

TOKSIKOLOGIJA POLICIKLIČKIH AROMATSKIH UGLJIKOVODIKA I
MUTAGENOST ATMOSFERE

A. Alebić-Juretić¹, T. Cvitaš² i L. Klasinc²

Zavod za zaštitu zdravlja, Rijeka¹ i Institut »Ruđer Bošković«, Zagreb²

Primljeno 2. X. 1989.

U radu je dan prikaz toksikoloških osobina policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAU) i njihovih derivata s obzirom na kancerogenost, embriotoksičnost i fototoksičnost. Istaknuta je važnost Amesovog testa te mikrobiološki usmjerene kemijske analize u identifikaciji ovih mutagenih spojeva u uzorcima urbane atmosfere. Kao jedan od mogućih izvora mutagenih derivata PAU navedene su kemijske reakcije koje se mogu odvijati u atmosferi.

Premda će mnogi pomisliti da je problem onečišćenja atmosfere novijeg datuma, može se reći da on datira od otkrića vatre i loženja u zatvorenom prostoru. Prvo se zapisano negodovanje zbog kvalitete zraka može naći već kod Seneka, 61. godine n. e., koji negoduje zbog smrada, dima i čađe u gradu Rimu (1). Osamnaest godina kasnije, 79. godine n. e., prema Tacitovim zapisima, među prvim žrtvama onečišćenog zraka registriran je i Plinije Stariji, admiral rimske flote, koji je umro na plaži nakon udisanja dimova emitiranih erupcijom vulkana Vezuva, ali kako Tacit napominje, on je već prije bolovao od bolesti dišnih putova (2). Ipak, prvim radom iz područja onečišćenja atmosfere smatra se djelo *Jobna Evelyn*a iz 1661. godine: »Fumifugium, or the Inconvenience of the Aer and Smoake of London Dissipated« (3), gdje opisuje stanje u Londonu i čak analizira moguće djelovanje na zdravlje tog »lošeg zraka« te predlaže mjere za poboljšanje kvalitete zraka. Stotinjak godina kasnije, 1775. god., Sir *Percival Pott* (4) daje prva opažanja o kancerogenim osobinama čađe, smatrajući da je upravo izloženost čađi, uz nedovoljnu higijenu, uzrok učestalijoj pojavi raka kod dimnjačara. Nadalje, krajem 19. stoljeća opažena je također veća učestalost raka kože kod radnika zaposlenih u koksnoj industriji i preradi nafte (5).

Dugo se tražilo što je uzrok kancerogenosti katrana kamenog ugljena. Već dvadesetih godina ovog stoljeća japanski su znanstvenici ustanovili da ekstrakti kamenog ugljena nanese na uši zečeva izazivaju tumore, od kojih su neki bili maligni.

God. 1929., nakon sedam godina rada, E. L. Kennaway je uspio sintetizirati prvu kancerogenu tvar – dibenzo(a,h)-antracen (DBA) i njezin 3-metil derivat, no tek su 1933. god. *Hewett i Cook* izolirali iz katrana kamenog ugljena, a zatim neovisno jedan o drugome sintetizirali benzo(a)piren (BaP), za koji su dokazali da je bio traženi kancerogen (5). Dvadesetak godina kasnije, 1952. godine, identificiran je benzo(a)piren u lebdećim česticama sakupljenim na teritoriju Velike Britanije, makar su ispitivanja provedena u Americi četrdesetih godina već pokazala da organski ekstrakti lebdećih čestica sakupljeni u neki gradovima posjeduju kancerogene osobine (6). Ova prva istraživanja vršena su na eksperimentalnim životinjama te su bila dugotrajna i skupa, no otkriće Amesovog testa (7, 8) omogućilo je brži i jeftiniji rad. Uočena povećana kancerogenost organskog ekstrakta u odnosu na količinu policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAU) u lebdećim česticama potakla je na daljnja istraživanja sudbine ovih spojeva u atmosferi, što je osobito važno za bolje sagledavanje njihovog štetnog utjecaja na zdravlje čovjeka.

IZVORI PAU

Policiklički aromatski ugljikovodici (PAU) nastaju nepotpunim izgaranjem fosilnih goriva, osobito ugljena i nafte, mada su u manjoj mjeri prisutni i pri izgaranju svakog organskog materijala. Veliki izvori PAU u atmosferi su termocnergetski objekti (9), koksare i rafinerije nafte (2, 10, 11) te motori s unutarnjim izgaranjem (12, 13, 14). Značajni izvori PAU su također proizvodnja aluminijska (15) te komunalni incineratori (16). Kućna ložišta (17), odnosno izgaranje drva (18) isto tako pridonose emisiji organskih čestica, odnosno PAU (10). Kako emisija PAU potječe iz raznih izvora, nastoje se pronaći indikatori koji bi identificirali dominantan izvor (19, 20).

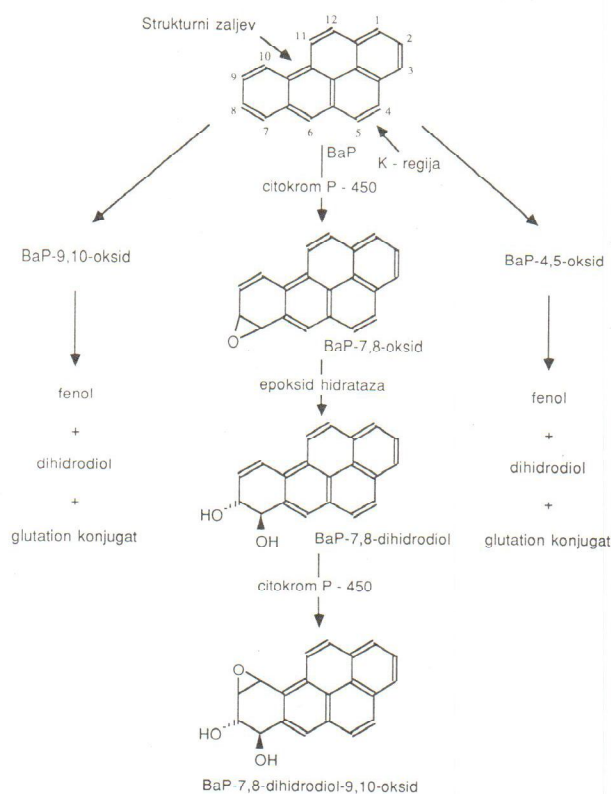
Jednom u atmosferi, PAU i njihovi derivati suhim i mokrim taloženjem dospijevaju na tlo (21), vegetaciju (22, 23), površinske vode npr. jezera (24) i rijeke (25) te mora (26, 27), kamo mogu dospjeti i samim izlivanjem nafte ili direktnim ulijevanjem otpadnih voda koksara ili rafinerija nafte. Kako su PAU slabo topljivi u vodi, adsorbiraju se na čvrste čestice i talože u sediment (28). Za razliku od nekih prirodnih bakterijskih kultura koje mogu u moru razgraditi pojedine PAU i njihove derivate same (29, 30) ili uz prethodnu fotooksidaciju na morskoj površini (31), drugi morski organizmi kao što su školjke, npr. oštrige, akumuliraju PAU iz mora (32, 33) te tako ovi spojevi mogu ući u prehrambeni lanac čovjeka.

