-3 független sorozatot készítettünk. Egy sorozaton belül 2-2 párhuzamos mintát használtunk, amelyek mindegyikét kétszer mértük le a GC-MS vizsgálat során.

A sejtek feltáráshoz készített minták esetében a sejteket 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ malathionnal 0,5, 1, 2, 6 órán át kezeltük. 2 független sorozatot készítettünk. Egy sorozaton belül 2-2 párhuzamos mintát használtunk, amelyek mindegyikét kétszer mértük le a GC-MS vizsgálat során.

A sejtek ultrahangos feltárása

A sejtek kémiai összetevőinek vizsgálatára céljából ultrahangos sejtfeltárást alkalmaztunk (szonikátor: Sartorius Stedim Biotech, Labsonic P, frekvencia: 24 kHz,

maximális amplitúdó: 210 μm , maximális teljesítmény: 460 W/cm^2). Mivel az irodalomban található olyan adat, amely szerint a malathion oldat ultrahangos kezelése során malaoxon keletkezett [19], kontroll kísérletben a szonikálást sejtmentes közegben is elvégeztük. Az általunk alkalmazott beállításnál (a maximális amplitúdó 30 százaléka) malaoxon nem keletkezett. Ugyanazon koncentrációjú malathionnal végzett 0, 1, 2, 4, 6 perces ultrahangos kezelések eredményeinek összehasonlítása azt mutatta, hogy 4 perces szonikálást követően már nem növekedett tovább a feltárt malathion mennyisége, ezért a továbbiakban a vizsgált mintákat 4 percig ultrahangoztuk.

Folyadék-folyadék extrakció

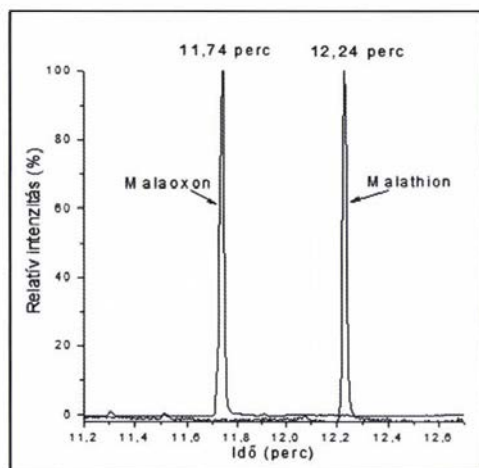
50 μl mintát 450 μl térfogatú, 0,125 g nátriumkloridot tartalmazó foszfát pufferrel (1x PBS; pH 7,2) hígítottunk fel, majd 500 μl hexánnal alaposan összeráztuk. 1 perces vortexelés után 12 320 g (10 500 rpm) fordulatszámra 10 percig centrifugáltuk. A szerves fázist elválasztottuk, majd a kirázást még kétszer megismételtük. Az ugyanazon mérőüvegcsében összegyűjtött szerves fázisról nitrogénáram segítségével elpárologtattuk a hexánt. Ezt követően – a kezdeti malathion koncentrációtól függően – a mintát a GC-MS méréshez különböző térfogatú hexán hozzáadásával készítettük elő, ügyelve arra, hogy az azonos kezdeti malathion koncentráció esetén azonos térfogatú hexánban történjen a kiszáritás utáni visszaoldás.

GC-MS analízis

A minták malathion és malaoxon tartalmának minőségi és mennyiségi meghatározását Varian 300-MS tömegszelektív

* gázkromatográfiához (Kat. sz.: 1.09678.0100)

** Supra Solv. (kat. sz.: 1.04371.2500)



1. ábra: A malathion és malaoxon standard vegyületek GC-MS kromatogramjai

detektorhoz csatlakoztatott Varian 450-GC gázkromatográfval végeztük. Az elválasztáshoz szilika kapillaris oszlopot használtunk. (VF 5MS, hossz: 30 m, belső átmérő: 0,25 mm, filmréteg vastagsága: 0,25 μm). Az adatgyűjtés és feldolgozás a gyártó által szolgáltatott programmal történt (Varian MS Workstation).

A mérés kezdetén az oszlopot 1 percen keresztül 70 °C-on tartottuk, majd 15 °C/perces sebességgel 280 °C-ra fűtöttük fel és 1 percig ezen a hőmérsékleten hagytuk. Az injektor hőmérséklete 280 °C volt. Minden mérésnél automatikus minta-adagoló (Varian CP-8400) segítségével 1 μl mintát injektáltunk splitless módban. Vivőgázként 1 ml/perc-es sebességgel héliumot áramoltattunk.

