



Genotoxicita

Testy na detekci mutací

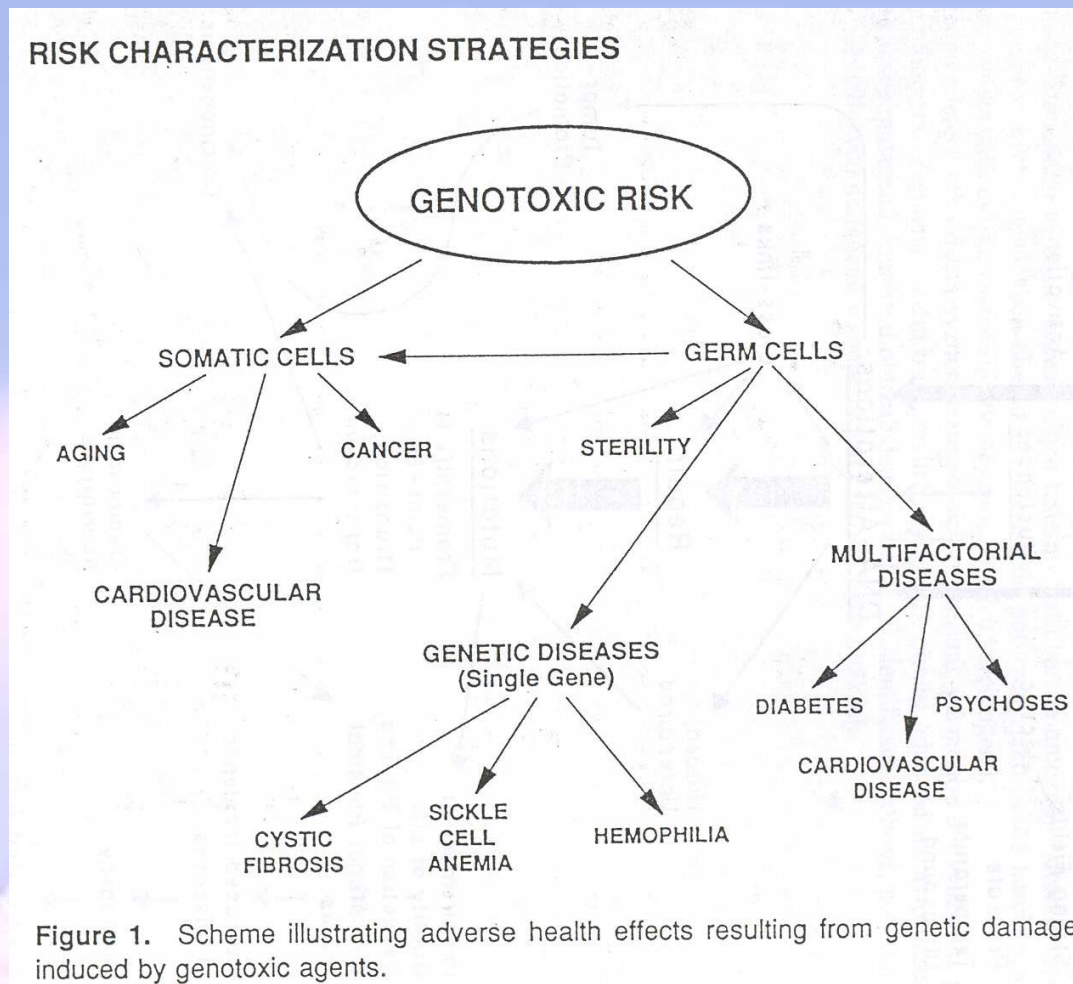
Genotoxicita

- ...term that in a broad sense may refer to the property of a substance as being **harmful to the genetic material** (COM, 1898)
 - ...any **deleterious change in the genetic material** regardless of mechanism by which the change is induced (D'Arcy and Harron, 1993)
 - ...any agent which, by virtue of its physical or chemical properties, can induce or produce heritable changes in those parts of genetic apparatus that exercise homeostatic control over somatic cells, **thereby determining their malignant transformation** (Druckley, 1973)
-

Genetická toxikologie

- interdisciplinární obor vniklý v 70. letech minulého století
 - sleduje poškození DNA a jeho důsledky chemickými látkami přítomnými v životním prostředí
 - jsou používány metody **genetické analýzy** a tradiční **toxikologické přístupy**
 - sledují se zejména **pozdní účinky** chemických látek genetickými metodami
-

Důsledky genetického poškození genotoxickými látkami



Postup při stanovení rizika konkrétní chemické látky

- 1. hazard identification** – identifikace rizika (např. identifikace látky s mutagenní aktivitou)
- 2. dose-response assessment** – stanovení vztahu dávka-odpověď
- 3. exposure assessment** – stanovení expozice – jak mnoho chemikálií je absorbováno ze všech zdrojů
- 4. risk characterization** – charakterizace rizika – stanovení rizika určitého nepříznivého efektu (např. choroby) vyplývající z předchozích výsledků ve vztahu k jednotlivci či populaci



Bezpečná prahová dávka

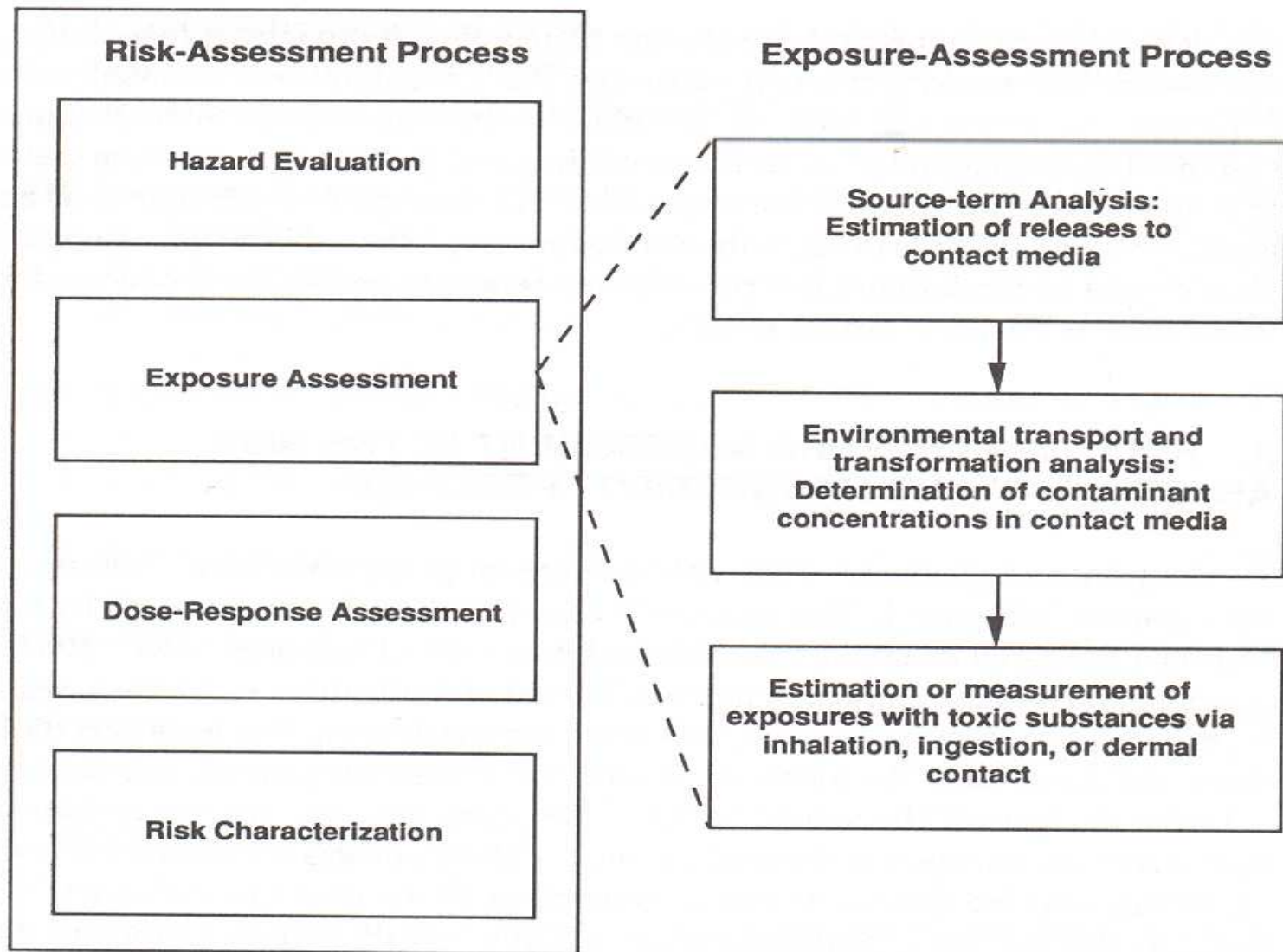


Figure 1. Overview of the risk- and exposure-assessment processes.

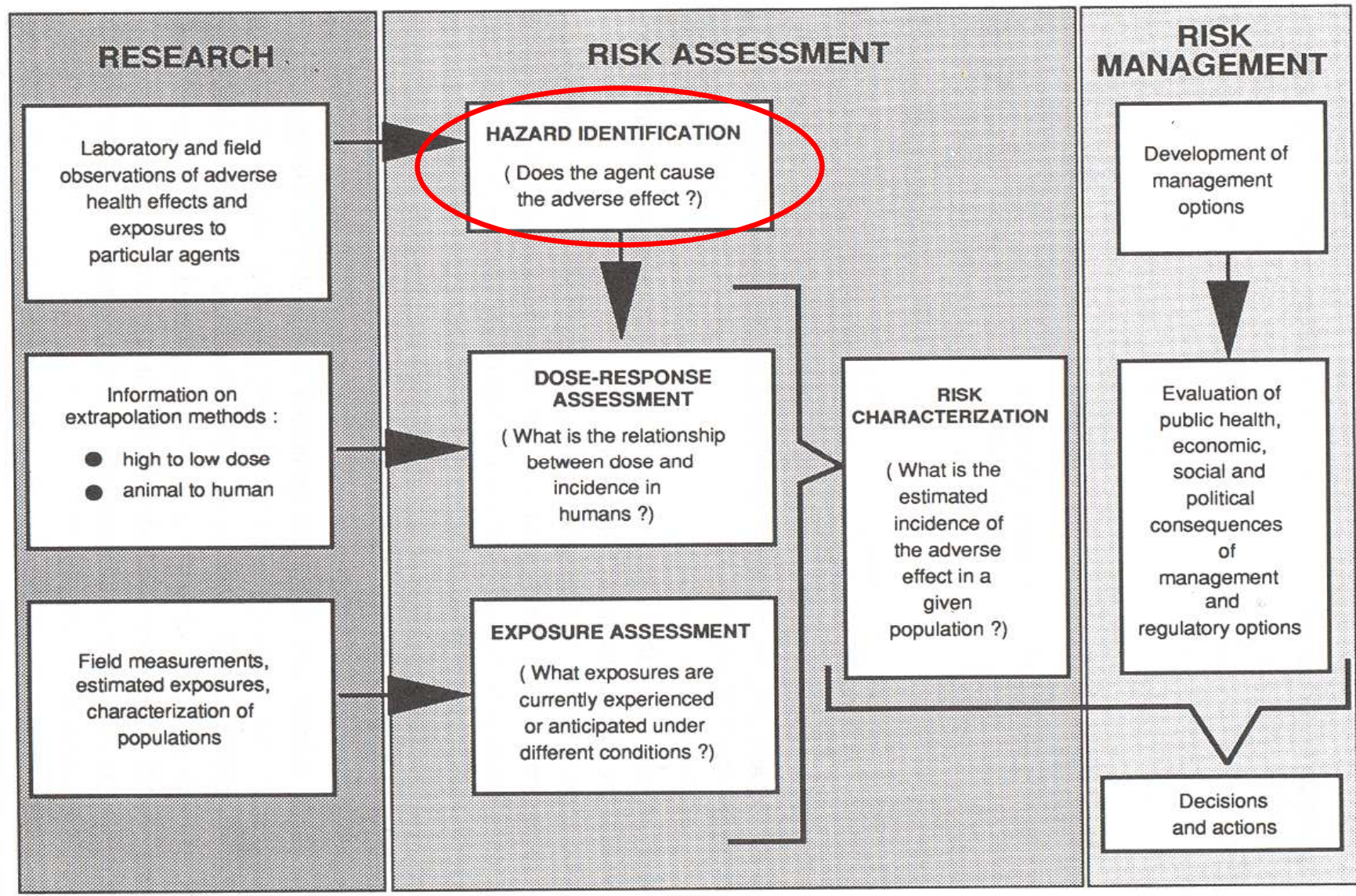


Figure 2. Elements of risk assessment and risk management resulting from research.