BIOLOŠKE OSOBINE

Još tridesetih godina ovog stoljeća dokazane su kancerogene osobine PAU, posebno benzo(a)pirena, međutim tek je nedavno razjašnjen kemizam te pojave.

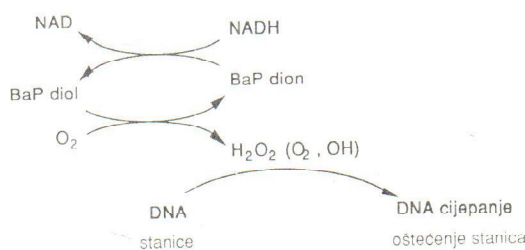
Metabolizam benzo(a)pirena

Premda kemijski relativno stabilan, benzo(a)piren *in vivo* podliježe raznim metaboličkim transformacijama, koje su katalizirane mikrosomskom oksidazom



Slika 1. Metabolizam benzo(a)pirena (34)

miješanih funkcija, uglavnom hidroksilacijama kojima prethodi epoksidni intermedijer (34). U početku se smatralo da su epoksidi tzv. K-regije odgovorni za kancerogenost benzo(a)pirena (i nekih drugih PAU) budući da je taj dio molekule elektronski najreaktivniji (35). Novija ispitivanja su pokazala da je konačni kancerogen epoksid dihidrodiol metabolita BaP, gdje je epoksid u susjedstvu tzv. strukturalnog zaljeva (bay region). Smatra se da ovaj 7,8-dihidroksidiol-9,10-epoksid BaP lakše stvara adukt s deoksiribonukleinskom kiselinom (DNA) negoli bilo koji drugi metabolit istog spoja. Ove su pretpostavke potvrđene kako u bakterijskim testovima tako i u kulturi stanica sisavaca. Pritom je važna i planarnost molekula BaP (kao i mnogih drugih kancerogenih PAU) budući da takva struktura omogućava interkalaciju ugljikovodika u molekulu DNA te olakšava reakciju intermedijera s nukleinskom kiselinom. Zbog važnosti koje vezanje metabolita prokancerogenih tvari na DNA ima na moguće kancerogeno djelovanje pojedinih PAU, Sanders i suradnici (36) razradili su metodu za



Slika 2. Redoks ciklus BaP diol BaP dion (37)

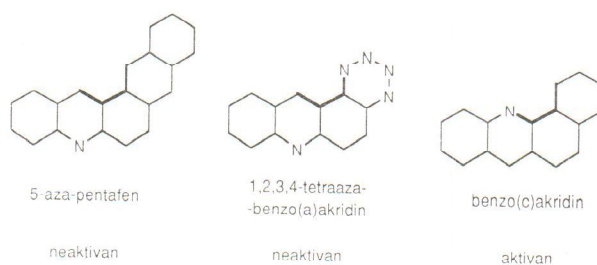
određivanje tako nastalih adukata pomoću fluorescencijske spektrometrije sužavanja linija (Fluorescence Line Narrowing Spectrometry), gdje se kao izvor svjetlosti upotrebljava laser.

Uočena uloga metaboličke aktivacije za mnoge kancerogene tvari dovela je do hipoteze da ovom aktivacijom nastaju elektrofilni intermedijeti koji reaguju s nukleofilnim dijelovima staničnih makromolekula, npr. DNA, i na taj način iniciraju kancerogeni proces. Metaboličkom aktivacijom nastaju i slobodni radikali, koji također imaju važnu ulogu u kemijskoj kancerogenezi. Ovi radikali mogu reagirati na više načina, kao što su autooksidacija, adicija na dvostruku vezu, eliminacija vodika, oksidacija tioetera, sulfohidril i aminoskupina. Promocija raka često se dovodi u vezu s klastogeničnom aktivnosti koja nastaje zbog stvaranja radikala kisika. Metaboličkim transformacijama u reaktivne elektrofile te dione, koji mogu proizvesti aktivni kisik preko redoks-ciklusa diol dion (slika 2), mogu se objasniti osobine BaP da djeluje kao potpun kancerogen, odnosno kao inicijator i promotor u kemijskoj kancerogenezi. BaP dioni uzrokuju cijepanje i inhibiraju sintezu DNA *in vitro* te u niskim koncentracijama djeluju citotoksično na kulturu stanica jetre kunića (37).

Teorija strukturnog zaljeva

Postojanje strukturnog zaljeva (bay region) u molekulama PAU s više od četiri prstena osobito je važno za njihove mutagene, odnosno potencijalno kancerogene osobine. Dihidrodiol epoksidni metabolit s epoksidnom skupinom u susjedstvu strukturnog zaljeva sterički sprečava enzimatsku detoksikaciju epoksidne skupine. Nastali metabolit živi dovoljno dugo da reagira s gvaninom i stvara adukt s molekulom DNA.

Kao i svako pravilo, i ovo ima iznimaka. Neki PAU i pored posjedovanja strukturnog zaljeva ne pokazuju kancerogene osobine (slika 3). Razlog tome mogu biti sterički faktori, zbog kojih ne može doći do aktivacije strukturnog zaljeva, ili nastali dihidrodiol epoksid ne živi dovoljno dugo da reagira s DNA. S druge strane, benzenoidni ugljikovodici bez strukturnog zaljeva također mogu inicirati kancerogenezu, no tada vjerojatno ide preko mehanizma što uključuje slobodne radikale. Teorija strukturnog zaljeva može se primijeniti i na supstituirane benzenoidne ugljikovodike (PAU), ako



Slika 3. Teorija strukturnog zaljeva – primjeri aktivnih i neaktivnih struktura (38)

supstituenti ne blokiraju metaboličku transformaciju kojom nastaje aktivni dihidrodiolepoksid, odnosno supstituenti ne smiju zauzimati četiri položaja na krajnjem benzenskom prstenu u susjedstvu strukturnog zaljeva (38).