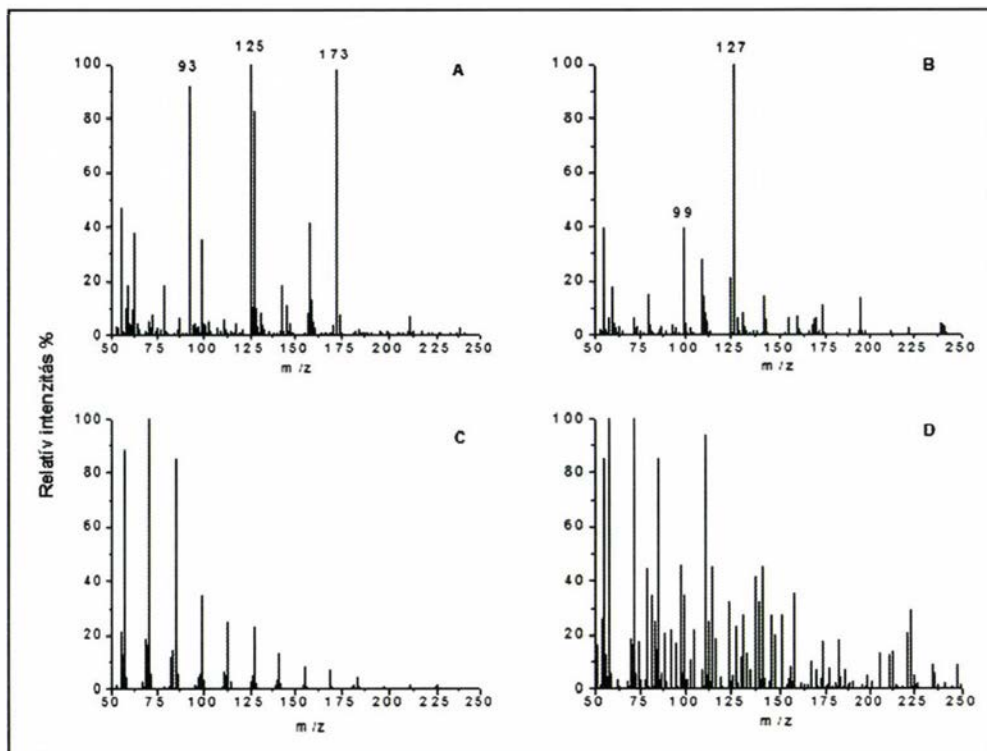
A tömegspektrumokat 70 eV energiájú elektronokkal történő ionizációval (EI) vettük fel. A malathion, illetve malaoxon beazonosításakor az 50-400 m/z tartományban totál ion módban mértünk. A vizsgált OP-k beazonosítása retenciós idejük alap-

ján történt, amelyet a megfelelő standard vegyület hexános oldatának mérése alapján határoztunk meg. A mennyiségi meghatározások során a vizsgált vegyületre jellemző ionokat detektáltuk (malathion: 93, 125, 173 m/z, malaoxon: 99, 109, 127 m/z). A relatív koncentrációváltozásokat a célionnak megfelelő csúcs alatti területek összehasonlítása alapján kaptuk meg.

Eredmények

Az 1. ábra a malathion és a malaoxon standard vegyületek GC-MS mérésével kapott kromatogramját mutatja be. A két vegyület retenciós ideje szignifikánsan eltér (11,74 perc (malaoxon) és 12,24 perc (malathion)), tehát az alkalmazott beállítások mellett az anyavegyület aktív metabolitjától jól elkülöníthető.

A malathionnal kezelt sejtek (25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 0,5, 1, 2, 6 óráig) feltárása után kapott, illetve a sejtek tápoldatából vett mintákat GC-MS vizsgálatnak vettük alá. A malaoxon retenciós idejénél detektált tömegspektrum alapján megállapítottuk, hogy egyetlen mintában sem volt kimutatható mennyiségű malaoxon. A 2.C és D ábrán példaképpen bemutattunk két ilyen tömegspektrumot, amelyeket a sejtek roncsolásával kapott, illetve a sejtek tápoldatából vett mintáknál detektáltunk. Összehasonlítással a malathion (2.A) és a malaoxon (2.B) standard vegyületek retenciós csúcsánál kapott tömegspektrumokat is feltüntettük. Érdeemes megjegyezni, hogy még a legrövidebb, fél óráig tartó malathion kezelést követően is detektáltunk malathiont a sejtek feltárása után kapott mintákban. A kezdeti malathion koncentrációtól függően egy, illetve két órás kezelés után kaptuk a maximális malathion koncentrációt. Ezekből a megfigyelésekből arra lehet következtetni, hogy a malathion