Preventivní opatření zaměřená k ochraně před expozicí genotoxickým látkám lze rozdělit do dvou úrovní:

- 1) *Testování genotoxické aktivity nově syntetizovaných nebo již užívaných chemických látek a sloučenin***
- 2) *Biologické monitorování - zahrnující monitorování prostředí (zejména identifikace mutagenní aktivity komplexních složek prostředí) a monitorování biologického účinku - tj. odpovědi lidského organismu na působení genotoxicky aktivních faktorů prostředí.***

Při hodnocení genetického rizika konkrétní látky je doporučován následující postup

- **A) detekce její mutagenní aktivity**
 - **B) studium metabolismu látky člověkem**
 - **C) stanovení množství látky, které bude působit na populaci a jednotlivce**
 - **D) riziko expozice testovanou látkou**
 - **E) nejvyšší přípustnou úroveň genetického poškození**
-

Identifikace mutagenní aktivity sloučeniny

- **informační zdroje**
 - **metoda SAR** (structure-activity relationship) – počítačové modelování a simulace (např. reakce s DNA)
 - **biologické testy mutagenity (asi 200 testů)**
-

Příklady databází obsahujících informace o genotoxických sloučeninách

Zdroje informací o genotoxických sloučeninách.

Celosvětová centra

WHO (World Health Organization)
Agency for Research on Cancer (IARC)
WHO International Programme for Chemical Safety (IPCS).

UNEP (United Nations Environmental Programme).
International Register of Potentially Toxic Substances (IRPTC) řízený UNEP poskytuje informace o užití, působení, toxických a mutagenních účincích vybraných skupin environmentálních mutagenů s mezinárodním významem.

Regionální centra

K nejznámějším patří např. **European Community's Data Information Network (ECDIN)**, **European Chemical Industry Ecology and Toxicology Center (ECITOC)** a **Japan's Biological Database.**

USA

V rámci USA jsou známy především **EPA (Environmental Protection Agency)**, **National Institut of Occupational Safety and Health Sciences (NIOSH)**, **National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS).**

Největší sbírka publikací týkajících se genetické toxikologie je umístěna v **Environmental Mutagen Information Center - EMIC (OAK Ridge National Laboratory, TN)**. Zde se nachází více než 74 000 publikací pojednávajících o genetické toxikologii více než 25000 chemikálií.

Bibliografické informace lze z těchto databází získat prostřednictvím systémů **TOXNET** či **TOXLINE.**

Informace o mutagenních/karcinogenních vlastnostech jednotlivých chemikálií (katalog Sigma)

Bezpečnostní informace

Etikety produktů firmy Sigma



Etikety produktů firmy Sigma jsou navrženy tak, aby poskytovaly základní a nejnovější informace o našich produktech. Jedná se informace, které máte k dispozici kdykoli a kdekoli potřebujete. Na našich etiketách uvádíme:

- Úplný název produktu a jeho popis
- Bezpečnostní informace
- U mnoha typů produktů analytická data pro danou šarži
- Piktogramy výstražných symbolů pro okamžité rozpoznání rizika
- Užitečné údaje pro odkazy, číslo CAS, chemický vzorec

100g M-5750 Lot 119F0448

SIGMA

MENADIONE SODIUM BISULFITE
(2-Methyl-1,4-naphthoquinone sodium bisulfite)
Approx. 95% [57414-02-5]

Water soluble addition compound of vitamin K₃
Light sensitive
Desiccate
Store at less than 0°C

$C_{11}H_8O_2 \cdot NaHSO_3$ p_w 276.2
H₂O content 1.5 mol/mol
For laboratory use only. Not for drug, household or other uses.

SIGMA CHEMICAL CO. P.O. Box 14508 St. Louis, MO 63178 USA 314-771-5750

C-8768 10 g Lot 62H0670

SIGMA

CESIUM NITRATE
Minimum 99.5% (EC No. 202-146-8) [7789-18-6]

White crystalline powder $CsNO_3$ H_2O 0 mol/mol FW 194.9

Store at room temperature For laboratory use only. Not for drug, household or other uses.

SIGMA CHEMICAL CO. P.O. Box 14508 St. Louis, MO 63178 USA 314-771-5750
SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH P.O. 1120 89552 Steinheim, Germany 49-71429-970

Bezpečnostní informace

Co etiketa uvádí

A Název, popis a synonyma produktu

B Katalogové číslo produktu

C Další doplňující informace

D Doporučená manipulace a skladování

Udané skladovací teploty se týkají dlouhodobého skladování produktů. Při přepravě mohou být produkty zasílány za odlišných podmínek, které však rovněž zaručují deklarovanou kvalitu produktu.

E Označení nebezpečnosti

Indikace rizika.

F Analytická data

Údaje o aktivitě, čistotě, stupni hydratace apod. pro danou šarži.

G Balení

Pokud není produkt označen jako předvážený (pre-weighed), obsahuje příslušné balení obvykle o něco více, než je uvedeno. U některých produktů je rovněž uvedeno skutečné množství v době balení. Uživatel by měl vždy potřebné množství produktu z nádoby odvážit.

H Číslo šarže

I Výstražné symboly nebezpečnosti

Umožňují na první pohled rozeznat bezpečnostní rizika spojená s používáním produktu.

J Další bezpečnostní informace

Podrobnější informace o případném riziku, doporučené manipulaci a první pomoci.

K CAS číslo

Číslo CAS (Chemical Abstract Service) je uváděno u všech produktů, pro které je dostupné. CAS čísla se liší podle speciální definice materiálu, proto se snažíme uvést takové CAS číslo, které by vystihovalo produkt co nejpečněji. Pokud je CAS číslo uvedeno u směsi nebo roztoku, jedná se většinou o CAS číslo složky, která je uváděna jako hlavní název na etiketě.

L Chemický vzorec a molekulová hmotnost

Pokud není ve vzorci indikována voda, vztahuje se molekulová hmotnost na bezvodý materiál.

M Čárový kód a jeho ekvivalent

Čárový kód a jeho čitelný ekvivalent jsou určeny pouze pro vnitřní potřebu firmy.

N Číslo standardních rizikových a bezpečnostních vět

O Bezpečnostní list (MSDS) dostupný

Bezpečnostní list (MSDS) produktu je k dispozici.

P EC číslo

Tento produkt je identifikován evropským číslem EC (seznam EINECS nebo ELINCS). Produkty bez EINECS čísla jsou označeny upozorněním "Pozor - látka dosud nebyla zcela testována."

Výstražné Symboly Nebezpečnosti

Piktogramy odpovídají běžně užívaným normám.

oxidující	vysoce hořlavý	extrémně hořlavý	toxický	vysoce toxický
dráždivý	zdraví škodlivý	žiravý	výbušný	nebezpečný pro životní prostředí



Testy mutagenity

Přehled testů mutagenity

Table 1. Distribution of Tests in Genetic Activity Profile (GAP), Gene-Tox (GTX), and National Toxicology Program (NTP) Databases

Phylogenetic endpoint	GAP		GTX	NTP
	Chemicals ^a	Entries ^b	Chemicals	Chemicals ^c
Prokaryotes				
DNA damage	115	309	676	
Gene mutation	282	3635	2694	1702 (SAL)
Lower eukaryotes				
DNA damage	18	22		
Recombination	99	266	506	
Gene mutation	101	276	352	
Chromosomal aberrations	1	1		
Aneuploidy	31	49	105	
Plants				
DNA damage	3	3		
Gene mutation	38	60	149	
SCE	7	12		
Micronuclei	11	13	8	
Chromosomal aberrations	40	105	223	
Insects				
Recombination	15	25		
Gene mutation	123	268	790	285 (DMX)
Chromosomal aberrations	28	49	61	
Aneuploidy	36	62	132	
Animals <i>in vitro</i>				
DNA damage	126	379	35	
Gene mutation	112	427	794	343 (G5T)
SCE	124	371	477	612 (SIC)
Micronuclei	23	27	9	
Chromosomal aberrations	118	334	197	616 (CIC)
Aneuploidy	23	39		
Cell transformation	94	278	550	
Human <i>in vitro</i>				
DNA damage	77	198	187	
Gene mutation	23	29		
SCE	93	244	701	
Micronuclei	5	6	10	
Chromosomal aberrations	92	271	11	
Aneuploidy	6	7		
Cell transformation	0	0		
Body fluids, host mediated	71	152	240	
Animals <i>in vivo</i>				
DNA damage	53	112	19	100 (UPR)
Gene mutation	20	31	94	
SCE	62	132	58	120 (SVA)
Micronuclei	103	252	426	40 (MVM)
Chromosomal aberrations	127	514	73	120 (CVA)

Table 1. (continued) Distribution of Tests in Genetic Activity Profile (GAP), Gene-Tox (GTX), and National Toxicology Program (NTP) Databases

Phylogenetic endpoint	GAP		GTX	NTP
	Chemicals ^a	Entries ^b	Chemicals	Chemicals ^c
Aneuploidy	8	15		
Cell transformation	0	0		
Humans <i>in vivo</i>				
DNA damage	3	3		
SCE	37	88	1	
Micronuclei	3	4		
Chromosomal aberrations	52	145	26	
Aneuploidy	2	5		
Miscellaneous (Sperm morphology, DNA binding, intracellular communication, fish assays)	89	185	256	
Animal carcinogenicity	507	326		

^a Number of chemicals for which test data are available.

^b Number of individual results reported.

^c SAL = *Salmonella typhimurium*, all strains; DMX = *Drosophila melanogaster*, sex-linked recessive lethal mutations; G5T = gene mutation, mouse lymphoma cells *in vitro*; SIC = sister chromatid exchange, Chinese hamster cells *in vitro*; CIC = chromosomal aberrations, Chinese hamster cells *in vitro*; UPR = unscheduled DNA synthesis, rat hepatocytes *in vivo*; SVA = sister-chromatid exchange, cells *in vivo*; MVM = micronucleus test, mice *in vivo*; CVA = chromosomal aberrations, other animal cells treated *in vivo*.

Klasifikace testů genotoxicity z hlediska jejich použití:

1. Screeningové testy

- test na reverzní mutace u *S. typhimurium*
- test na reverzní mutace u *E. coli*
- genové mutace v kulturách savčích buněk
- genové mutace u *Saccharomyces cerevisiae*
- cytogenetická analýza in vitro
- neplánovaná syntéza DNA in vitro (USD - unscheduled DNA synt.)
- výměna sesterských chromatid in vitro (SEE)
- mitotické rekombinace u *S. cerevisiae*
- cytogenetická analýza in vivo
- mikronukleus test
- test na recesivní letální mutace vázané na pohlaví u drozofily

2. testy na potvrzení účinku in vitro

- cytogenetická analýza in vitro
- mikronukleus test
- spot test u myši
- test na recesivní letální mutace vázané na pohlaví u drozofily

3. testy na hodnocení účinku na reprodukční buňky

- dominantní letální test
- test na přenosné translokace
- cytogenetická analýza savčích pohlavních buněk

Testy na hodnocení genotoxického účinku chemických látek

1. POVINNÉ TESTY

1.1. Testy na genové mutace

- test na reverzní mutace u *S. typhimurium*
- test na reverzní mutace u *E. coli*
- test na reverzní mutace u *Saccharomyces cerevisiae*
- test na recesivní letální mutace vázané na pohlaví u *Drosophila melanogaster*

1.2. Testy na chromozómové aberace

- cytogenetická analýza periferních lymfocytů in vitro
- cytogenetická analýza kostní dřeně hlodavců in vitro
- mikronukleus test

2. OVĚŘOVACÍ TESTY

- stanovení neplánované syntézy (USD) v lidských buňkách in vitro
- testování mutagenity na savčích buňkách in vitro
- savčí spot-test
- test na přenosné translokace
- test na detekci genových somatických mutací u *Tradescantia*, klon 4430
- test na detekci genových gametických mutací u *Arabidopsis thaliana*
- testy na chromozómové aberace - *Vicia faba*

3. DOPLNĚKOVÉ TESTY

- dominantní letální test
 - test na abnormitu trvání spermií
 - SEE v lidských periferních lymfocytech
 - inhibice syntézy DNA v lidských buňkách in vitro
- SOS chromotest
- zjištění poškození DNA metodou alkalické eluce

Testy na detekci mutací - rozdělení

- **krátkodobé (screeningové) x dlouhodobé testy na savcích**
 - **testy na gametické x somatické mutace**
 - **testy prováděné *in vitro* x in vivo**
 - **testy na detekci genových, chromozomových, genomových mutací**
 - **testy na reparaci DNA**
-