Istodobno djelovanje BaP i drugih tvari

Kancerogene osobine BaP mogu biti pojačane ili oslabljene nekim drugim činiocima. Tako, naprimjer, adsorpcija na prirodna azbestna vlakna potencira prirodne kancerogene osobine, vjerojatno zato što djeluju epigenetski i olakšavaju ulazak čestica u stanicu (39). S druge strane, inhalacija amonijeva sulfata kod eksperimentalnih životinja umanjuje na određeno vrijeme kancerogene osobine BaP (40). Premda su eksperimenti provedeni na miševima sedamdesetih godina dokazali sinergističko djelovanje BaP i SO₂ na indukciju raka respiratornih organa (41), rezultati novijih istraživanja to opovrgavaju. Ispitivanja na miševima isključila su etiološku ulogu kako inhaliranog SO₂ tako i u organizmu endogeno nastalih sulfita (sulfit/bisulfid iona) na indukciju raka rožnatih stanica u respiratornom traktu. U ovim eksperimentima primijenjene doze BaP, SO₂ i sulfita bile su mnogo više od onih koje se mogu naći i u radnoj sredini (42). Ispitivanja kod lubina su nadalje pokazala da istodobno davanje BaP i kadmija inhibira mikrosomski sistem jetre, odnosno smanjuje aktivnost BaP monooksigenaze (hidroksilaze) te je dvojbeno praćenje aktivnosti ovog enzima kao mjere izloženosti genotoksičnim tvarima (43).

Embriotoksičnost PAU

Embriionalni stupanj razvoja utječe na ishod izloženosti embrija toksičnim tvarima. Kocan i Landolt su embrijske stanice pastrve izlagali BaP obilježenom s ¹⁴C prvog, petnaestog i dvadeset petog dana nakon fertilizacije. Našli su da su embriji izloženi prije blastogeneze izlučili svega 2–3% početne koncentracije BaP u jajetu, dok su oni izloženi kasnije izlučili 15–30%. Ovi podaci mogu objasniti razliku u neoplastičnom rastu koja je uočena kad su embrioni pastrve izlagani kancerogenim tvarima u različito vrijeme razvoja.

Ispitivanje toksičnosti organskih ekstrakata lebdećih čestica, odnosno svake od 9 izdvojenih frakcija, na embrije pilića je pokazalo da je najaktivnija frakcija bila ona što je

sadržavala koronen, a zatim slijede frakcije s benzofluorantenima i BaP kao glavnim komponentama (45).

Fototoksičnost

Laboratorijska ispitivanja su pokazala da PAU imaju fototoksične osobine. Tako je nađeno da su BaP, benzo(a)antracen (BaA) i antracen (Ant) uz metabolite BaP fototoksični za zelene alge *Selenastrum capricoruntum* kod svjetlosti valne duljine ispod 550 nm (46).

Kagan i suradnici (47) su našli da su, inače nekancerogeni PAU: antracen, fluoranten (Flo) i piren (Py) fototoksični za razne vodene organizme i ribe. Fototoksičnost PAU na ličinke klena ispitivali su *Oris i suradnici* (48), koji su pored već spomenutih Ant, Flo, BaA i BaP našli da takve osobine posjeduju i benzantron (BAnt) i akridin (Ac). Pritom su uočili da PAU s kratkim životom fosforescencije pokazuju jače fototoksične osobine. S obzirom na to da PAU nastaju procesima izgaranja, čije su emisije dimnih plinova odgovorne za nastajanje kiselih kiša, a time i zakiseljavanje jezera u sjevernim krajevima Evrope i Sjeverne Amerike, ovo saznanje ima osobitu važnost za okoliš.

Metabolizam supstituiranih PAU

Za metabolizam supstituiranih PAU bitan je položaj i priroda supstituenta. Tako su *Möller i Thorgeirsson* (49) dokazali da 1-nitropiren izaziva *in vitro* oštećenje DNA u hepatocitima miša i stanicama hepatoma štakora, dok dinitro-, trinitro- i tetranitro-derivati ne pokazuju takve osobine. Ovi rezultati upućuju na steričku specifičnost u metaboličkoj aktivaciji nitropirena. Pokusi su također pokazali da čovječja crijevna flora metabolizira 1-nitropiren u 1-aminopiren i N-formil-aminopiren, koji nisu toksični (50).

Povećana aktivnost direktnog mutagena 6-nitro-BaP nakon dodatka homogenatu jetre štakora S9 *in vitro* potakla je na daljnje ispitivanje metabolizma ovog spoja. Utvrđeno je da metabolizmom dolazi do denitrifikacije pri čemu nastaje BaP koji je jači kancerogen, i dalje slijedi svoj metabolički put, te 6-acetoksi-BaP za koji se pretpostavilo da nastaje acetiliranjem 6-hidroksi-BaP (51). Izvor acetilirajućeg agensa bio je vjerojatno citosol, aktivnost kojega nije potpuno uklonjena ispiranjem preparata mikrosoma (52). Metabolizam istog spoja praćen je i kod gljiva. Rezultati su pokazali da gljiva *Cunninghamella elegans* prevodi taj spoj u sulfat i glukozid 1- i 3-hidroksi-6-nitro-BaP te je to ujedno i put detoksifikacije. Nitroskupina u položaju 6 blokira metabolizam na peri-položaju prema supstituentu (C7 i C8) i pojačava metabolizam na C1 i C3. Prema autorima (53), sličan je rezultat dobiven i promatranjem metabolizma sisavaca.

Ispitivanjem *in vivo* i *in vitro* metabolizma 5- i 6-metil krizena, jakog, odnosno slabog kancerogena, kod eksperimentalnih životinja (miševa i štakora) utvrdilo se da razlika ne potječe od različite brzine formiranja i daljnje razgradnje njihovih metabolita 1,2-dihidrodiola već zbog veće reaktivnosti dihidroepoksida 5-metil krizena, što je posljedica postojanja metilne i epoksidne skupine na istom strukturnom zaljevu (54).

Chou i Fu (55) su promatrali *in vitro* metabolizam 8- i 9-fluor-BaP uz dodatak jetre štakora te su odredili apsolutne konfiguracije dobivenih metabolita. Prisutnost 4,5-dihidrodiola dokazala je da oksidacija teče na K-regiji preko 4,5-epoksida kojem se i pripisuje opažena mutagenost 8- i 9-fluor-BaP.