2. ábra: A: A malathion standard vegyület retenciós idejénél mért tömegspektruma

B: A malaoxon standard vegyület retenciós idejénél mért tömegspektruma

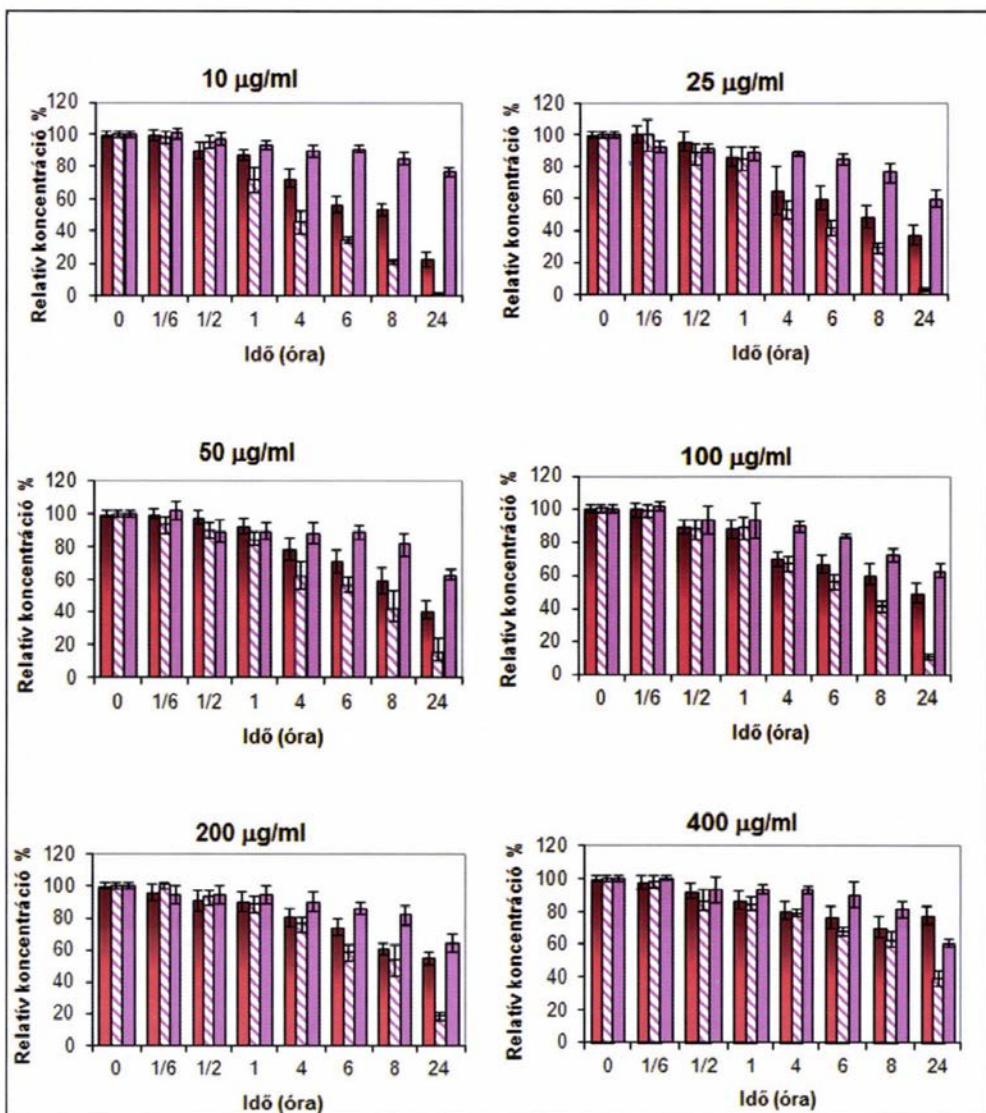
C: A sejtek feltárása után kapott minta malaoxon retenciós idejénél mért tömegspektruma

D: A sejtek tápoldatából vett minta malaoxon retenciós idejénél mért tömegspektruma

JAR sejtek általi felvétele relatíve gyors folyamat. Ez egybevág a cito- és genotoxicitás vizsgálata során kapott eredményeinkkel, amelyek szerint akkor is megfigyelhető volt a malathion cyto- és genotoxikus hatása (igaz, kisebb mértékben), amikor egy óras inkubálást követően a tápoldatot malathion-mentesre cseréltük.

A malathion koncentráció változásának vizsgálatát először a sejtekről eltávolított tápoldatban tanulmányoztuk. Amint a 3. ábrán látható, a malathion koncentrációja – 400 $\mu\text{g/ml}$ -es kiindulási koncentráció kivételével – időben csökkent (100 %-nak a 0 időpontban mért malathion koncent-

rációt tekintettük). A csökkenés mértéke jelentősen függött a kiindulási malathion koncentrációtól. 400 $\mu\text{g/ml}$ -es kiindulási koncentrációnál a hosszú inkubációs időknél relatív növekedést figyeltünk meg, ami arra utal, hogy a sejtekből malathion áramlott ki a tápoldatba. Annak érdekében, hogy önmagában a sejtek tápoldatának malathionra gyakorolt hatását is meg tudjuk vizsgálni, a malathiont a sejtek távollétében, 10 %-os borjúsérumot (FCS) tartalmazó RPMI-1640, illetve FCS-mentes médiumban – a sejtes kísérleteknek megfelelő koncentrációknál és időkig – inkubáltuk. A 3. ábrán látható, hogy a malathion mennyisége időben minden közegben csökkent,



3. ábra: A malathion relatív koncentráció változása sejteket tartalmazó (piros színű, árnyékolat oszlop), 10 % FCS+RPMI-1640 (pink színű mintázott oszlop) és RPMI-1640 (pink színű oszlop) tápoldatban. Az ábrán címként feltüntetett koncentrációk a malathion kiindulási koncentrációját jelölik

azonban a csökkenés mértéke – különösen az FCS-t tartalmazó médiumokban – a kezdeti malathion koncentrációtól függően eltérő volt. Továbbá megállapítható, hogy az FCS-mentes közegekben kisebb mértékű csökkenést lehetett megfigyelni, mint az FCS tartalmú RPMI-1640 tápoldatokban.