Výpovědní hodnoty testů mutagenity

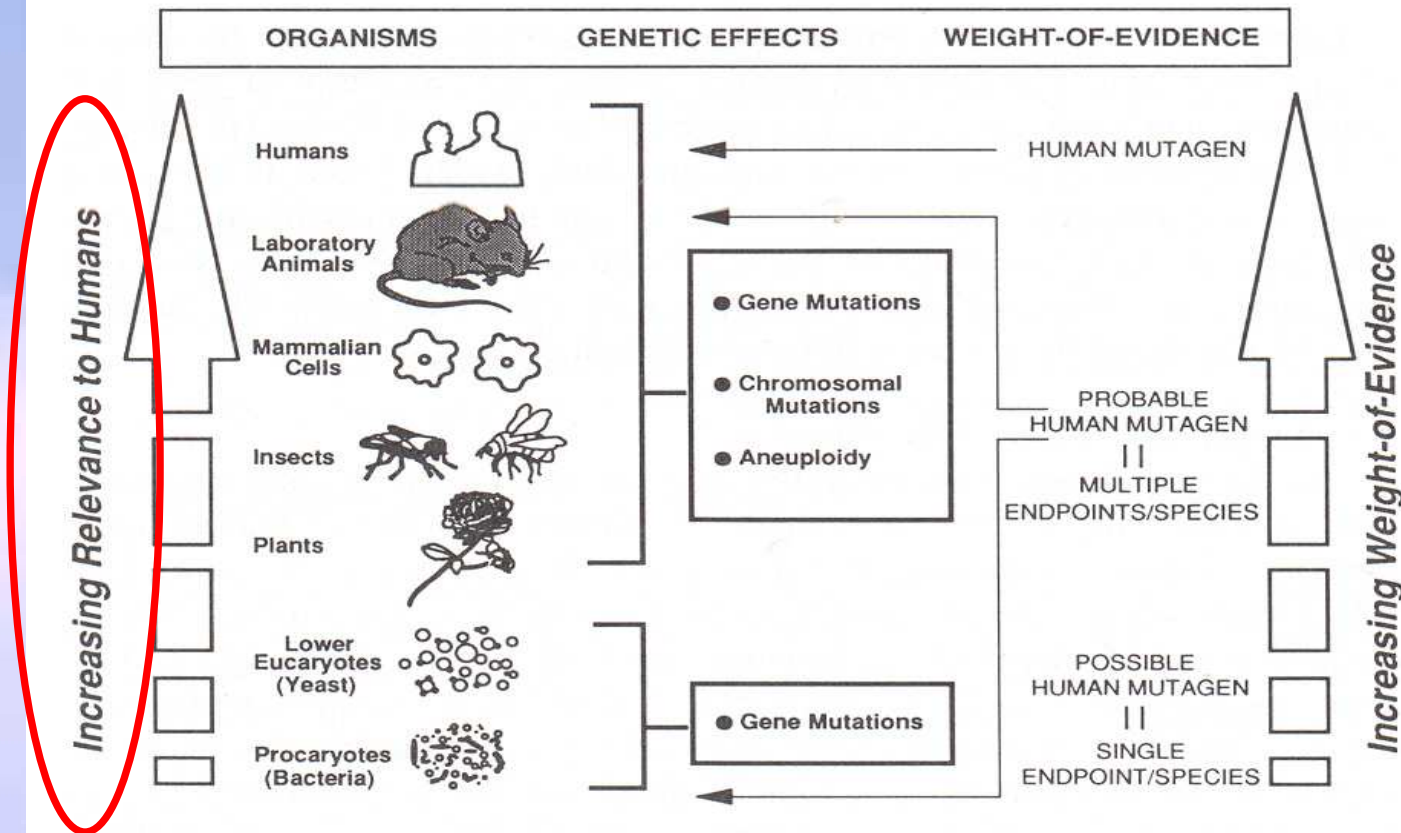


Figure 4. Classification of genotoxicity.

Hodnocení mutagenity jednotlivých chemických látek – systém „baterií testů“

Chemické látky	1) s omezeným použitím	2) široce používané
Testy	orientační (-S9, +S9 in vitro)	komplexní (-S9, +S9 in vitro, in vivo)
Indikátorové organismy	mikroorganismy savci (kostní dřeň)	mikroorganismy savci (DLM - kostní dřeň) člověk (CHA)
Je mutagen?	ano - testuj dle 2) ne - lze použít	ano - při použití je nutno stanovit NPK, ADI ne - lze použít

Obr.7 Systém testování mutagenní aktivity chemických látek

Vysvětlivky:

- S9..... bez metabolické aktivace
- +S9..... s metabolickou aktivací
- DLM..... test na stanovení dominantních letálních mutací
- CHA..... cytogenetická analýza chromozomových aberací
- NPK..... stanovení nejvyšší přípustné koncentrace
- ADI..... určení přijatelné denní dávky

Krátkodobé testy (např. Amesův test + cytogenetická analýza periferních lymfocytů *in vitro*)

Dlouhodobé testy na savcích (hlodavci)

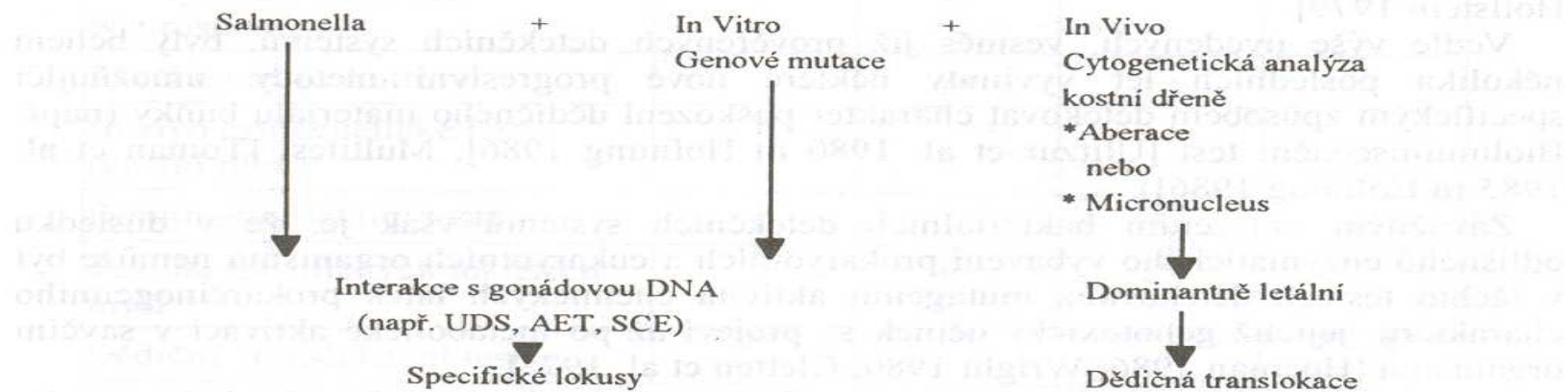
Příklad testovací baterie (Kanada) pro látky s omezeným použitím

Figure 1. Mutagenicity Testing at LOC I

	LOC I	
CRITERIA^a	Chemicals to be tested under LOC I requirements are chemicals for which exposure is low and for which there is no structural relationship to known mutagens or carcinogens. This LOC includes certain chemicals under the <i>Canadian Environmental Protection Act</i> , certain food packaging materials, and certain indirect food additives.	
REQUIRED TESTS^b	Salmonella/mammalian microsome assay plus Mammalian <i>in vitro</i> chromosome aberration assay	
TEST RESULTS	Both negative	One or both positive
CONFIRMATION OF <i>in vivo</i> RESULTS^c	Not applicable	Not applicable
CONCLUSION	Nonmutagen	<i>in vitro</i> mutagen
RECOMMENDED ACTION	No further testing required ^d	a) Review exposure b) Elevate to LOC II if indicated

Vzhledem k výše uvedeným poznatkům doporučila v roce 1983 mezinárodní komise pro ochranu před mutageny a karcinogeny ICPEMC detekovat mutagenitu zevního prostředí bateriemi testů tak, aby se svými detekčními vlastnostmi mohly jednotlivé systémy vhodně doplňovat a bylo možné získat detailnější informace o molekulárních mechanismech působení mutagenů na DNA. Ze studia validity jednotlivých detekčních systémů vyplynulo, že krátkodobý cytogenetický test se vyznačuje 80% konkordancí výsledků vzhledem ke standardním testům využívajícím savčích zárodečných buněk (test na dominantní letální mutace, test na specifických lokusech myši a dědičný translokační test) a bakteriální detekční systémy asi 60% konkordancí [Kilbey 1986].

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) provedla revizi dosavadních přístupů k hodnocení mutagenity chemických látek a na základě získaných zkušeností navrhla při detekci mutagenity postupovat podle následujícího schématu [Auletta et al. 1993]:



Základní změnou v přístupu je současná kombinace testů in vitro na genové mutace a in vivo na chromozómové aberace již na úrovni počátečního orientačního hodnocení. Jestliže jsou pozitivní výsledky získány ve všech třech testech nebo v jednom z in vitro testů a současně v in vivo testu, je zapotřebí pokračovat v detekci mutagenity pomocí testů dlouhodobých. Snahou je nalézt rychlý, optimální způsob hodnocení mutagenity. Při výběru jednotlivých testů je nutno zvažovat detekční vlastnosti jednotlivých systémů tak, aby vedle sebe nebyly používány testy s obdobnou výpovědní hodnotou.

Biologické monitorování genotoxických účinků faktorů vnějšího prostředí.

1. Monitorování prostředí - detekce genotoxických látek v prostředí (mikrobiální testy, genetické testy, cytogenetické testy)

2. Monitorování expozice - detekce genotoxických látek v organismu

- mutagenní aktivita tělních tekutin
- cytogenetické testy - chromosomální aberace
mikrojaderný test
sesterské chromatidové výměny
- léková rezistence leukocytů (8 azaguanin, 6 thioguanin)

Negenetické indikátory mutagenní expozice.

- alkylace proteinu
- poškození DNA (jednořetězcové zlomy, DNA adukty)
- neplánovaná syntéza DNA

3. Monitorování genetického efektu - sledování reakce organismu na genotoxickou látku

- spontánní potraty
- vrozené vady metabolismu
- malformace

4. Monitorování změn frekvence mutací v lidské populaci - populační analýzy - určování výskytu geneticky podmíněných vad nebo onemocnění, které by mohly vzniknout jako důsledek zvýšené frekvence mutací. Monitorování umožňuje posoudit genetickou zátěž populace nebo některé její části (např. vliv pracovní expozice, znečištění prostředí).

- metoda charakteristiky populace - pro určitou oblast se analyzují specifické kategorie

- poměr chlapců a děvčat mezi narozenými dětmi
- počet mrtvě narozených dětí
- počet dětí s vrozenou vývojovou vadou
- hmotnost dětí při porodu, úmrtnost během prvního roku
- fyzický a duševní vývoj během dětství

Monitorování prostředí - detekce environmentálních genotoxických látek

A) **laboratorní testy** – odběr vzorku, testování (např. Amesův test ...)

B) **monitorování *in situ*** (sledování genetického poškození u populace vyskytující se v dané lokalitě – např. hlodavci, škeble, ryby, rostliny...)

Drosophila melanogaster, *Vicia faba* and *Arabidopsis thaliana* Short-term Bioassays in Genotoxicity Evaluation of Air and Soil Samples from Sites Surrounding Two Industrial Factories in the Czech Republic

(environmental pollutants / genotoxicity / *Drosophila* wing spot test / *Vicia* micronucleus and SCE tests / *Arabidopsis* embryonal test)

K. CHROUST¹, P. KUGLÍK¹, J. RELICHOVÁ¹, I. HOLOUBEK², J. ČÁSLAVSKÝ², R. VESELSKÁ¹, M. RYŠKOVÁ¹, J. BENEDÍK¹

¹Department of Genetics and Molecular Biology, and ²Department of Environmental Studies, Faculty of Sciences, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Abstract. The Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in wing cells of *Drosophila melanogaster*, the *Vicia faba* cytogenetic tests – Sister Chromatid Exchange (SCE) and Micronucleus Test (MN), and the Müller test for gametic mutations in *Arabidopsis thaliana* were used for genotoxicity testing of environmental samples of pollutants from the surroundings of LACHEMA chemical factory (Brno, Czech Republic) and DEZA factory in Valašské Meziříčí (Moravia, Czech Republic). Tested soil and air samples were taken from the near vicinity of both factories. The surroundings of both sites are heavily loaded by exhalation of chemicals from the factories. Chemical analyses of the 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) according to the United States Environmental Protection Agency (US EPA) list of priority pollutants and heavy metals were performed in both soil and air samples. The *Drosophila* wing spot test was positive in 70.6% of the tested samples, the *Vicia* sister chromatid exchange test in 62.5%, and the *Arabidopsis* Müller test in 58.9%. The micronucleus *Vicia faba* test was quite insensitive in tested environmental samples. The concordance between SMART and SCE was 62.5%, between SMART and Müller test 76.5%, and between Müller test and SCE 100%. Total concordance

of these three tests was 79.7%. Müller test for gametic mutation in *Arabidopsis thaliana* and cytogenetic SCE test in *Vicia faba* seem to be quite sensitive and convenient plant bioassays for assessing the mutagenic potential of environmental agents, when compared to the SMART test in *Drosophila melanogaster*.