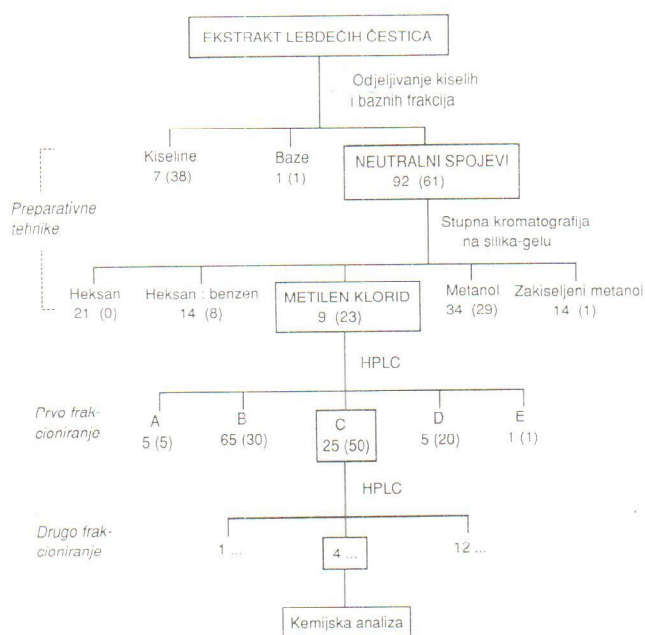
Indukcija oksidaze miješanih funkcija

Ispitivanje metabolizma PAU, u prvom redu BaP vrši se u kulturi stanica eksperimentalnih životinja (štakori, miševi), no često se koriste i ribe metabolizam kojih može biti sličan (56, 57), ali i različit od onog u sisavaca (58). Kako je za metabolizam PAU nužna indukcija oksidaze miješanih funkcija, odnosno BaP monooksigenaza za metabolizam BaP, aktivnost ovog enzima može poslužiti kao indikator izloženosti genotoksičnim tvarima (59, 60, 61) kako u laboratorijskim uvjetima tako i u prirodnoj sredini, mad *Fair* svojim opažanjima dovodi u sumnju vjerodostojnost ovog sistema u prisutnosti kadmija. U novije vrijeme razvijeni su i brži testovi kojima se može utvrditi oštećenje DNA i prije negoli dođe do indukcije BaP monooksigenaze (62).

Ispitivanje mutagenosti PAU Amesovim testom

Jedan od glavnih zadataka istraživanja u ekologiji i medicinskim znanostima je identifikacija kemijskih spojeva koji štetno djeluju na okolinu pa i zdravlje čovjeka. Među takve zadatke spada istraživanje kancerogenog djelovanja nekih kemijskih tvari. Borba protiv raka obuhvaća i njihovu identifikaciju u okolišu. Već šezdesetih godina se znalo da tvari prisutne u okolišu (npr. lebdeće čestice i pušcnje) uzrokuju rak u eksperimentalnih životinja, no nije se znalo koji od stotina prisutnih spojeva posjeduju kancerogene osobine. Razvoj brzih mikrobioloških testova, osobito Amesovog testa, omogućio je identifikaciju spojeva s izrazitim mutagenim osobinama u kompleksnim uzorcima okoliša kao što su lebdeće čestice urbane atmosfere ili ispušni plinovi motora s unutarnjim izgaranjem (7, 63, 64).

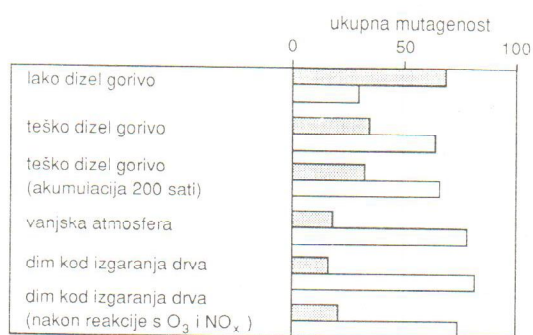
Organski ekstrakti čvrstih čestica (bilo vanjske atmosfere ili ispuha dizel-motora) sadrže na stotine kemijskih spojeva, od kojih je mali broj identificiran kao izrazito kancerogene tvari. Prema *Fitzu i suradnicima* (65), proba na mutagenost lebdećih čestica sakupljenih filtracijom velikih volumena zraka može se smatrati vjerodostojnim pokazateljem njihove biološke aktivnosti. Spojevi prisutni gotovo u svim uzorcima okoliša, pa i lebdećim česticama, sa značajnim biološkim djelovanjem su PAU, no njima se mogao pripisati samo manji dio opažene mutagenosti, dok su za preostalu, direktnu mutagenost odgovorni derivati PAU (66). Lebdeće čestice vanjske atmosfere sadrže više komponenata nego bilo koji drugi uzorak okoliša (64) te je identifikacija mutagenih tvari teža negoli kod ispušnih plinova dizel-motora. Mada se sam postupak nešto razlikuje kad se radi o uzorcima urbanih lebdećih čestica ili ispuhu dizel-motora, princip ovakve mikrobiološki usmjerene kemijske analize je višestruko uzastopno frakcioniranje, najčešće pomoću HPLC uz odgovarajuća punila i otapala različite polarnosti, pri čemu se svaka odijeljena frakcija ispituje na mutagenost. Daljnjoj kemijskoj analizi podliježu frakcije koje pokazuju najizrazitije mutagene osobine (slika



Slika 4. Biološki usmjerena kemijska analiza (64)

4). Na taj način identificirani su neki od spojeva s direktnim mutagenim djelovanjem u umjereno polarnoj i polarnoj frakciji ekstrakta lebdećih čestica.