Amint azt az előző közleményünkben bemutatottuk, a biológiai vizsgálatok során végeztünk olyan kísérlet sorozatot is, ahol 1 órás malathion kezelés után a sejtek inkubálását malathion-mentes tápoldatban folytattuk tovább [1]. Ezekkel a vizsgálatokkal párhuzamosan is folytattunk

olyan GC-MS méréseket, ahol a lecserélt – kezdetben malathion-mentes médiumban – követtük nyomon a malathion megjelenését, illetve koncentrációjának időbeli változását. A 4. ábrán a 25 és 100 µg/ml malathion kezelést követően lecserélt tápoldatbeli malathion koncentrációváltozást mutatjuk be. (Ezeknél a kísérleteknél a „0” inkubációs idő a tápoldat lecserélését követő 10. percnél felel meg, és az ebben az időpontban detektált malathion mennyiséget tekintettük 100 százaléknak.) Amint látható, az első órában mindkét mintában a malathion koncentráció növekedése figyelhető meg. Aztán a malathion koncentráció körülbelül 6. óráig csökken. Ezt követően a 8 órás időpont alapján mindkét kiindulási koncentrációnál megváltozik a folyamat iránya, majd az inkubáció végén vett mintákban – a kezdeti malathion koncentrációtól függően eltérő arányú – újabb csökkenés figyelhető meg. Ebben a kísérlet-sorozatban is – a malathionnal való folyamatos kezeléshez hasonlóan – a peszticid koncentrációjának csökkenése a malathion bomlásának, míg a növekedés a sejtekből kiáramló malathionnak tudható be.

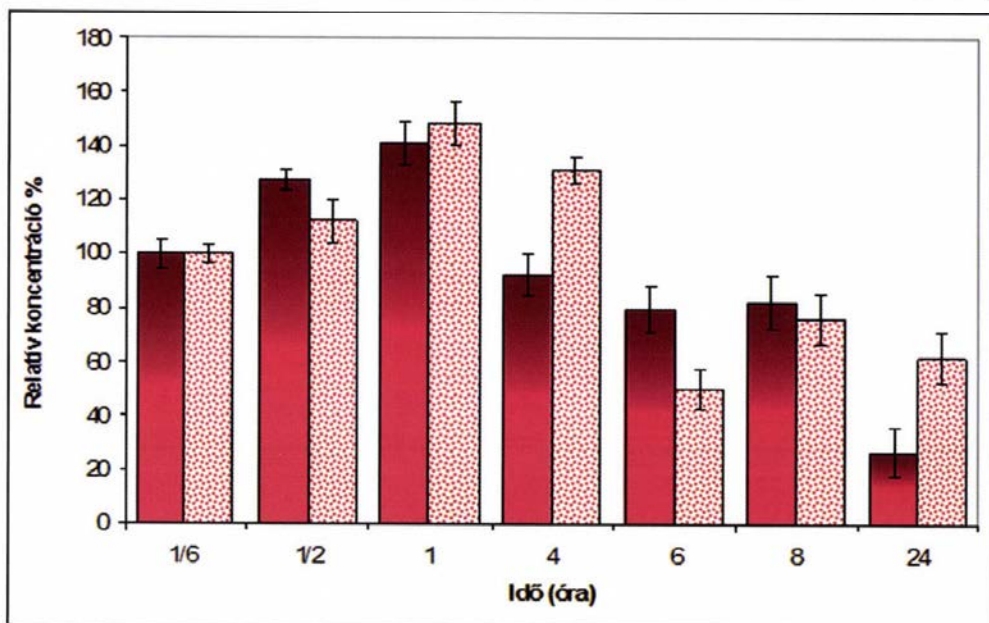
A malaaxon a malathionhoz hasonlóan vizes közegben bomlékony vegyület, és észterázok jelenlétében enzimatisz hidrolízise is megtörténhet. Figyelembe véve a malathion tápoldatban tapasztalt jelentős koncentráció csökkenését, joggal vethető fel a kérdés, hogy nem történhet-e hasonló változás a malaaxonnal is. Amennyiben a malaaxon bomlása gyors és intenzív folyamatnak adódna a JAR sejtek vizsgálatakor alkalmazott rendszerben, a sejtek, illetve a sejtek médiumának malaaxon tartalmára kapott negatív eredmények értelmezésekor a malaaxon bomlásának lehetőségét is számításba kellene venni. Mindezek alapján fontosnak tartottuk a malaaxon standard

vegyület koncentrációjának időbeli változását 10 % FCS+RPMI-1640 médiumban történő inkubálás során nyomon követni. Amint az az 5. ábrán látható, a malaaxon mennyisége – kiindulási koncentrációtól függetlenül – időben csökkenő tendenciát mutat. Ez a változás azonban a malathion azonos körülmények között megfigyelt csökkenésével összehasonlítva kisebb mértékű, 24 órás inkubálás után a kezdeti koncentráció körülbelül 40 százaléka még jelen van a tápoldatban.