A large number of genotoxicity tests are presently available for use in biological hazard evaluation. At present, some animal and higher plant bioassays are well established systems for screening and monitoring of environmental chemicals for genotoxicity (Constantin and Owens, 1982; Gill and Sandhu, 1992; Grant et al., 1992), and for evaluation of human health risk (Li and Kier, 1993).

The primary purpose of this study was to measure the effectiveness of *Drosophila melanogaster*, *Vicia faba*, and *Arabidopsis thaliana* short-term assays for genotoxicity testing of environmental pollutants from the surroundings of Lachema factory (Brno) and DEZA factory (Valašské Meziříčí).

The *Drosophila melanogaster* wing spot test is the most frequently used assay for estimation of the number of somatic mutations and recombinations (SMART) in experiments for genotoxic risk evaluation of chemicals and chemical mixtures. Results of the wing spot test have been frequently used in most database organizations (Dearfield, 1991; Tennant and Zeiger, 1991; Würzler, 1991b; Lohman et al., 1992; Mendelsohn et al., 1992).

Vicia faba is the most frequently used higher plant species for assessing chromosomal aberrations, micronuclei (MN) and sister chromatid exchanges (SCE) induced by mutagens and carcinogens (Degraasi and Rizoni, 1982; Ma, 1982; Xing and Zhang, 1990). *Arabidopsis thaliana* is another commonly used plant test system for genotoxicity testing (Gichner et al., 1994). The *Arabidopsis* assay screens gametic mutations in several loci coding for different embryonic lethal and chlorophyll mutations and gives advantage to so-called pseudoxenia to screen the recessive mutations already on the M1 plant.

Received April 5, 1996. Accepted August 2, 1996.

This work was supported by grants No. 0599 from the Foundation for Advancement of Czech Universities and No. 302/96/1393 from the Grant Agency of the Czech Republic. Research is a part of the Project TOCOEN (Toxic Organic Compounds in the Environment) of Masaryk University Brno.

Corresponding author: Karel Chroust, Department of Genetics and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Masaryk University, Kollářská 2, CZ-611 37, Brno. Tel. 0042-5-41129546, Fax 0042-5-41211214.

Abbreviations: BrdU – 5-bromo-2'-deoxyuridine, DCM – dichloromethane, DDE – dichlorodiphenyldichloroethane, DDT – dichlorodiphenyltrichloroethane, dTh – thymidine, EMS – ethyl methanesulphonate, FdU – 5-fluoro-2'-deoxyuridine, FPG – fluorescence plus Giemsa, MMS – methyl methanesulphonate, MN – micronucleus test, MNU – N-methyl-N-nitrosourea, PAH – polycyclic aromatic hydrocarbon, PCB – polychlorobiphenyl, PUF – polyurethane foam, SCE – sister chromatid exchange, SMART – somatic mutation and recombination test, Urd – uridine, US EPA – United States Environmental Protection Agency.

Folia Biologica (Praha) 43, 71-78 (1997)

Table 3. Contents of chemicals in environmental samples in the surroundings of DEZA factory

Industrial pollutants in DEZA	Air (DCM extract)	Soil (DCM extract)			
	2VMD (ng.m ⁻³)	4VMD (ng.g ⁻¹)	11VMD (ng.g ⁻¹)	14VMD (ng.g ⁻¹)	20VMD (ng.g ⁻¹)
Naphthalene	29.6	217.7	31.8	43.9	54.6
Acenaphthylene	<1.0	16.4	2.5	2.4	1.6
Acenaphthene	61.6	99.4	11.9	6.3	8.1
Fluorene	26.3	105.8	16.1	10.0	9.8
Phenanthrene	11.6	959.2	96.3	68.7	37.4
Anthracene	12.2	185.8	8.5	7.4	3.4
Fluoranthene	3.5	1959.9	143.1	101.3	26.9
Pyrene	<1.0	1503.3	106.7	67.1	16.8
Benzo(a)anthracene	<1.0	870.4	69.9	44.1	6.2
Chrysene	<1.0	1133.0	97.2	72.2	8.8
Benzo(b)fluoranthene	<1.0	926.1	95.6	74.6	4.9
Benzo(k)fluoranthene	<1.0	862.1	86.3	59.7	4.4
Benzo(a)pyrene	<1.0	838.1	65.8	27.7	1.6
Indeno(123-cd)pyrene	<1.0	688.1	102.9	72.7	2.6
Dibenzo(ah)anthracene	<1.0	204.3	26.5	21.4	0.0
Benzo(ghi)perylene	<1.0	599.7	98.9	64.1	3.1
Sum of PAHs	-	11169.3	1060.0	743.6	190.2
Biphenyl	<1.0	0	0	0	0
Dibenzofurane	<1.0	0	0	0	0
Acridine	<1.0	0	1130.0	9.3	0
Carbazole	<1.0	41.2	0	0	0
Anthrathrene	<1.0	208.1	291.0	1666.0	33.4
Pb	Not evaluated	52450.0	19310.0	18130.0	22600.0
Cd	Not evaluated	440.0	240.0	200.0	320.0
Cr	Not evaluated	3320.0	3240.0	3240.0	2140.0

VM – DEZA Valašské Meziříčí, V – water extract, D – DCM extract.

thaliana. As negative controls, there were used distilled water or dichloromethane (DCM) depending on the type of sample (water or DCM extract).

Results

The contents of chemical pollutants in samples

The data from chemical analyses of the environmental pollutants in the surroundings of Lachema Brno and DEZA Valašské Meziříčí are given in Table 2 – 3. PAH levels in the close neighbourhood of Lachema factory (Table 2) seem to be characteristic of the urbanized areas and they are not significantly influenced by the factory itself. The situation at the second site is quite different as can be seen from Table 3. The sample with highest content of PAHs (No. 4VM) with the sum of 16 PAHs (according to the United States Environmental Protection Agency (US EPA) list of priority pollutants covering chemicals with serious toxic, mutagenic and carci-

nogenic effects) exceeding 11,000 ng.g⁻¹ was taken at a small grassland near the bus station of the Valašské Meziříčí town where the bus diesel engine exhausts represent their main source. The influence of the industrial activity of DEZA factory is proved by the elevated concentration of acridine and anthrathrene, mainly in the downwind direction from the factory (samples No. 11VM and 14VM, respectively). Table 2 and 3 cover chromatography results showing a slight amount of some known mutagenic and carcinogenic compounds. The high concentration of fluoranthene in samples taken in the area of DEZA factory and also the levels of phenanthrene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, and chrysene were comparatively high.

Drosophila melanogaster wing spot assay

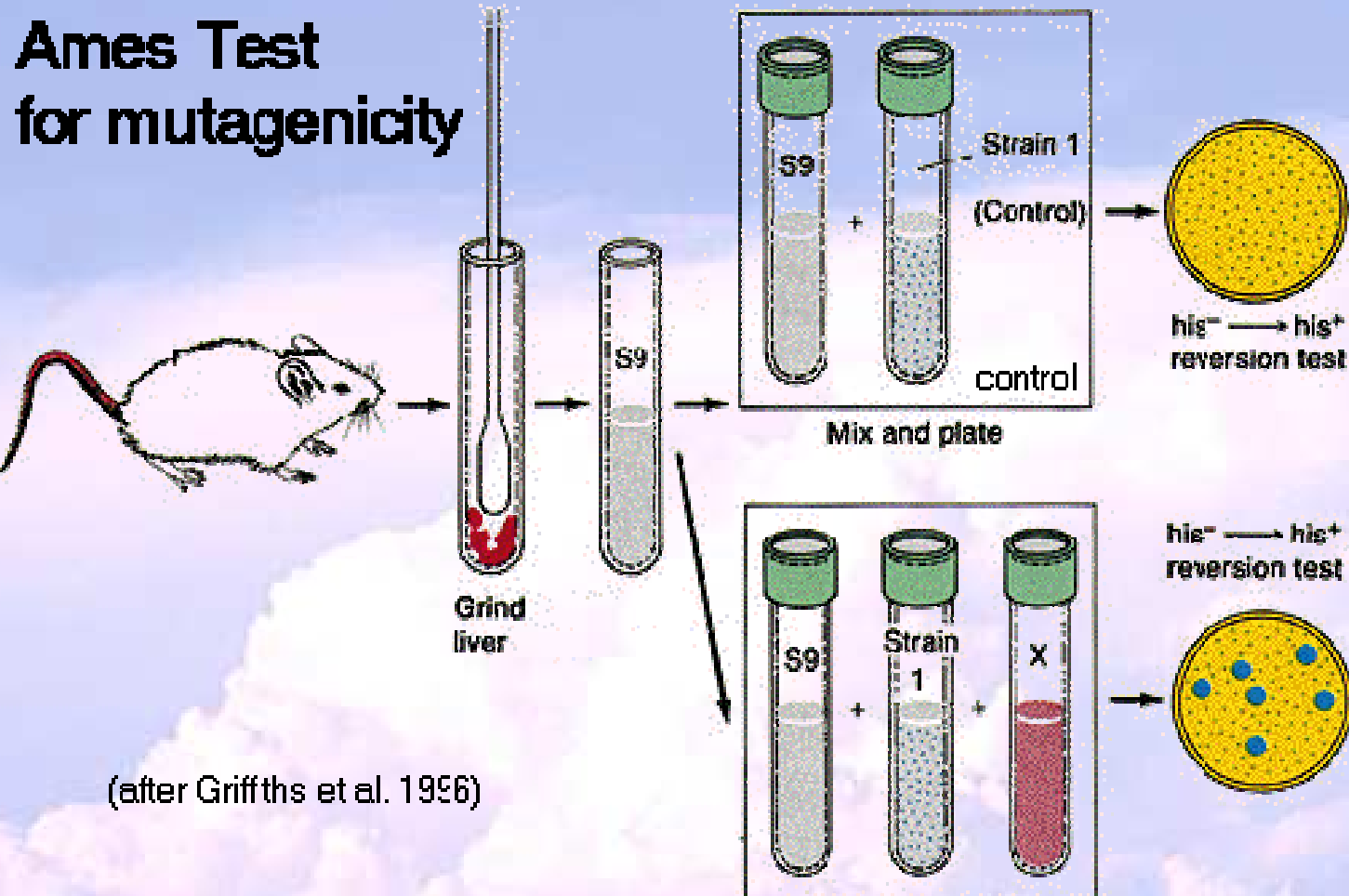
Wing spot test results are summarized in Table 4. The significantly positive results were found in 12 of the 17 environmental samples (3 samples from Lachema

Příklady prokaryotických detekčních systémů

Název testu Publikace	Indikátorový prostředek	Indikátor. kmen, počet	Molekulární mechanismus	Test. látky	Jednodu- chost provedení	Citli- vost
E. coli K 12/ 343/111 1974	?	E. coli 1	mut. dopředu, zpětné mutace, indukce profága, DNA reparace	>30	+	+++
S. typhimu- rium His 1974	his ⁺ kolonie	Salmonella typhimurium 27 rut., 7 exp.	zpětná mut. his ⁻ -> his ⁺	>> 1000	++	+++
E. coli WP2 1976	trp ⁺ kolonie	E. coli 4	zpětná mut. trp ⁻ -> trp ⁺	>>100	++	+++
Inductest 1976	bakteriofág λ	E. coli 8	štěpení C I represoru	>100	++	+
Salmonella ara R 1978	arabinosa rezis- tentní kolonie	Salmonella typhimurium 1	mut. dopředu	>40	++	+++
SOS chromo- test 1982	β -galakto- sidáza alkal. fosfatáza	E. coli 1	LexA štěpení	>100	+++	+++
Rec-detekční systém 1972	růstová inhibice	B. subtilis 2	DNA reparace	>>100	+++	++
PolA-dete- kční systém 1971	růstová inhibice	E. coli 7	DNA reparace	>>100	+++	++