Ovakvom analizom utvrđeno je da se 50% direktne mutagenosti u frakciji umjerene polarnosti može pripisati prisutnosti sedam nitroderivata PAU kod ispuha lakog dizel-goriva. U polarnoj frakciji, koja daje 65% ukupne mutagenosti kako kod ispuha dizel-motora (slika 5) tako i kod urbanih lebdećih čestica, identificirani su među ostalim hidroksi i hidrosinitro PAU (63). Smatra se da ovi spojevi nastaju adicijom OH radikala na PAU u ispušnim plinovima, procesima izgaranja i fotokemijskom smogu. Drugi mogući mehanizam je adicija OH radikala na PAU radikal. Adicija aktivirajuće skupine kao što je OH na PAU pojačat će reaktivnost prstena prema daljnjim reakcijama, uključujući i nitriranje. Ovim postupkom *Matsumoto i Inoue* (67) su analizirali umjereno polarni dio neutralne frakcije lebdećih čestica, koja pokazuje najveću mutagenost uz metaboličku aktivaciju. Pritom su identificirali PAU, njihove oksiderivate (ketone, kinone, kumarine i aldehide) te azaarene. Istim postupkom, ali uz direktnu upotrebu Amesovog testa na ploče za tankoslojnu kromatografiju (68), *Butler i suradnici* (69) analizirali su organske ekstrakte lebdećih čestica sakupljenih u nekoliko gradova (New York, Philadelphia, Elisabeth, Mexico City, Beijing). Najveća razlika u direktnoj mutagenosti pokazala se u potfrakciji umjerene polarnosti. Tome je vjerojatno uzrok upotreba različitog goriva, različiti izvori te meteorološke prilike.



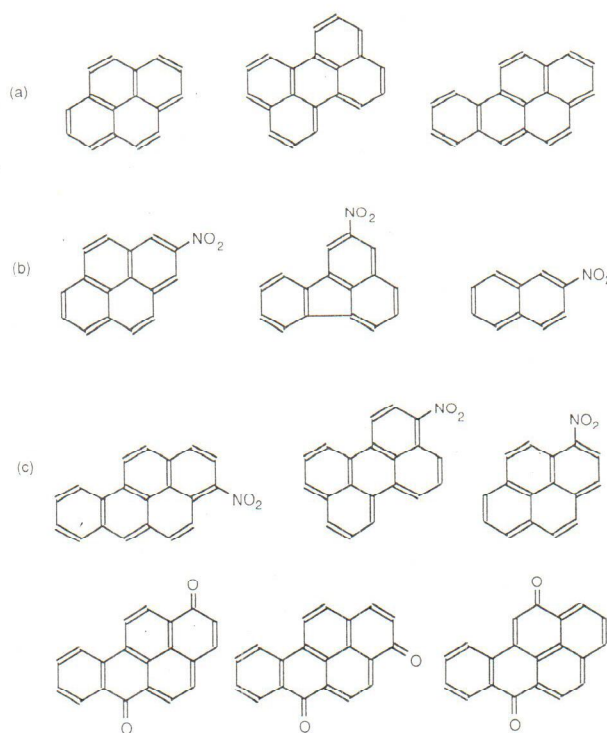
Slika 5. Raspodjela mutagenosti (direktna, prema TA 98) između umjereno polarne (sivi pravokutnik) i polarne frakcije (bijeli pravokutnik) organskog ekstrakta čvrstih čestica (64).

Möller i suradnici (70) su testirali na mutagenost PAU, za koje se zna da su prisutni u lebdećim česticama urbanih sredina i ispušnim plinovima automobila te su našli da najveću direktnu mutagenost prema soju TA 98 *Salmonelle typhimurium* pokazuje nitro-1-hidroksipiren, dok su oksidirani derivati PAU tek nakon dodatka frakcije homogenata jetre S9 pokazivali slabu mutagenost. Sakai i suradnici (71) su testirali PAU i kinone na mutagenost novim sojem *Salmonelle* TA 97, koja je osjetljiva na mutacije izazvane pomakom faze, no i u ovom slučaju bilo je potrebno dodati homogenat jetre S9.

Reakcije PAU u atmosferi kao mogući izvori mutagenosti

Jedan od mogućih izvora mutagenih derivata PAU su i kemijske reakcije koje se mogu odvijati u atmosferi, kao što su nitriranje, fotooksidacija, ozonoliza, reakcija s OH radikalima te singletnim kisikom. Praćenjem reakcija fotooksidacije u simuliranim atmosferskim uvjetima uočeno je da brzina razgradnje ovisi kako o strukturi PAU tako i o čvrstom nosaču na koji su PAU adsorbirani (72). Pritom metalni oksidi koji imaju osobine poluvodiča osobito ubrzavaju reakcije fotorazgradnje (73). Produkti takve razgradnje su odgovarajući kinoni (74, 66) koji su se pokazali kao slabi direktni mutageni u Amesovom testu (71).

Nitriranje PAU u atmosferi može se odvijati u plinovitoj i/ili čvrstoj fazi kada su adsorbirani na čvrste čestice (75). Nitriranje adsorbiranih PAU može se vršiti elektrofilnom supstitucijom s NO_x uz tragove HNO₃ koja katalizira reakciju, a u tom smislu mogu djelovati i lebdeće čestice koje pokazuju kisele osobine, sulfati naprimjer (76). Međutim, za ovu reakciju pretpostavlja se da je vrlo spora (75). Prema novijim rezultatima, veću ulogu u stvaranju nitroderivata PAU imaju reakcije NO_x s plinovitim PAU (naftalen, te dijelom fluoranten i piren), bilo u reakcijama s N₂O₅ (76,77) ili u reakcijama s NO_x iniciranim napadom OH radikala (78). Sličnim mehanizmom, uz participaciju nepoznatog radikala X adsorbiranog na aerosolu, može nastati 2-nitropiren u zimskim uvjetima kada je koncentracija OH radikala u zraku zanemarivo malena (79).



Slika 6. (a) Policiklički aromatski ugljikovodici i njihovi derivati koji pokazuju direktne mutagene osobine, a nastaju (b) reakcijama u plinskoj fazi (75) ili (c) heterogenim reakcijama PAU adsorbiranih na čvrste čestice (66, 75).

Produkti ovih reakcija su 2-nitroderivati naftalena (plinovit), pirena i fluorantena (adsorbirani na čvrste čestice) izrazite mutagenosti u bakterijskim testovima. Dok je 2-nitronaftalen, najširi nitroderivat naftalena u atmosferi (80) slab direktni mutagen u Amesovom testu prema soju TA 98, intraperitonealnim davanjem štakorima pokazalo se da *in vivo* dolazi do njegove redukcije u odgovarajući 2-aminonaftalen (81) koji je humani kancerogen.