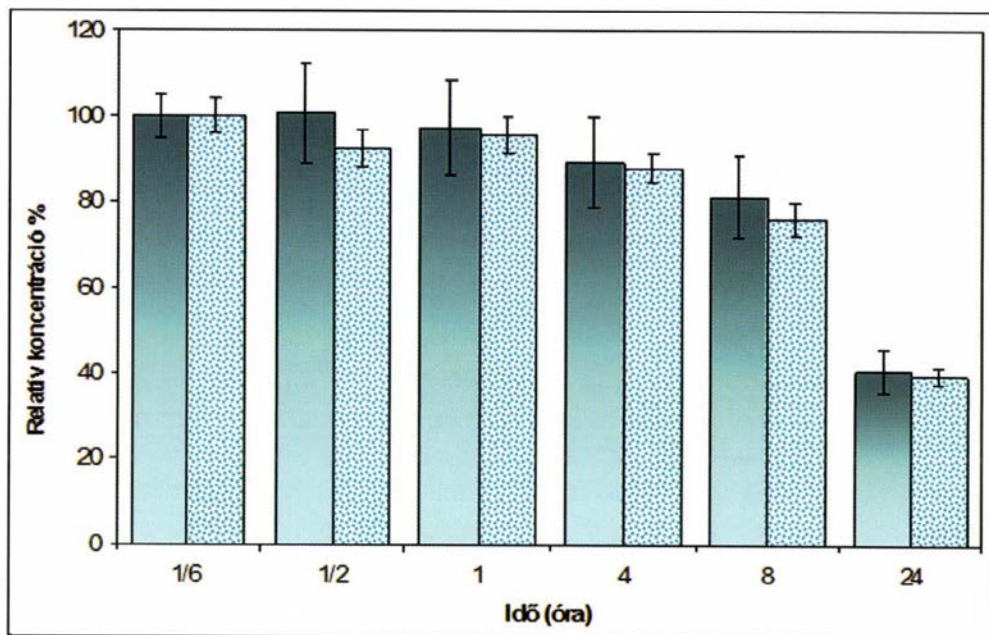
Megbeszélés

A sejt kultúrában, a médiumban és magukban a sejtekben a malathion számos átalakulást szenvedhet el, és ugyanakkor különböző biológiai folyamatokat módosíthat. Ismeretes, hogy a malathion vizes oldatban hidrolizál [2]. Ezt a folyamatot a sejtben, illetve a 10 % borjúsavót is tartalmazó tenyésztő médiumban lévő karboxilészterázok katalizálhatják [20, 21]. Emellett ismertek olyan irodalmi adatok, amelyek arra utalnak, hogy a malathion az acetilkolinészteráz mellett más enzimekre is gátló hatású lehet [21-24], ezért nem kizárt, hogy a malathion a karboxilészterázoknak is inhibitora. A malathion hidrolízisének termékei nem rendelkeznek biológiai aktivitással. Ugyanakkor, vannak olyan sejt típusok (pl. májsejtek), amelyekben megtalálhatók azok a citokróm P450 izoenzimek, amelyek képesek a malathiont malaaxonná oxidálni [5, 25]. A malaaxon toxicitása a malathionnál lényegesen nagyobb, és számos szerző szerint a malathion kolinészteráz gátláson alapuló neurotoxicitása is elsősorban ennek a vegyületnek a hatásával magyarázható [5-7, 26-28].

Ezeket az adatokat figyelembe véve mérési eredményeink a következőképpen értelmezhetők.



4. ábra: A malathion relatív koncentráció változása a JAR sejtek 1 órás malathion kezelését követő malathion-mentes 10 % FCS+RPMI-1640 médiumban történő inkubálása során. Az árnyékolt oszlop a 25 µg/ml-es, a mintázott oszlop pedig a 100 µg/ml-es malathion kezelés eredményét ábrázolja



5. ábra: A malaoxon standard vegyület relatív koncentráció változása 10 % FCS+RPMI-1640 médiumban 25 µg/ml (árnyékolt oszlop) és 100 µg/ml (mintázott oszlop) kezdeti koncentráció esetén

A malathion különböző – sejtmentes – tápoldatokban mért koncentráció csökkenése (3. ábra) a malathion hidrolízisének tudható be. Ismert, hogy a borjúsavóban többek között karboxilészterázok is találhatóak, ezért a borjúsavót tartalmazó tápoldatban a spontán hidrolízis mellett enzimatis hidrolízis is lejátszódhat, és így a malathion koncentrációcsökkenése nagyobb mértékben megy végbe, mint az FCS-mentes közegekben. Kísérleti rendszerünkben a hidrolízist elősegítő enzimeket a jövőben tervezzük azonosítani. Érdemes megjegyezni, hogy nagyobb malathion koncentrációk mellett a borjúsavó a peszticid bomlását már egyre kevésbé befolyásolja. Ez utalhat egyrészt a malathion-karboxilészteráz gátló hatására, de az is lehetséges, hogy nagyobb malathion koncentrációknál a karboxilészterázok köztökhelyei telítődnek.