Obr.8 Některé z běžně užívaných systémů k detekci různých genetických změn [Kilbey 1986]

Amesuv test (*Salmonella typhimurium*)



Plotnový test mutagenity podle Amese

- bakteriální detekční systém indikátorových kmenů *Salmonella typhimurium* představuje nejvíce rozšířený přístup pro **screeningové hodnocení mutagenního potenciálu jednotlivých genotoxických chemických látek a jejich komplexních směsí**
 - je používán i pro hodnocení biotransformačních produktů chemických látek **v tělních tekutinách (moč, krev)** experimentálních zvířat a člověka
 - indikátorové bakteriální kmeny **S. typhimurium His-** auxotrofie ve vztahu k histidinu
 - existuje celá sada indikátorových bakteriálních kmenů umožňující detegovat specifický mechanismus působení testovaného mutagenního agens (**substituce, posunové mutace a interkalační změny**)
 - kromě mutace v histidinovém operonu mají kmeny další přídavné markery zvyšující citlivost k chemickým látkám:
 - **mutace uvrB** – vyřazení a blokáda syntézy enzymů excizní reparaace
 - **mutace rfa** – zasahuje lipopolysacharidovou membránu bakteriálních buněk – zvyšuje se permeabilita povrchu bakteriálních buněk
 - **přítomnost plazmidu kódujícího rezistenci k ampicilinu či tetracyklinu** – zvyšuje citlivost k mutagenům
-

Plotnový test mutagenity podle Amese

Nejpoužívanější kmeny:

- **TA 98 – posunové mutace**
- **TA100 - substituce**

Provedení:

- a) bez metabolické aktivace -S9
- b) s metabolickou aktivací +S9 (homogenát z jater)

Nutno provést vždy i negativní kontrolu (kontrolní rozmezí spontánních revertant) a pozitivní kontrolu (použití známých mutagenů)

Příklady mutagenů používaných jako pozitivní kontrola u A. testu

2. 1. 2. Doporučené diagnostické mutageny

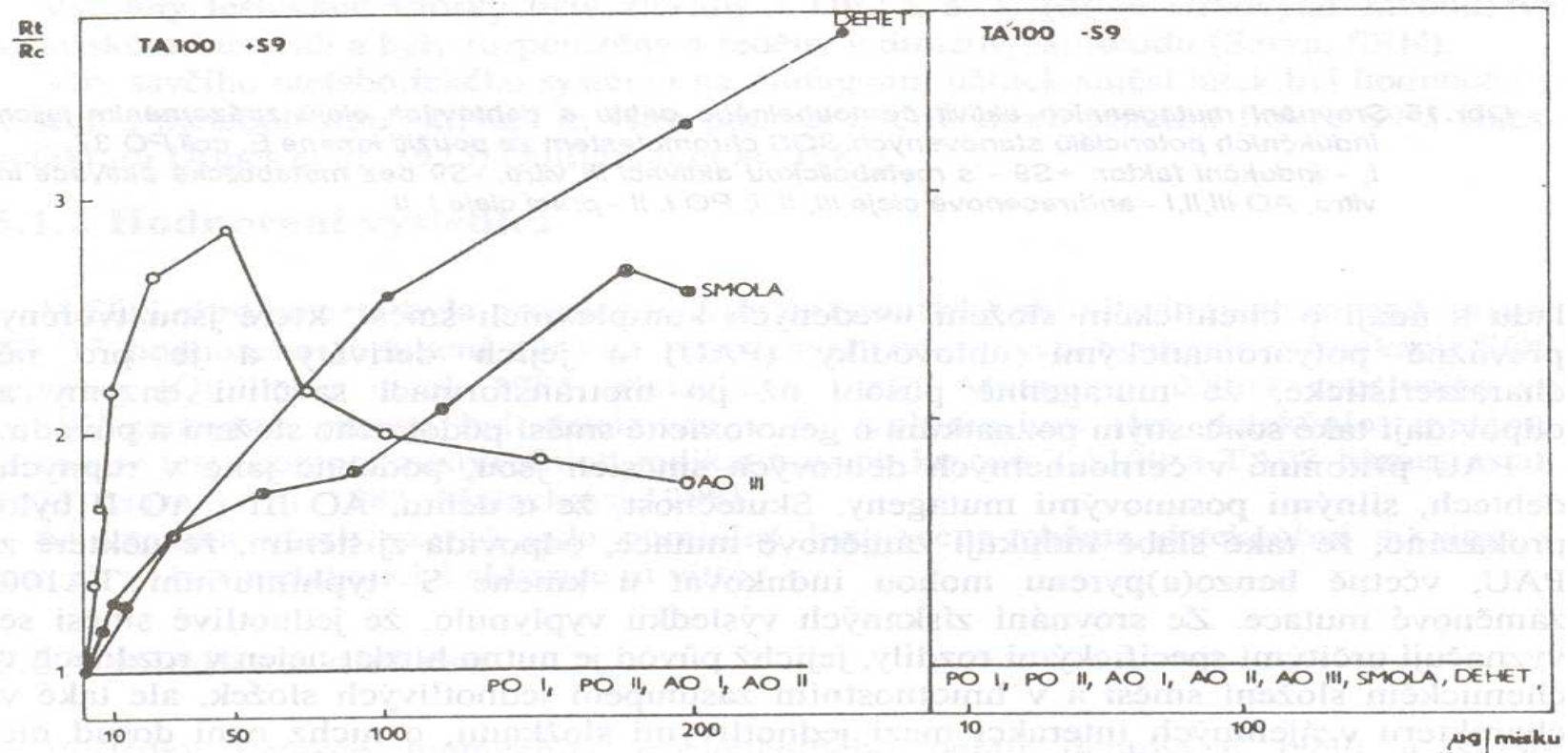
K ověření citlivosti indikátorových bakteriálních kmenů *Salmonella typhimurium* HIS⁻, užívaných v Amesově testu, se používají následující diagnostické mutageny (hodnoty pro dávky jednotlivých látek v µg/misku jsou uváděny pro klasický plotnový test - plate incorporation assay):

KMEN	LÁTKA	S9	ug/misku	ROZPUSTNOST
TA100	azid sodný	-	1.5	H ₂ O
TA100	2-anthramin	+	0.5	DMSO
TA98	2-AF	+	10.0	DMSO
TA98	DNFA	-	20.0	DMSO
TA97	ICR-191	-	1.0	H ₂ O
TA102	mitomycin C	-	0.5	H ₂ O
TA1535	EMS (roztok)	-	1.0µl	H ₂ O
TA1538	2-AF	+	10.0	DMSO
TA1537	2-AF	+	10.0	DMSO
TA98/NR	2-anthramin	+	0.5	DMSO
TA98/ 1,8DNP ₆	2-anthramin	+	3.0	DMSO

Vysvětlivky: 2-AF ... 2-aminofluoren, DNFA ... 4-nitro-fenylen diamin, ICR ... derivát akridinu, EMS ... ethylmethan sulfonát

Za mutagenní je považován vzorek s nejméně dvojnásobným nárůstem revertant oproti kontrole !!!

Příklad použití A. testu při testování mutagenity černouhelného dehtu (obsahuje hlavně PAU)



Obr.16 Srovnání mutagenních aktivit černouhelného dehtu a dehtových olejů stanovených na základě indukce záměnových mutací v Amesově testu za použití kmene *S. typhimurium* His⁻TA100
 Rt/Rc - stupeň zvýšení počtu revertant, v testu bez metabolické aktivace (-S9) nevykazovala žádná z hodnocených látek mutagenní efekt

SOS chromotest

- univerzální bakteriální detekční systém umožňující hodnotit mutagenitu chemických látek vyvolávající taková poškození DNA nebo inhibici replikace, která v buňkách **indukují SOS reparace**
 - metoda je založena na biochemické anlyze **indukovatelné β -galaktozidázy** hodnocené **kolorimetricky**
 - test využívá specifického bakteriálního kmene *Escherichia coli* K12 PQ37, indukce SOS funkcí je hodnocena pomocí *sfiA* genu (patří do skupiny SOS genů)
 - exprese *sfiA* genu je monitorována prostřednictvím **β -galaktozidázy** (fúze *sfiA* genu s *lacZ* genem)
-

Státní zdravotní ústav
Centrum hygieny životního prostředí - Laboratoře genetické toxikologie
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

Laboratoře genetické toxikologie
zkušební laboratoř č. 1206.2 akreditovaná ČIA
tel: 267 082 340; 267 082 585; fax: 267 082 378;
e-mail: hbavorova@szu.cz; ocadlikova@seznam.cz; rossner@szu.cz

STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP

1. Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů Konvenční technika

Původ metody: Hungerford, D. A. (1965) Leucocytes cultured from small inocula of whole blood and preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl Stain Technol. 40, 333-338.

Výchozí zdroj:

Hungerford, D., A.: (1965) Leucocytes cultured from small inocula of whole blood and preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. *Stain Technol.* 40, 333 - 338

Metody biologického monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí - **Standardní metodika, Příloha AHEM č.20/1989, 3-15**

Vyhláška Ministerstva zdravotnictví 251/1998 Sb.(Změna: 208/2001 Sb.)

OECD Guidelines For Chemicals, 22nd January, 2001

1. Předmět a vymezení působnosti

Metoda umožňuje detekci, kvalitativní a kvantitativní analýzu chromozómových abnormalit - strukturálních a numerických aberací - v savčích (lidských) buňkách *in vitro* pomocí optického mikroskopu.

2. Definice

Poškození genetického materiálu buňky (DNA), analyzované jako chromozómové aberace, je projevem biologického efektu genotoxických faktorů.

3. Princip metody

Tento cytogenetický test *in vitro* je krátkodobý test pro detekci strukturálních a numerických aberací v kultivovaných savčích buňkách. Lze použít jak kultur stabilizovaných buněčných linií, tak primárních buněk, např. buňky čínské křečka nebo lidské lymfocyty. Po expozici testované látky s použitím i bez použití vhodného metabolického aktivačního systému se na buněčné kultury působí mitotickým jedem, např. kolchicinem, ke kumulaci dělicích se buněk (C-metafáze). Buňky jsou ve vhodné době zpracovány a pak z nich připraveny mikroskopické preparáty. Preparáty jsou obarveny vhodným barvivem a metafázické buňky analyzovány z hlediska chromozómových abnormalit.

4. Bezpečnost práce

Metodika vyžaduje práci s:

- a) žiravinami (kyselina octová konc., chromsírová směs)
- b) ostatními jedy (kolchicin)
- c) zvláště nebezpečnými jedy (metanol)
- d) karcinogeny a mutageny (např.: Thiotepa, cyklofosamid, N-Nitrosodimethylamin)

Dodržování zásad běžných pro práci v chemické a mikrobiologické laboratoři, navíc kontakt s chemickými látkami typu mutagenů a karcinogenů.

Používání pomůcek osobní ochrany - ochranný oděv, rukavice, roušky.

Lahvičky musí být pevně uzavřeny a obsah dobře promíchán. Kultury se umístí do termostatu při teplotě $37\pm 1^\circ\text{C}$ na 50 hod. Dvě hodiny před koncem kultivace se přidá 0,8 ml pracovního roztoku kolchicinu. Kultura se dobře promíchá a dále kultivuje.

Testování látek

Lidské periferní lymfocyty jsou exponovány testované látky v přítomnosti i za absence metabolického aktivačního systému (MAS). MAS je připravován z S9 frakce jaterního homogenátu potkanů doplněného směsí kofaktorů.

Pro každý experimentální bod se použijí dvě kultury.

Jako *negativní kontrola* se použije:

ředidlo (fyziol. roztok, DMSO)
metabol. aktivační systém (MAS)
ředidlo + MAS
neovlivněná kultura

Jako *pozitivní kontrola* se použije: Thiotepa (10^{-6} M), přímý klastogen
Cyklofosfamid (10^{-4} M), nepřímý klastogen s MAS a bez MAS

Koncentrace látky: použijí se nejméně tři koncentrace testované látky. Musí se lišit nejméně o jeden řád. Nejvyšší koncentrace musí inhibovat mitotickou aktivitu o 50%, nebo vykazovat jiné známky toxicity. Maximální koncentrace je 5 mg/ml.

Doba expozice musí pokrývat celý buněčný cyklus. Dobu kultivace je třeba volit tak, aby byly analyzovány pouze první mitózy (M 1). Pokud expozice nepokrývá celou dobu buněčného cyklu, je třeba volit různé doby kultivace, aby se kumulovaly buňky, které byly během expozice v různých fázích buněčného cyklu. Testované látky se k buňkám přidávají obvykle na začátku kultivace. Pokud testovaná látka mění délku buněčného cyklu, je třeba přizpůsobit dobu kultivace.