Praćenjem reakcija PAU s ozonom u simuliranim atmosferskim uvjetima pokazalo se da ozonoliza može biti jedan od izvora mutagenih derivata PAU u atmosferi. Ovim načinom mogu nastati 1,6-, 3,6- i 6,12- BaP kinoni, koji su slabi direktni mutageni u Amesovom testu (66). Rezultati praćenja reakcije PAU adsorbiranih na silikagel ozonom (82) pokazuju da ovaj način razgradnje može biti jedan od važnijih putova uklanjanja PAU iz atmosfere, to više što prema poznatim podacima iz literature neki PAU (kao Py) lakše reagiraju s O_3 nego što podliježu fotorazgradnji (83). Reakciju razgradnje s O_3 pospješuje kisela površina čvrstog nosača, silikagela (82), činjenica važna

stoga što zračne mase koje sudjeluju u daljinskom transportu sadrže znatne količine kiselih aerosola sulfata (76) koje bi mogle djelovati na isti način. Primarni produkti razgradnje PAU ozonom (npr. kinoni) imaju udjela u uočenoj direktnoj mutagenosti umjereno polarne frakcije urbanih lebdećih čestica (66), što ima određenu važnost za javno zdravlje u procjeni mutagenosti atmosferskih aerosola. Međutim, može se očekivati da će primarni produkti razgradnje ozonom u atmosferi biti podložni daljnjim reakcijama s drugim polutantima (NO₂, OH, fotooksidaciji) dajući polarne intermedijere (hidroksi- i hidroksinitroderivate) izrazite mutagenosti (64) o stabilnosti kojih se u atmosferi danas malo zna, a koji imaju velikog udjela u ukupnoj mutagenosti urbanih lebdećih čestica (63).

LITERATURA

1. Stern AC. Fundamentals of Air Pollution. Second Edition, New York: Academic Press, 1984:3.
2. Suess MJ. Ambient Air Pollutants from Industrial Sources. A Reference Handbook, WHO, Regional Office for Europe, Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York, 1985, str 270.
3. Evelyn J. Fumifugium or the Inconvenience of the Aer and Smoake of London Dissipated Together with Some Remedies humbly proposed by J. E. Esq To His Sacred Majesty and to the Parliament now Assembled, London, 1661, Reprint: Manchester: National Smoke Abatement Society, 1933.
4. Pott P. Chirurgical Observations. London: Hawkes, Clarke and Collins, 1775:63.
5. Phillips DH. Fifty Years of Benzo(a)Pyrene. Nature 1983;303:468.
6. Pitts JN, Jr. On the Trail of Atmospheric Mutagens and Carcinogens: A Combined Chemical/Microbiological Approach. Amer Zool, 1985;25:415.
7. Ames BN, Duston WE, Yamasaki E, Lee DF. Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. PNAS, 1973;70:2281.
8. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity. Mutat Res 1975;31:347.
9. Haugen DA, Stamoudis VC. Isolation and Identification of Mutagenic Aromatic Hydrocarbons from a Coal Gasifier Condensate. Environ Res 1986;41:400.
10. Seinfeld JH. Atmospheric Chemistry and Physics of Air Pollution. New York: John Wiley and Sons, 1986:32.
11. Karlesky DL, Ramelow G, Veno Y, Warner IM, Ho Cb-N. Survey of Polynuclear Aromatic Compounds in Oil Refining Areas. Environ Pollut 1987;43:195.
12. Boyer KW, Laitinen HA. Automobile Exhaust Particulates. Environ Sci Technol 1975;9:457.
13. Schuetzle D. Sampling of Vehicle Emissions for Chemical Analysis and Biological Testing. Environ Health Persp 1983;47:65.
14. Schuetzle D, Frazier JA. Factor Influencing the Emission of Vapour and Particulate Phase Components from Diesel Engines. U: Proceedings of the International Symposium on Toxicological Effects of Emissions from Diesel Engines, Tsukuba Science City: 1986.
15. Thrane KE. Ambient Air Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Fluorides, Suspended Particles and Particulate Carbon in Areas near Aluminium Production Plants. Atmos Environ 1987;21:617.

16. *Oebme M, Mano S, Mikalsen A.* Formation and Presence of Polyhalogenated and Polycyclic Compounds in the Emissions of Small and Large Municipal Waste Incinerators. *Chemosphere* 1987;16:143.
17. *Schmidt W, Grinner G, Jacob J, Dettbarn G.* Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Thiarenes in the Emission from Hard-Coal Combustion. *Toxicol Environ Chem* 1986;13:1.
18. *Murphy DJ, Buchan RM, Fox DG.* Ambient Particulate and Benzo(a)pyrene Concentrations from Residential Wood Combustion in a Mountain Community. U: M. Cooke, A.J. Dennis, G.L. Fisher ur.: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Physical and Biological Chemistry, Battele Press, Columbus – Richard and Springer Verlag, New York-Heidelberg-Berlin, 1982, str.567.
19. *Valerio F, Antolini E, Lazzarotto A.* A Model to Evaluate Half-Lives of PAHs Naturally Occurring on Airborne Particulates. *Intern J Environ Anal Chem* 1987;28:185.
20. *Edgerton SA, Kbalil MAK, Rasmussen RA.* Diurnal Variations in Residential Woodburning Pollution in Portland, Oregon. *Chemosphere* 1987;16:155.
21. *Metzner E.* Annual Rates of Deposition of PAH in Different Forest Ecosystems: Water, Air and Soil Pollution 1984;21:425.
22. *Thomas W.* Monitoring Organic and Inorganic Trace Substances by Epiphytic Mosses – A Regional Pattern of Air Pollution, Trace Substances in Environmental Health XIII (A Symposium), D.D. Hemphill Ed, 1979.
23. *Thomas W.* Statistical Models for the Accumulation of PAH, Chlorinated Hydrocarbons and Trace Metals in Epiphytic *Hypnum cupressiforme*. *Water, Air & Soil Pollut* 1984;22:351.
24. *Frank AP, Landrum PF, Eadie BJ.* Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Rates of Uptake, Depuration and Biotransformation by Lake Michigan *Stylodrilus heringianus*. *Chemosphere* 1986;15:317.
25. *Kezić N, Britvić S, Protić M et al.* Activity of Benzo(a)Pyrene Monooxygenase in Fish from the Sava River, Yugoslavia: Correlation with Pollution. *Sci Total Environ* 1983;27:59.
26. *Sieben B, Bihari N, Kurelec B, Zahn RK.* Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Levels in Waters and Sponges of the Northern Adriatic. *Rapp Comm Int Mer Medit* 1983;28:133.
27. *Britvić S, Protić M, Zahn RK, Kurelec B.* Detection of Xenobiotics in the Northern Adriatic Waters by Estimating Their Biochemical Effects in Fish. *Rapp Comm Int Mer Medit* 1983;28:137.
28. *Martell L, Gagnon MJ, Masse R, Leclerc A, Tremblay L.* Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments from the Šanguenay Fjord, Canada. *Bull Environ Contam Toxicol* 1986;37:133.
29. *Bayona JM, Albagies J, Solanas AM, Pares R, Garrigues P, Ewald M.* Selective Aerobic Degradation of Methyl-Substituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Petroleum by Pure Microbial Cultures. *Intern J Environ Anal Chem* 1986;23:289.
30. *Solanas AM, Peres R, Bayona JM, Albagies J.* Degradation of Aromatic Petroleum Hydrocarbons by Pure Microbial Cultures. *Chemosphere* 1985;13:593.
31. *Rontani JF, Rambeloarboa E, Bertrand JC.* Favourable Interaction between Photooxidation and Bacterial Degradation of Anthracene in Sea Water. *Chemosphere* 1985;14:1909.
32. *Kagi R, Alexander R, Cumbers M.* Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Rock Oysters: A Baseline Study. *Intern J Environ Anal Chem* 1985;22:135.
33. *Pittinger CA, Buikema AL, Falkinham JO.* In Situ Variations of Oyster Mutagenicity and Tissue Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ Toxicol Chem* 1987;6:51.
34. *Timbrell JA.* Principles of Biochemical Toxicology. London: Taylor and Francis, 1982:180.
35. *Ames BN, Sims P, Grover PL.* Epoxides of Carcinogenic Polycyclic Hydrocarbons are Frameshift Mutagens. *Science* 1972;175:47.
36. *Sanders MJ, Cooper RS, Jankowiak R, Small GJ, Heisig V, Jeffrey AM.* Identification of

- Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Metabolites of DNA Adducts in Mixtures Using Fluorescence Line Narrowing Spectrometry. *Anal Chem* 1986;58:816.
37. Lesko SA, Lorentzen RJ. Benzo(alpha)Pyrene Dione Benzo(alpha)Pyrene Diol Oxidation Reduction Couples – Involvement in DNA Damage, Cellular Toxicity and Carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health* 1985;16:679.
 38. Knop JV, Muller WR, Szymanski K, Trinajstić N. Computer Generation of Certain Classes of Molecules, SKTH, Kemija u Industriji, Zagreb, 1985.
 39. Menard H, Noel L, Kborami J, Jouve JL, Dunnigan J. The Adsorption of Polyaromatic Hydrocarbons on Natural and Chemically Modified Asbestos Fibers. *Environ Res* 1986;40:84.
 40. Godleski JJ, Melnicoff MJ, Sadri S, Garbeil P. Effects of Inhaled Ammonium Sulfate on Benzo(a)Pyrene Carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health* 1984;14:225.
 41. Laskin S, Kuschner M, Sellakumar A, Katz GU. Combined Carcinogen-Initiated Animal Inhalation Studies. U: Aharonson EF, Ben-David A, Klinberg MA ur: *Air Pollution and Lungs*, Willey N.Y. 1976, str. 190
 42. Gunnison AF, Sellakumar A, Snyder EA, Currie D. The Effect of Inhaled Sulphur Dioxide and Systemic Sulfite on the Induction of Lung Carcinoma in Rats by Benzo(a)Pyrene. *Environ Res* 1988;46:59.
 43. Fair PH. Interaction of Benzo(a)Pyrene and Cadmium on GSH-S-Transferaze and Benzo(a)Pyrene Hydroxylase in Black Sea Bass *Centropristis striata*. *Arch Environ Contam Toxicol* 1986;15:257.
 44. Kocan RM, Landolt ML. Uptake and Excretion of Benzo(a)Pyrene by Trout Embryos and Sac Fry. *Marine Environ Res* 1984;14:433.
 45. Matsumoto H, Kashimoto T. Embryotoxicity of Organic Extracts from Airborne Particulates in Ambient Air in the Chicken Embryo. *Arch Environ Contam Toxicol* 1986;15:447.
 46. Cody TE, Radike MJ, Warsbawsky D. The Phototoxicity of Benzo(a)Pyrene in the Green-Alga *Selenastrum capricornutum*. *Environ Res* 1984;35:122.
 47. Kagan J, Kagan ED, Kagan IA, Kagan PA, Quigley S. The Phototoxicity of Non-Carcinogenic Aromatic Hydrocarbons in Aquatic Organisms. *Chemosphere* 1985;14:1829.
 48. Oris JT, Giesy JP, Jr. The Photo Induced Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Larvae of the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Chemosphere* 1987;16:1395.
 49. Moller ME, Thorgeirsson SS. DNA Damage Induced by Nitropyrenes in Primary Mouse Hepatocytes and in Rat H4-II-E Hepatoma Cells. *Mutation Res* 1985;151:137.
 50. Manning BW, Cerniglia CE, Federle TW. Biotransformation of 1-Nitropyrene to 1-Aminopyrene and N-Formyl-1-Aminopyrene by the Human Intestinal Microbiota. *J Toxicol Environ Health* 1986;18:339.
 51. Raba C, Hart-Anstey M, Cheung M-S, Bresnick E. 6-Nitrobenzo(a)Pyrene Can Be Denitrated during Mammalian Metabolism. *J Toxicol Environ Health* 1986;19:55.
 52. Raba C, Hart-Anstey M, Bresnick E. High-Pressure Liquid Chromatographic Separation of 6-Acetoxybenzo(a)Pyrene from *In Vitro* Incubation of 6-Nitrobenzo(a)Pyrene. *J Liq Chromatogr* 1986;9:2945.
 53. Millner GC, Fu PP, Cerniglia CE. Microbial Transformation of 6-Nitrobenzo(a)Pyrene. *J Toxicol Environ Health* 1986;19:519.
 54. Amin S, Huie K, Melikian AA, Leszczynska JM, Hecht SS. Comparative Metabolic Activation in Mouse Skin of the Weak Carcinogen 6-Methylchrysene and the Strong Carcinogen 5-Methylchrysene. *Cancer Res* 1985;45:6406.
 55. Chou MW, Fu PP. Stereoselective Metabolism of 8- and 9-Fluorobenzo(a)Pyrene by Rat Liver Microsomes: Absolute Configurations of Trans-Dihydriol Metabolites. *J Toxicol Environ Health* 1984;14:211.