A sejteket is tartalmazó közegekben az előbbieken tárgyalt folyamatok mellett további – a malathion tápoldatbeli koncentrációjára is befolyással bíró – hatásokkal is számolni kell (például a sejtek anyagcsereje, szaporodása, pusztulása, malathion felvétele és leadása). Sejteket tartalmazó tápoldatban rövidebb inkubációs időknél a malathion relatív koncentrációja magasabb, mint a sejtmentes, FCS-t tartalmazó közegben. Ez a megfigyelés kicsit meglepő, hiszen – figyelembe véve a sejtek malathion felvételét – éppen fordított helyzetet várnánk. Ez a látszólagos ellentmondás azonban feloldható, ha számításba vesszük a sejtek hatását a tápoldat karboxilészteráz tartalmára: a sejteket tartalmazó tápoldatban a sejtek tápanyagfelvétele miatt csökkenhet a borjúsavó, és ezáltal a karboxilészteráz koncentráció, ami viszont az enzimatis hidrolízis háttérbe szorítását vonja maga után. Természetesen a sejtek malathion felvételének mennyiségi vizsgálata önmagában

a malathion tápoldatbeli koncentrációjának mérésével nem oldható meg. Szükség van a malathion sejten belüli koncentrációjának meghatározására is. Ahogy a kísérleti eredmények leírásánál említettük, a sejtek feltárása alapján – a malathion kezdeti koncentrációjától függően – a malathion sejten belüli koncentrációjának maximuma 1-2 órás inkubáció után következik be. Ez a megfigyelés összhangban van azokkal az eredményekkel, amelyeket akkor kaptunk, amikor 1 órás malathion kezelést követően malathion-mentes tápoldatban folytattuk a sejtek inkubálását, hiszen ilyenkor is a folyamatos malathion kezelésnél megfigyelt cito- és genotoxikus hatásokat tapasztaltuk, csak kisebb mértékben [1].

A sejtes, illetve sejtmentes közegeket összehasonlítva a tápoldatbeli malathion szint jelentős eltérése figyelhető meg hosszabb kezelési időknél is. Mivel a sejtes közegekben tapasztalt kisebb mértékű csökkenés, illetve a legnagyobb dózisinál (400 $\mu\text{g/ml}$) jelentkező növekedés időben egybeesik a biológiai vizsgálatok során megfigyelt sejtpusztulás növekedéssel [1], arra következtethetünk, hogy az elpusztult sejtekből a korábban felvett és felhalmozódott malathion újra kikerül a tápoldatba. Figyelembe véve, hogy a nagyobb dózisú malathion kezelések nagyobb mértékű sejtpusztulást okoznak, jól értelmezhető az is, hogy a nagyobb kezdeti malathion koncentrációknál a malathion médiumbeli koncentrációja is nagyobb mértékben nő. Ezek az eredmények arra is felhívhatják a figyelmet, hogy a sejtekbe felvett malathion hosszabb időn keresztül kémiai módosulás nélkül tárolódhat a sejtekben. Erre utalnak a sejtek feltárását követően elvégzett méréseink is. A malathion akkumuláció helyére nincs adatunk, de terveink szerint ezt is tisztázni kívánjuk.

Azokban a kísérletekben, ahol 1 órás malathion kezelést követően malathionmentes tápoldatban történt tovább a sejtek inkubálása, közvetlenül a tápoldat cseréjét követően a médiumban nincsen jelen feleslegben lévő, sejtek által fel nem vett malathion. Ezért a tápoldatban későbbi időpontokban GC-MS vizsgálattal detektált malathion csak a sejtekből származhat. A malathion koncentráció rövidebb időknél tapasztalt növekedése a malathion sejtekből történő kiáramlásával magyarázható (4. ábra). Nagyobb kezdeti malathion koncentrációknál a malathion kiáramlása nagyobb mértékű, ami arra utal, hogy a folyamat függ a koncentráció gradienstől. Ezt támasztja alá az is, hogy ilyen irányú változás a malathiont tartalmazó tápoldat esetében nem detektálható. A jelenség pontos magyarázatát nem ismerjük. Elképzelhető, hogy ez a folyamat értelmezhető a sejtpusztulás kezdeti fázisában is kialakuló membrán permeabilitás változással, de elképzelhető egy transzporter-mediált folyamat is, amelyre számos drog esetében ismerünk példákat.

A GC-MS mérésekből további nagyon fontos következtetések vonhatók le a malathion cito- és genotoxikus hatásának mechanizmusáról. Mint korábban említettük, a malathion kolinerg hatásáért elsősorban nem az alapvegyületet, hanem ennek egyik metabolitját, a malaoxont teszik felelőssé. Ez az átalakulás az irodalmi adatok szerint történhet a májban. Humán máj mikroszómákon kimutatták, hogy a malathion koncentrációjától függően a malathion-malaoxon átalakulást különböző citokróm P450 izoenzimek katalizálják (CYP1A2, 2B6 és 3A4, de a legutóbbi csak magas malathion koncentrációknál). CYP3A izoenzimek összehasonlításakor pedig 3A4>3A7>3A5 sorrendet találták az