Buňky se exponují testované látky v přítomnosti i bez použití *metabolického aktivačního systému (MAS)*. Roztok testované látky a MAS se sterilizuje filtračním Milliporovým filtrem 0,45 μm .

Zpracování kultur a příprava mikroskopických preparátů

1. Centrifugace krve 3 min při cca 2 000 ot/min
2. Přidat cca 10 ml hypotonizačního roztoku, nechat stát 10 min při lab. teplotě
3. Centrifugace krve 3 min při cca 2 000 ot/min

Pomocná zařízení

vodní vývěva
automatické pipety
laboratorní sklo a plast (kultivační lahve - Falcon, pipety atd.)
plynové kahany
germicidní zářivky
analytické váhy

7. Pracovní postup

a) odběr krve

- dezinfikovat loketní jamku Septonexem nebo Jodisolem
- do stříkačky s jehlou na jedno použití natáhnout cca 0.1 ml heparinu/1 ml krve nebo použít vakutainer s heparinem
- odebrat 1 ml krve (ev. podle potřeby více)
- jehlu na stříkačce krýt sterilním krytem a stříkačku s krví **ihned** několikrát převrátit, aby se dobře promíchala s heparinem
- stříkačku nebo vakutainer uložit do chladničky při teplotě 4° - 10°C

Pozor! Krev nesmí zmrznout.

- pro každou osobu je vyplněna „Cytogenetická průvodka“, která je do laboratoře předána spolu s příslušnou krví a dále archivována.

b) transport krve

je-li třeba krev transportovat z místa odběru do laboratoře, pak je třeba použít transportních chlazených termonádob, kde je krev po dobu mezi odběrem a předáním v laboratoři udržována při teplotě 4 - 10°C.

Kultivace

Biologické monitorování

Kultivace začíná do 24 hod po odběru krve, v mimořádných případech lze krev použít do 3 dnů po odběru. Kultivace probíhá v kultivačních nádobách v poměru 7,5 ml média a 0,6 ± 0,2 ml krve.

Kultivační médium pro 1 kulturu:	RPMI 1640	1,06 ml
	bovinní sérum	1,80 ml
	H ₂ O	4,24 ml
	glutamin	0,10 ml
	NaHCO ₃ 7,5%	0,16 ml
	PHA HA 15	0,10 ml

Cytogenetická metoda = biomarker expozice genoxickým látkám

**= biomarker účinků na člověka (predikce rizika
nádorů)**

**Použití jako skupinový expoziční test i k posouzení expozice
jednotlivce**

CHA = detekce časného genotoxického efektu

Pozdní genotoxický efekt = nádory

Cytogenetická Analýza Periferních Lymfocytů = CAPL

Materiál: lymfocyty periferní krve, G0 fáze, přetrvání 1000-1500 dní

Kultivace: 48 hod, zpracování jako při karyotypování

Barvení - konvenční metoda !!!!

Hodnocení: počet aberantních bb. / 100 hodnocených mitóz

Typy aberací: zlomy chromatidové a chromozomové

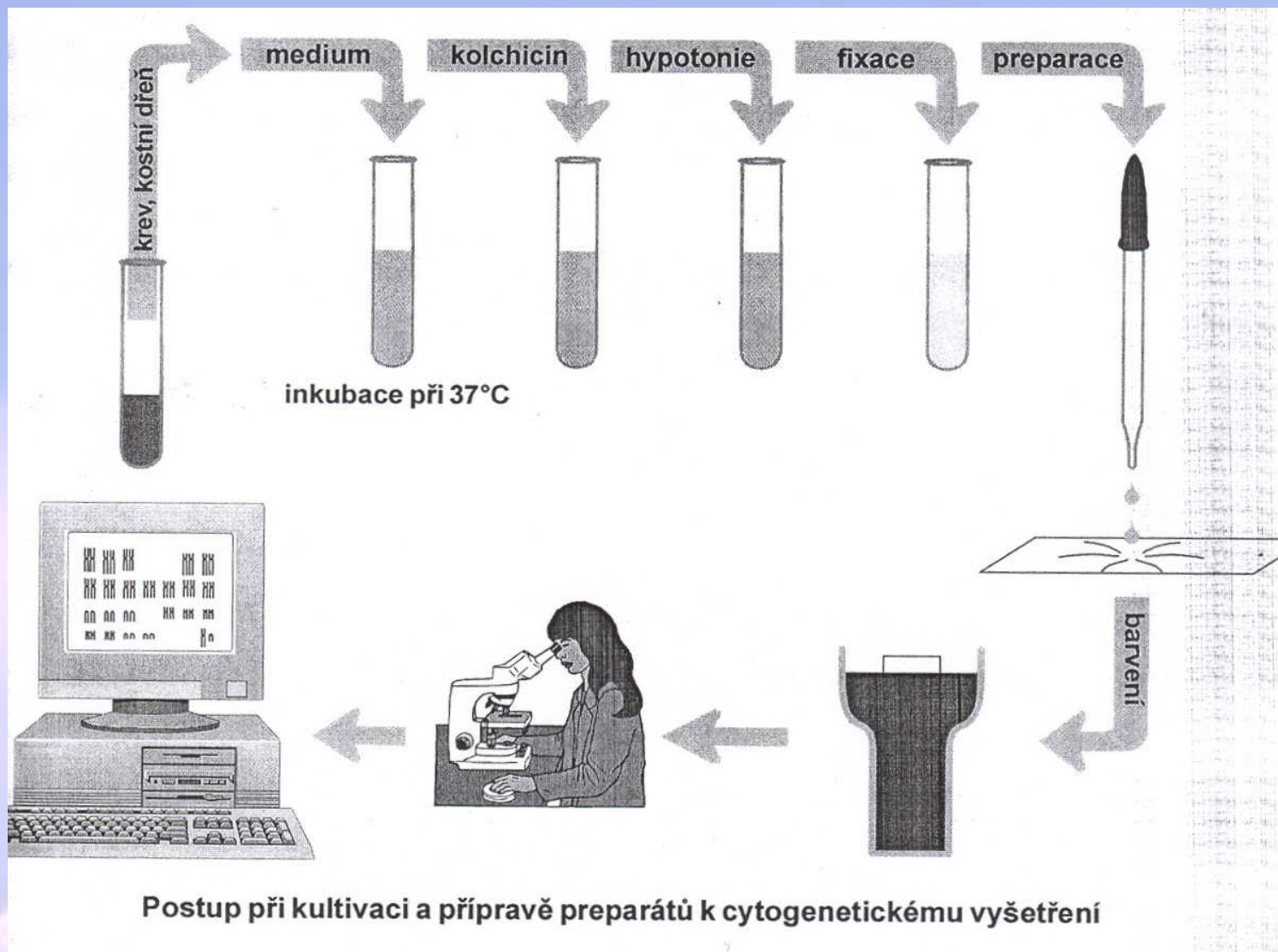
acentrické fragmenty

di- a tricentrické chromozomy

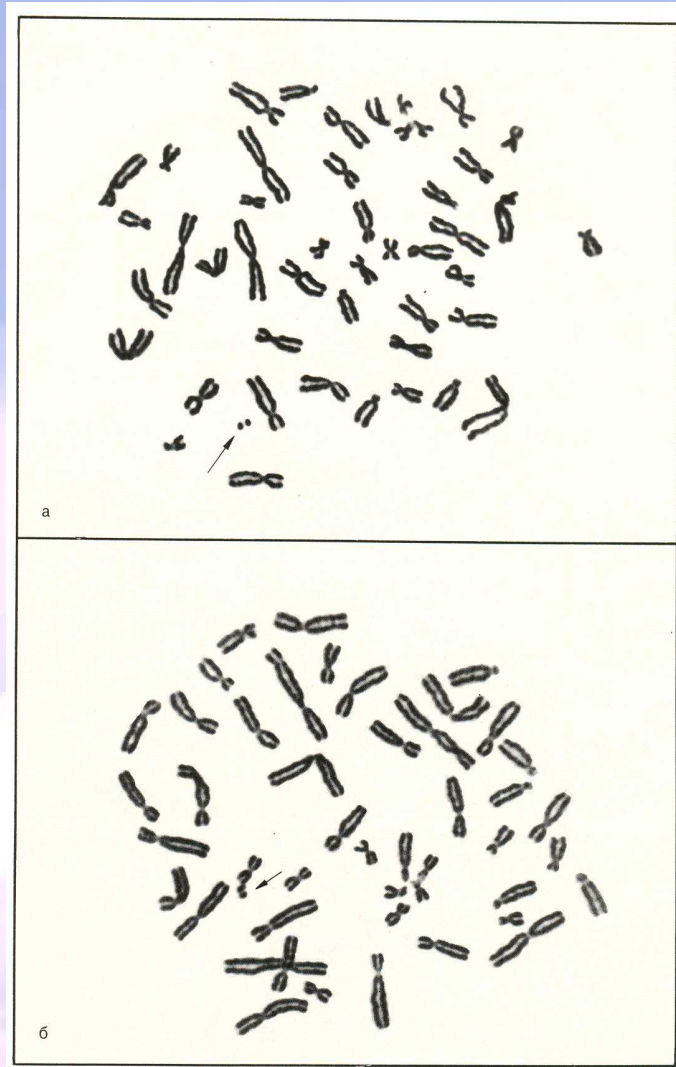
kruhové chromozomy, výměny

Hodnocení nálezů: → 5% bez závěru (u jednotlivce),
opakování=riziko

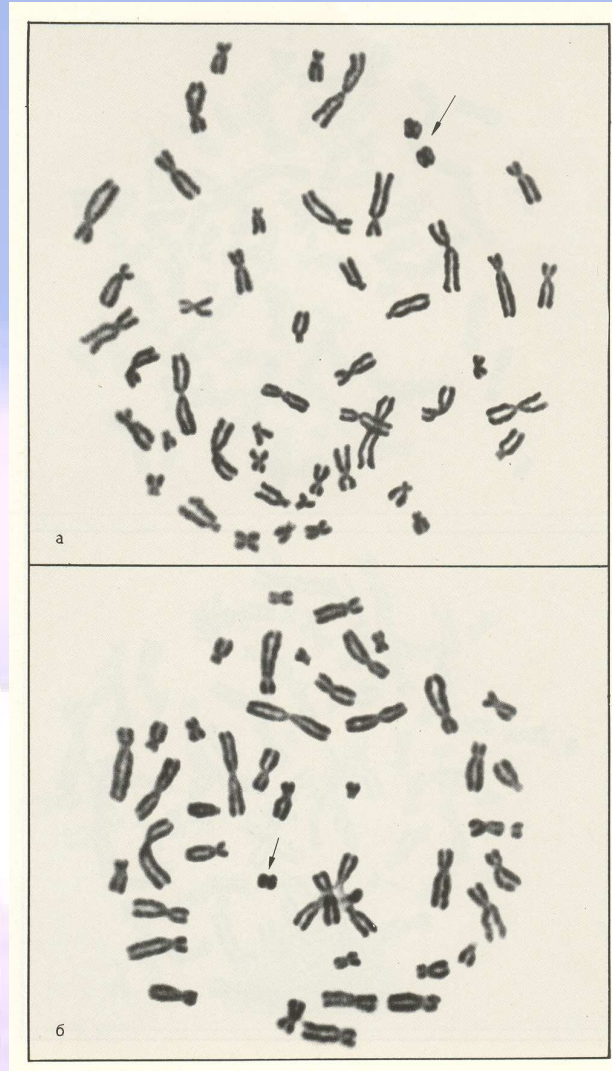
rozdíly v hodnocení jednotlivců a skupin (2 % hranice u skupin)