56. Abokas JT, Pelkonen O. Metabolic Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fish Liver Cytochrome P-450. *Marine Environ Res* 1984;14:59.
57. Protić-Sabljić M, Kurelec B. High Mutagenic Potency of Several Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Induced by Liver Postmitochondrial Fractions and Xenobiotic Treated Immature Carp. *Mutation Res* 1983;118:177.
58. Hofer EV, Puffer HW. *In Vitro* Metabolism and *In Vivo* Binding of Benzo(a)Pyrene in the California Killfish (*Fundulus parvipinnis*) and Speckled Sanddab (*Citarichtys stigmaticeus*). *Arch Environ Contam Toxicol* 1986;15:251.
59. Rijavec M, Britvić S, Protić M, Kurelec B. Detection of the Presence of Xenobiotics in Seawater Samples from Rijeka Bay Applying Benzo(a)Pyrene Monooxygenase Induction. *Thalassia Jugosl* 1981;17:245.
60. Kurelec B, Kezić N, Singh H, Zahn RK. Mixed Function Oxidases in Fish: Their Role in Adaptation to Pollution. *Marine Environ Res* 1984;14:409.
61. Griffin GD, Egan BZ, Lee NE, Burtis CA. Induction of Mixed-Function Oxidase Activity in Mouse Lymphoid Tissues by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J Toxicol Environ Health* 1986;19:185.
62. Zahn RK, Hohn-Bentz J, Kurelec B. Fast, Transient DNA Damage by Benzo(a)Pyrene. *Marine Environ Res* 1984;14:538.
63. Schuetzle D, Jensen TE, Ball JC. Polar Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Derivatives in Extracts of Particulates: Biological Characterization and Techniques for Chemical Analysis. *Environ Int* 1985;11:169.
64. Schuetzle D, Lewtas J. Bioassay – Directed Chemical Analysis in Environmental Research. *Anal Chem* 1986;58:1060.
65. Fitz DR, Lokensgard DM, Doyle GJ. Investigation on Filtration Artifacts when Sampling Ambient Particulate Matter for Mutagen Assay. *Atmos Environ* 1984;18:205.
66. Pitts JN, Van Cauwenberghe KA, Grosjean D, Schmid JP, Fitz DR, Belser WL, Knudson GB, Hyndsi PM. Atmospheric Reactions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Facile Formation of Mutagenic Nitro Derivatives. *Science* 1978;202:515.
67. Matsumoto H, Inoue K. Mutagenicity of Polar Portion in the Neutral Fraction Separated from Organic Extracts of Airborne Particulate. *Arch Environ Contam Toxicol* 1987;16:409.
68. Bjorseth A, Eidsa G, Gether J, Landmark L, Moller M. Detection of Mutagens in Complex Samples by the Salmonella Assay Applied Directly on Thin-Layer Chromatography Plates. *Science* 1982;215:87.
69. Butler JP, Kneip TJ, Daisey JM. An Investigation of Interurban Variations in the Chemical Composition and Mutagenic Activity of Airborne Particulate Organic Matter Using an Integrated Chemical Class / Bioassay System. *Atmos Environ* 1987;21:883.
70. Moeller M, Hagen I, Ramdahl T. Mutagenicity of Polycyclic Aromatic Compounds (PAC) Identified in Source Emissions and Ambient Air. *Mutation Res* 1985;157:149.
71. Sakai M, Yoshida D, Mizusaki S. Mutagenicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Quinones on *Salmonella typhimurium* TA 97. *Mutation Res* 1985;156:61.
72. Žorž M. Fotokemijska razgradnja policikličkih aromatskih ugljikovodika na krutim česticama (Disertacija). Tehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 1983.
73. Gusten H. Photocatalytic Degradation of Atmospheric Pollutants on the Surface of Metal Oxides, NATO ASI Series, Vol G.6; Chemistry of Multiphase Atmospheric Systems, W. Jeaschke, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 1986, str.567.
74. Fox MA, Olive S. Photooxidation of Anthracene on Atmospheric Particulate Matter. *Science* 1979;205:582.
75. Pitts JN. Nitration of Gaseous Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Simulated and Ambient Urban Atmospheres: A Source of Mutagenic Nitroarenes. *Atmos Environ* 1987;12:2531.

76. Brorström E, Grenfelt P, Lindskog A. The Effect of Nitrogen Dioxide and Ozone on the Decomposition of Particle-Associated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons during Sampling from the Atmosphere. *Atmos Environ* 1983;17:601.
77. Pitts JN, Atkinson R, Sweetman JA, Zielinska B. The Gas-Phase Reaction of Naphthalenes with N_2O_5 to Form Nitronaphthalenes. *Atmos Environ* 1985;19:701.
78. Pitts JN, Sweetman JA, Zielinska B, Winer AM, Atkinson R. Determination of 2-Nitrofluoranthene in Ambient Particulate Organic Matter: Evidence for Atmospheric Reactions. *Atmos Environ* 1985;19:1601.
79. Arey J, Zielinska B, Atkinson R, Winer AM, Ramdahl T, Pitts JN. The Formation of Nitro-PAH from Gas-Phase Reactions of Fluoranthene and Pyrene with the OH Radical in the Presence of NO_x . *Atmos Environ* 1986;20:2339.
80. Nielsen T, Ramdahl T. Determination of 2-Nitrofluoranthene and 2-Nitropyrene in Ambient Particulate Matter: Evidence for Atmospheric Reactions. *Atmos Environ* 1987;20:1507.
81. Pitts JN, Lokensgard DM, Ripley DS et al. Atmospheric Epoxidation of Benzo(a)Pyrene by Ozone: Formation of the Metabolite Bezo(a)Pyrene-4,5-Oxide. *Science* 1980;220:1347.
82. Alebić Juretić A. Heterogena razgradnja nekih policikličkih aromatskih ugljikovodika ozonom na površinama čestica (Disertacija). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, 1988.
83. Cope VW, Kalkwarf DR. Photooxidation of Selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Pyrenequinones Coated on Glass Surfaces. *Environ Sci Technol* 1987;21:643.

Summary

TOXICOLOGY OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS AND MUTAGENICITY OF AMBIENT AIR

Toxicological properties of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) and their derivatives concerning their carcinogenicity, embryotoxicity and phototoxicity are reviewed. The importance of the Ames test and biologically directed chemical analysis for identification of these mutagenic compounds is emphasized. Possible chemical reactions acting as sources of mutagenic PAH derivatives in the atmosphere are given.

Institute of Public Health Rijeka and Ruđer Bošković Institute, Zagreb