oxon formává történő átalakítás hatékonyságára [5, 25]. Az emberi choriocarcinoma JAR sejtekben expresszáldott citokróm P450 izoenzimre nézve nincsenek irodalmi adatok. Első trimeszterbeli és teljes idős humán placentára *Hakkola* és *mtsai* végeztek ilyen irányú vizsgálatokat. Ezekben a tanulmányaikban kimutatták néhány olyan CYP izoenzim mRNS-ét, amely a májban a malathion-malaoxon átalakítást végzi, de sokkal kisebb mennyiségben, mint a májban és a CYP enzimek funkcionális aktivitását nem tudták detektálni [29,30]. Egy másik kutatócsoport viszont nem mutatta ki ezen izoenzimek mRNS-ét humán placentában [31]. GC-MS méréseink során sem a sejtekben, sem a médiumban nem találtunk malaoxont, egyetlen malathion koncentrációnál, egyetlen inkubációs időnél sem. Mivel a kiegészítésként elvégzett kísérleteink kizárták, hogy ezt a negatív eredményt a malaoxon bomlása okozza, megállapítható, hogy kísérleti rendszerünkben malaoxon nem keletkezett. Azaz valószínűsíthető, hogy a malathion cyto- és genotoxikus hatásait a bomlatlan malathion molekula idézi elő. A malathion-malaoxon átalakulásra vonatkozó vizsgálatainkat részletesen ismertettük egy nemrégiben megjelent közleményünkben is [32].

Összefoglalás

A fentiek alapján megállapítható, hogy a jelen tanulmányban ismertett GC-MS eredményeink egyrészt nagyon jól alátámasztják a biológiai mérésekből levont következtetéseket, másrészt olyan fontos többlet információkat szolgáltatnak, amelyeket pusztán a biológiai vizsgálatokból nem lehet ki nyerni. Így például megállapítottuk, hogy a JAR sejtek nem metabolizálják intenzíven a malathiont, még a malathion felvételét követő 24 óra elteltével is ürítenek bomlatlan peszticidet a tápoldatba. A tápoldat és a sej-

tek malaoxon tartalmának vizsgálata során kapott negatív eredmények pedig arra hívták fel a figyelmet, hogy a JAR sejtekben nem történik meg, vagy olyan kis mértékű, a malathion-malaoxon átalakulás, hogy a malathion oxon származéka még az érzékeny GC-MS módszerrel sem mutatható ki. Ez az eredmény rendkívül jelentős, mert azt mutatja, hogy a biológiai kísérletekben megfigyelt cito- és genotoxikus hatások magának a malathionnak tudhatók be, tehát a nem-kolinerg hatások kiváltásáért a vizsgált sejtvonalban az anyavegyület tehető felelősé, nem pedig aktív metabolitja.

IRODALOM

- [1] Somosy, Z., Galántai, R., Bognár, G., et al.: Malathion hatása humán placenta modellsejtekre I. Cito- és genotoxicitás vizsgálata. Kézirat. Honvéderos, 2011.
- [2] Barlas, N. E.: Toxicological assessment of biodegraded malathion in albino mice. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1996, 57: 705-712.
- [3] Rice, D. W., Wisniewski, J. A., Jowa, L., et al.: Health risk assessment of malathion coproducts in malathion-bait used for agricultural pest eradication in urban areas. Pesticide and Environmental Toxicological Section, Office of Environmental Health Hazard Assessment, California Environmental Protection Agency, California, 1997.
- [4] Bavcon Kralj, M., Cernigoj, U., Franko, M., Trebse, P.: Comparison of photocatalysis and photolysis of malathion, isomalathion, malaoxon, and commercial malathion--products and toxicity studies. Water Res., 2007, 41: 4504-4514.
- [5] Buratti, F. M., D'Aniello, A., Volpe, M. T., et al.: Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome p450 isoforms. Drug Metab. Dispos., 2005, 33: 295-302.
- [6] 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.
- [7] Krstić, D., Colović, M., Krinulović, K., et al.: Inhibition of AChE by single and simultaneous exposure to malathion and its degradation products. Gen. Physiol. Biophys., 2007, 26: 247-253.
- [8] Inoue, S., Saito, T., Mase, H., et al.: Rapid simultaneous determination for organophosphorus pesticides in human serum by LC-MS. J. Pharm. Biomed. Anal., 2007, 44: 258-264.
- [9] Wang, Y., Du, R.: Simultaneous extraction of trace organophosphorus pesticides from plasma sample by automated solid phase extraction and determination by gas chromatography coupled with pulsed flame photometric detector. Forensic Sci. Int., 2010, 198: 70-73.
- [10] Park, M. J., In, S. W., Lee, S. K., et al.: Postmortem blood concentrations of organophosphorus pesticides. Forensic Sci. Int., 2009, 184: 28-31.
- [11] Singh, S. B., Mukherjee, I., Maisnam, J., et al.: Determination of pesticide residues in integrated pest management and nonintegrated pest management samples of apple (*Malus pumila* Mill.). J. Agric. Food Chem., 2009, 57: 11277-11283.
- [12] Lal, A., Tan, G., Chai, M.: Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatographic methods. Anal. Sci., 2008, 24: 231-236.
- [13] Tanaka, T., Hori, T., Asada, T., et al.: Simple one-step extraction and cleanup by pressurized liquid extraction for gas chromatographic-mass spectrometric determination of pesticides in green leafy vegetables. J. Chromatogr. A., 2007, 1175: 181-186.
- [14] Kumari, B., Madan, V.K., Kathpal, T.S.: Status of insecticide contamination of soil and water in Haryana, India. Environ. Monit. Assess., 2008, 136: 239-244.
- [15] Ma, J., Xiao, R., Li, J., et al.: Determination of organophosphorus pesticides in underground water by SPE-GC-MS. J. Chromatogr. Sci., 2009, 47: 110-115.
- [16] Bielawski, D., Ostrea, E., Posecion, N., et al.: Detection of several classes of pesticides and metabolites in meconium by gas chromatography-mass spectrometry. Chromatographia, 2005, 62: 623-629.