Párový fragment



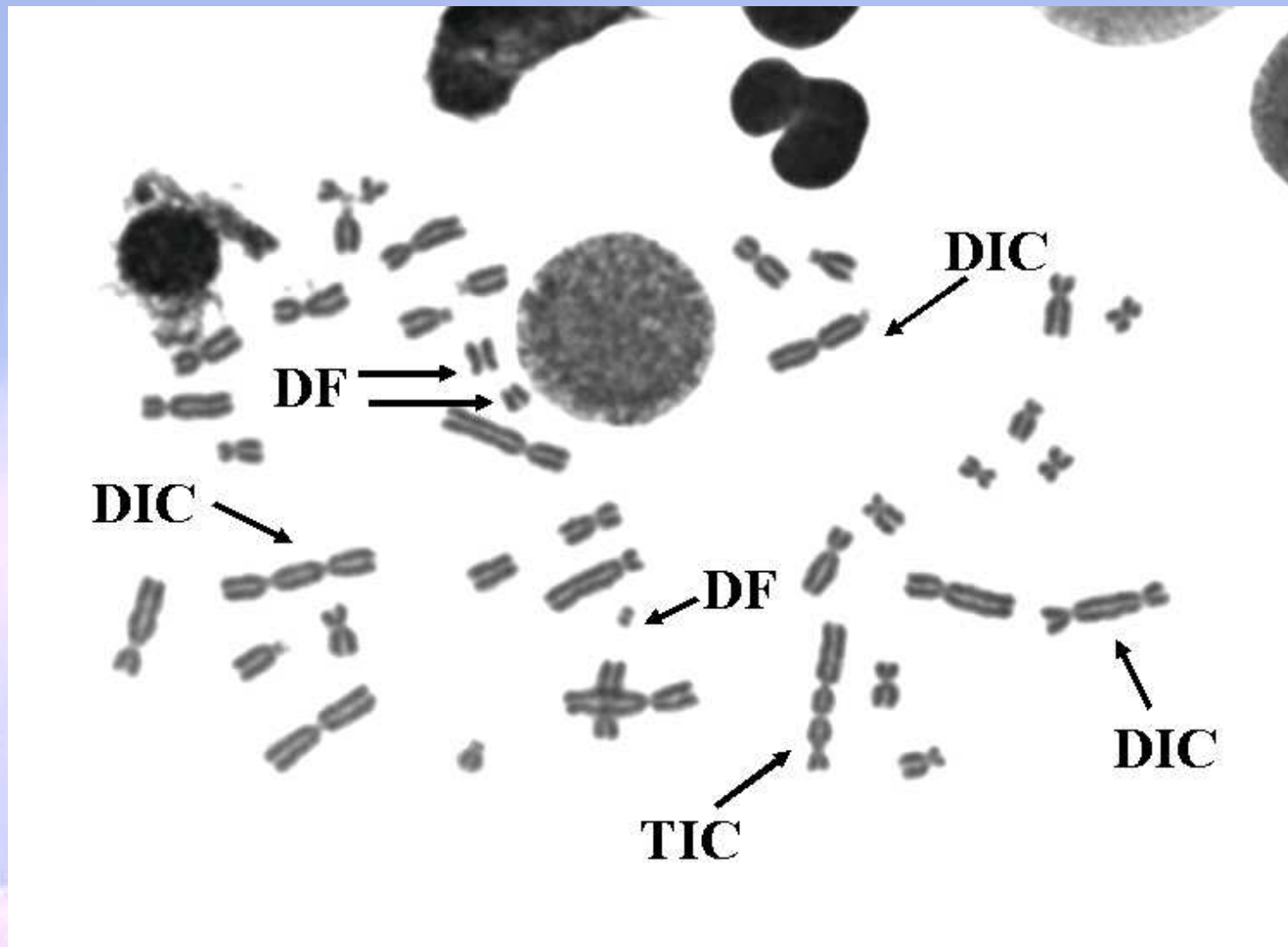
Kruhový chromozom



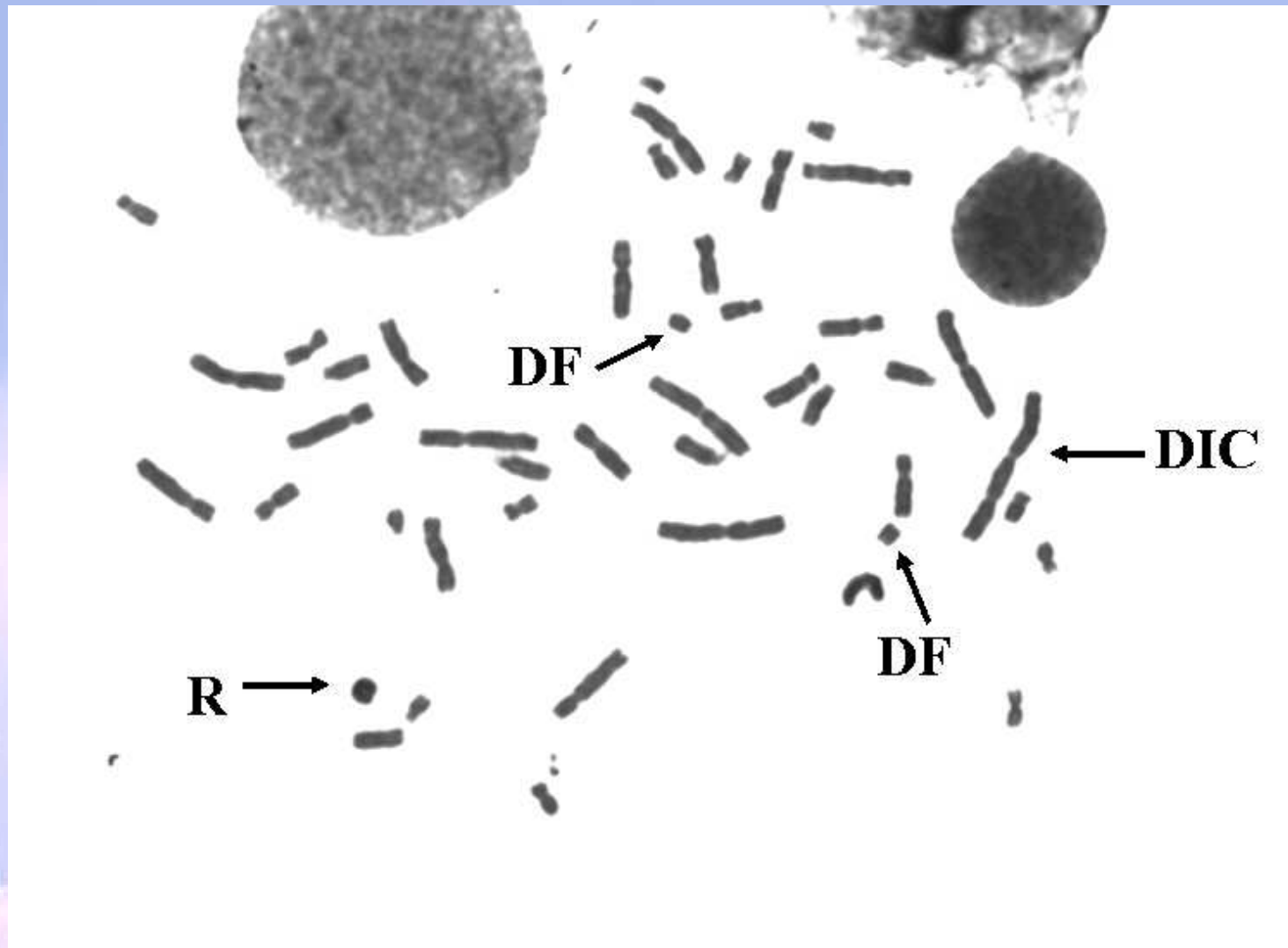
Dicentrický chromozom



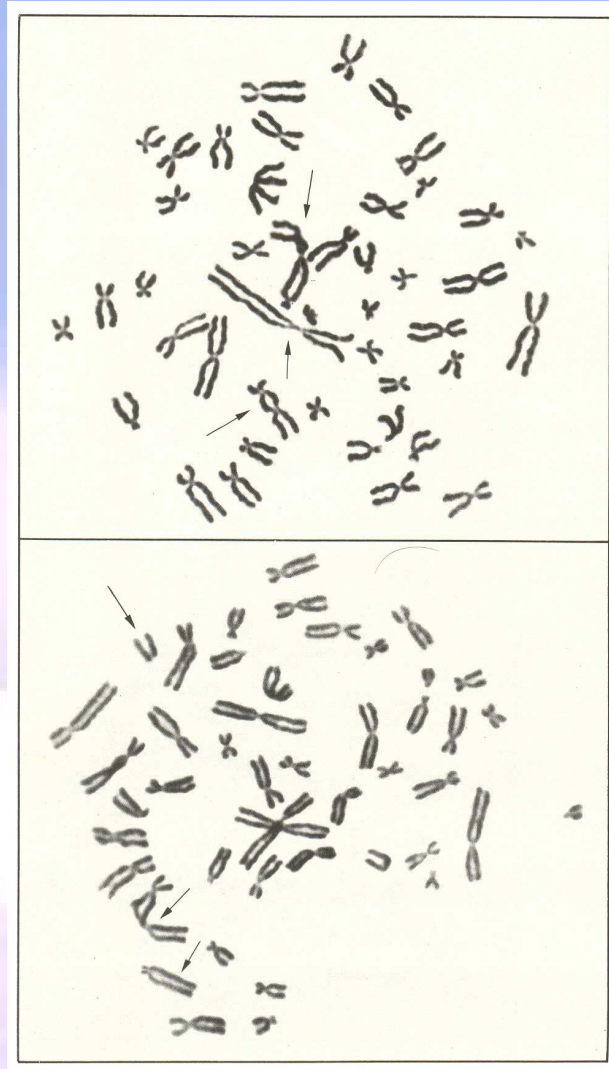
Di- a tricentrický chromozom, difragment



Dicentrický chromozom, difragment, kruhový chromozom



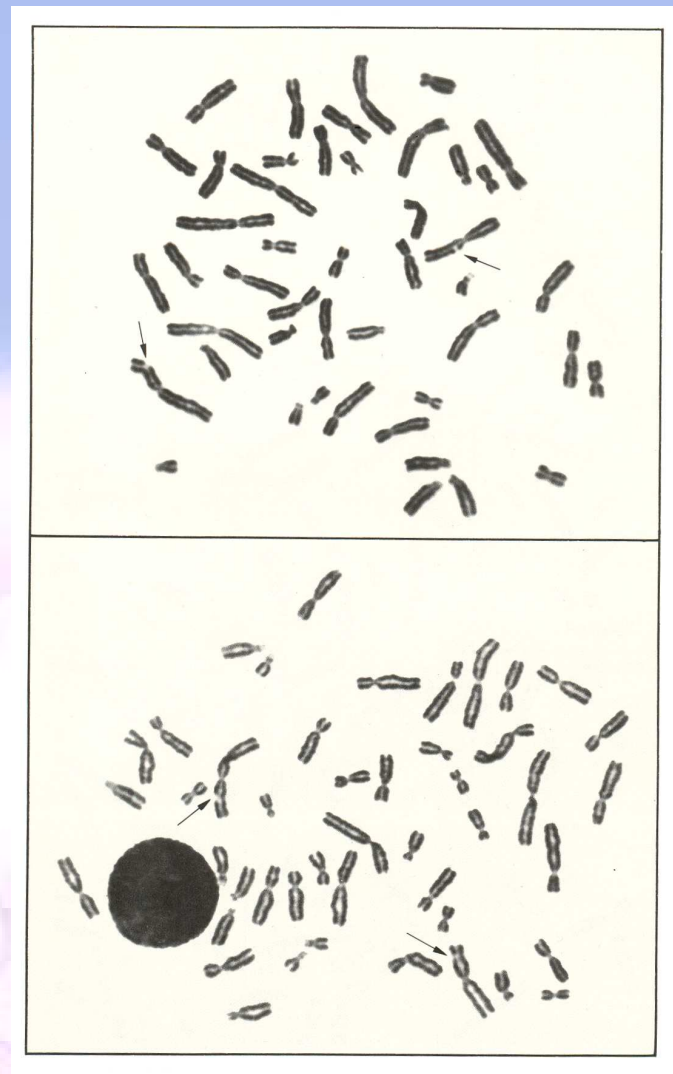
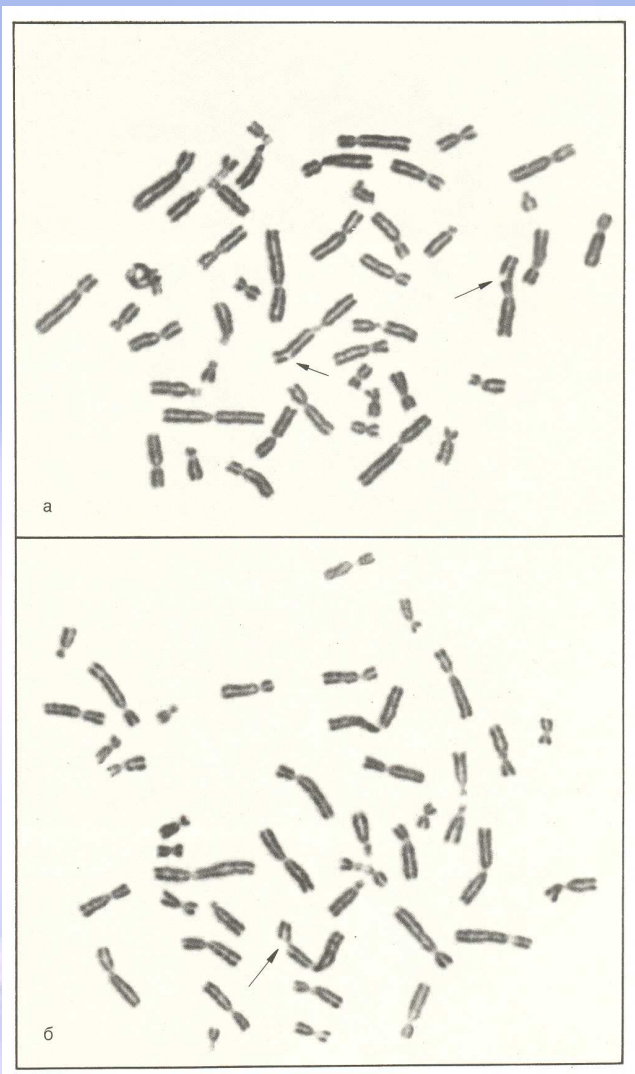
Translokace



Chromatidový zlom



Chromatidový zlom



- **Spontaneous level of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of control individuals of the Czech Republic population.**

Rossner P, Sram RJ, Bavorova H, Ocadlikova D, Cerna M, Svandova E.