- [17] *Tsoutsis, C., Konstantinou, I., Hela, D., Albanis, T.*: Screening method for organophosphorus insecticides and their metabolites in olive oil samples based on headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 2006, 573-574: 216-222.
- [18] *Silva, M. G., Aquino, A., Dórea, H. S., Navickiene, S.*: Simultaneous determination of eight pesticide residues in coconut using MSPD and GC/MS. *Talanta*, 2008, 76: 680-684.
- [19] *Zhang, Y., Xiao, Z., Chen, F., et al.*: Degradation behavior and products of malathion and chlorpyrifos spiked in apple juice by ultrasonic treatment. *Ultrason. Sonochem.*, 2010, 17: 72-77.
- [20] *Gupta, R. C., Welsch, F., Thornburg, J. E., Paul, B. S.*: Effect of chloramphenicol pretreatment on malathion induced acute toxicity in the rat. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1983, 11: 897-905.
- [21] *Nigg, H. N., Knaak, J. B.*: Blood cholinesterases as human biomarkers of organophosphorus pesticide exposure. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 2000, 163: 29-111.
- [22] *Senger, M. R., Rico, E. P., de Bem Arizi, M., et al.*: Carbofuran and malathion inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicology*, 2005, 212: 107-115.
- [23] *Li, H., Schopfer, L. M., Nachon, F., Fet al.*: Aging pathways for organophosphate-inhibited human butyrylcholinesterase, including novel pathways for isomalathion, resolved by mass spectrometry. *Toxicol. Sci.*, 2007, 100: 136-145.
- [24] *Abass, K., Turpeinen, M., Pelkonen, O.*: An evaluation of the cytochrome P450 inhibition potential of selected pesticides in human hepatic microsomes. *J. Environ. Sci. Health B.*, 2009, 44: 553-563.
- [25] *Buratti, F. M., Leoni, C., Testai, E.*: Foetal and adult human CYP3A isoforms in the bioactivation of organophosphorothionate insecticides. *Toxicol. Lett.*, 2006, 167: 245-255.
- [26] *Boutsiouki, P., Thompson, J. P., Clough, G. F.*: Effects of local blood flow on the percutaneous absorption of the organophosphorus compound malathion: a microdialysis study in man. *Arch. Toxicol.*, 2001, 6: 321-8.
- [27] *Moser, V. C., Simmons, J.E., Gennings, C.*: Neurotoxicological interactions of a five-pesticide mixture in preweanling rats. *Toxicol. Sci.*, 2006, 1: 235-45.
- [28] *Rezg, R., Mornagui, B., El-Arbi, M., et al.*: Effect of subchronic exposure to malathion on glycogen phosphorylase and hexokinase activities in rat liver using native PAGE. *Toxicology*, 2006, 1-2: 9-14.
- [29] *Hakkola, J., Raunio, H., Purkunen, R., et al.*: Detection of cytochrome P450 gene expression in human placenta in first trimester of pregnancy. *Biochem. Pharmacol.*, 1996, 52: 379-383.
- [30] *Hakkola, J., Pasanen, M., Hukkanen, J., et al.*: Expression of xenobiotic metabolizing cytochrome P450 forms in human full-term placenta. *Biochem. Pharmacol.*, 1996, 51: 403-411.
- [31] *Bi`eche, I., Narjoz, C., Asselah, T., et al.*: Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet. Genomics*, 2007, 17: 731-742.
- [32] *Galántai, R., Emódy-Kiss, B., Somosy, Z., et al.*: Does malaoxon play a role in the genotoxic and cytotoxic effects of malathion on human choriocarcinoma cells? *J. Environ. Sci. Health B*, 2011, 47: 1-7.

Rita T. Galántai M.D., Ph.D.,

Z. Somosy M.D.,

Blanka Emódy-Kiss,

Gabriella Bognár M.D.,

Lt.Col. (ret.) Gy. Horváth M.D.,

Zsófia Draskovits-Papp,

Col. (ret.) (eng.) A. Gachályi.

Effect of malathion on placental model cells II.

Gas chromatography and mass spectrometry studies

In the present work we investigated the action mechanism of the cyto- and genotoxic effects of malathion on human choriocarcinoma cells, and we examined the

stability of the pesticide in our experimental system by gas chromatography-mass spectrometry. According to our data, the uptake of malathion occurs in the first hour of the treatment in significant degree. However, in later times malathion is emptied from the dying or dead cells into the medium where the degradation processes of malathion happens depending on the constitution of the media. The examined placental model cells are not capable to convert malathion to its biologically active metabolit, malaaxon. Therefore it is very

plausible that in the case of JAR cells, the parent compound, (i.e. malathion itself) is responsible for the observed *in vitro* cyto- and genotoxic effects [1].

Key-words: choriocarcinoma (JAR) cell line, organophosphates, malathion, malaaxon, gas chromatography-mass spectrometry analysis

Dr. Galántai Rita Tünde Ph.D.

1134 Budapest, Róbert Károly krt. 44.