Laboratory of Genetic Toxicology, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic. rosner@szu.cz Toxicol Lett. 1998 Aug;96-97:137-42.

In order to assess the potential of cytogenetic determinations on peripheral blood lymphocytes as a mean of monitoring human population subjects to occupational and environmental exposures to genotoxins, accurate baseline data are required. During the past 20 years many results of the cytogenetic studies on peripheral blood lymphocytes from monitored occupationally exposed and non-exposed groups were obtained. At the time of blood drawing a questionnaire was administered. The questions covered a brief medical and family history including age, sex, medication, infectious diseases, smoking habits, X-ray examinations, alcohol consumption etc. Cytogenetic analysis from whole blood was carried out in short-term cultures. The cultivation time was 52 hours with all cells being in the first mitosis. A total of 100 well-spread metaphases containing 46 +/- 1 centromere were examined per donor on coded slides. Four categories of chromosome aberrations were evaluated: Chromatid and chromosome breaks, chromatid and chromosome exchanges. Cells bearing breaks or exchanges were classified as aberrant cells. Gaps were recorded but not scored as aberrations. Results of the cytogenetic analysis from control individuals (N = 5,430) indicated elevation of spontaneous frequency of aberrant cells (AB.C.) with age. **We found 1.10% AB.C. (N = 551) in newborns; 0.71% AB.C. (N = 105) in the group 5-6 yr; 1.20% (N = 1,734) in the group 7-15 yr; 1.25% AB.C. (N = 239) in the group 16-19 yr and 1.59% (N = 2,801) in the group 20-63 yr.**

Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of children as biomarkers of environmental exposure and life style.

Rossner P, Bavorova H, Ocadlikova D, Svandova E, Sram RJ.

Laboratory of Genetic Toxicology, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic.
pavel.rossner@szu.cz

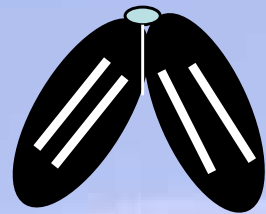
The original purpose of our study was to determine if the detection of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of children might be used as a biomarker of environmental pollution and life style. **We compared the results of cytogenetic analyses performed in children and adolescents in the periods 1984-1993 and 1994-1999, in a total of 3402 subjects.** The frequency of aberrant cells (AB.C.) markedly **decreased** in the period 1994-1999 compared with the period 1984-1993. The decreases in AB.C. were significant in the age groups 7-15 and 16-19 years: **1.63% AB.C. versus 1.14% AB.C.** and **2.02% AB.C. versus 1.08% AB.C.**, respectively ($P < 0.01$). No difference in the frequency of AB.C. was observed in newborns. Based on our experience, we believe that monitoring the spontaneous level of chromosomal aberrations in children over 5 year periods may be used to examine the general changes in environmental pollution in larger geographic areas.

Toxicol Lett. 2002 Aug 5;134(1-3):79-85.

Sesterské chromatidové výměny - SCE

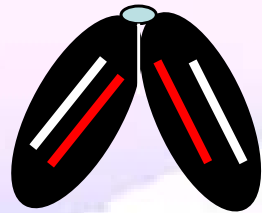
= zlomy DNA a reciproké výměny DNA duplexů mezi sesterskými chromatidami, vznik v S fázi

Detekce BrdU metodou (harlekýnská metoda) = kultivace buněk v mediu s BrdU po 2 cykly replikace

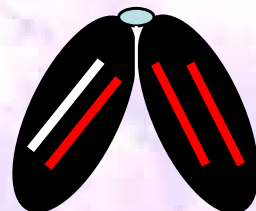


BrdU analog T

buňky v 1. mitoze – chromatidy homogenně zbarvené (rovnoměrně substituované BrdU)



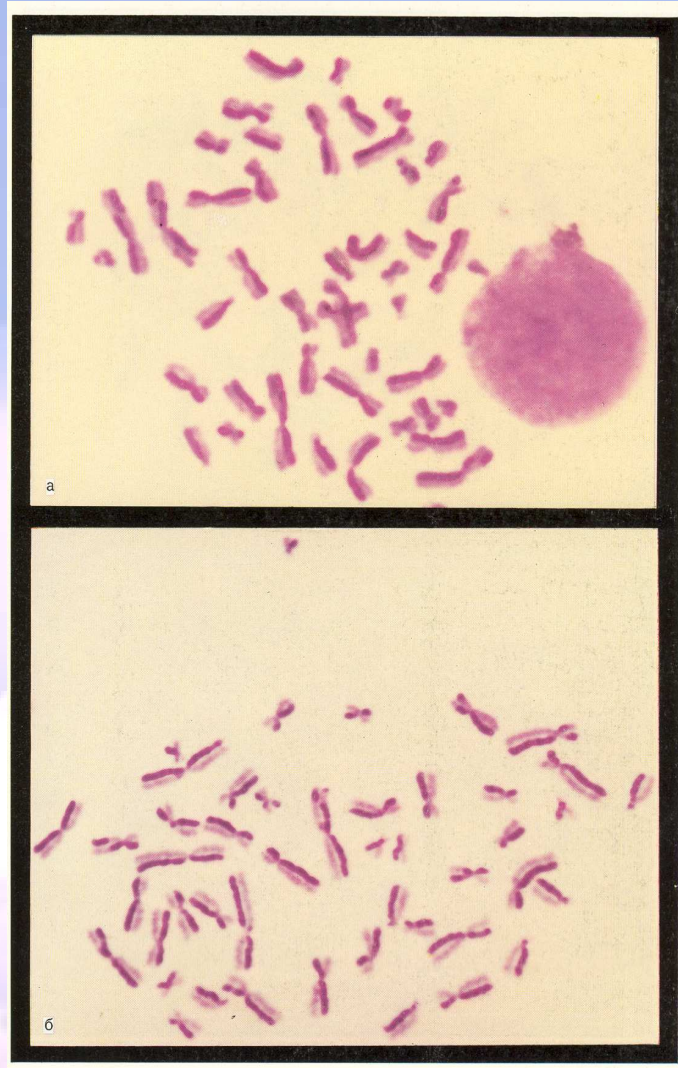
buňky v 2. mitoze – 1 chromatida tmavá, druhá světlá (rozdílná substituce BrdU - SCE)



**Mutageny a karcinogeny zvyšují frekvenci SCE/buňku -
látky, které tvoří kovalentní addukty nebo ovlivňují
replikaci (inhibice replikačních enzymů)
pravděp. vznik v místě replikační vidlice**

**Detekce počtu SCE v 30 - 50 buňkách – vyjádření průměr.
počtu na buňku (5 - 10 SCE na buňku u kontrol)**

Sesterské chromatidové výměny



Interfázni analýza ZCHA

Mikronukleus test (mikrojaderný test) (MN)

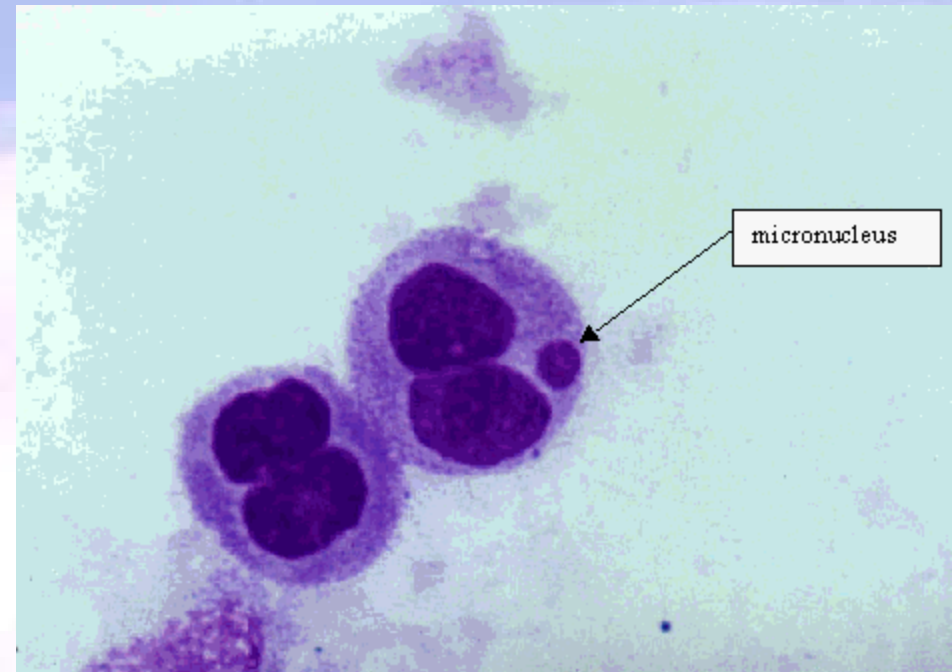
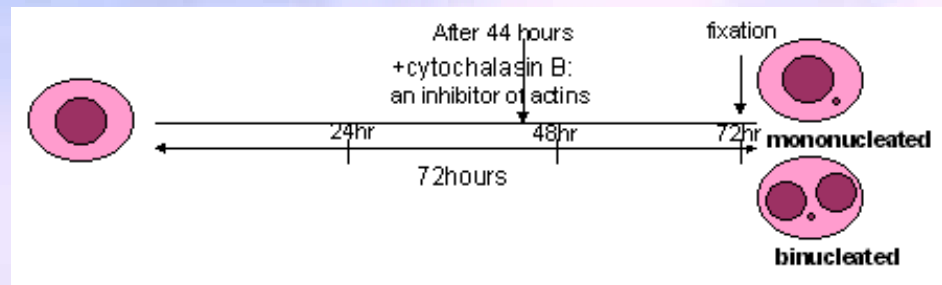
Mikronukleus — chromozomální fragment
celý chromozom

Analyzovaná buňka musí projít dělením

Metoda **blokování cytokineze cytochalazinem (CB)** ⇒
dvoujaderné buňky – **mikronukleus** = malý útvar barvící se
jako jádro

Nebo detekce v kostní dřeni exper. zvířat

Mikrojaderný test



Státní zdravotní ústav
Centrum hygieny životního prostředí - Laboratoře genetické toxikologie
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

Laboratoře genetické toxikologie

zkušební laboratoř č. 1206.2 akreditovaná ČIA
tel: 267 082 340; 267 082 585; fax: 267 082 378;
e-mail: hbavorova@szu.cz; ocadlikova@seznam.cz; rossner@szu.cz

STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP

Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů **4. Mikronukleus test - Modifikace s cytochalasinem B**

Původ metody: Fenech, M., Morley, A. A.: Measurement of micronuclei in lymphocytes.
Mutation Res. 147, 1985, s. 29-36

1. Předmět a vymezení působnosti

Metoda umožňuje detekci cytogenetického poškození ve stimulovaných savčích (lidských) periferních lymfocytech *in vitro* pomocí optického mikroskopu.

2. Definice

Poškození genetického materiálu buňky (DNA), analyzované jako mikrojádra, je projevem biologického efektu genotoxických faktorů.

3. Princip metody

Tento cytogenetický test *in vitro* je krátkodobý test, při kterém se stanovuje frekvence mikrojader v kultivovaných savčích buňkách. Mikrojádra vznikají buď v důsledku chromozómových zlomů (pak jsou tvořena centrickým fragmentem), nebo poruchou funkce dělicího vřeténka (mikrojádro je tvořeno celým chromozómem nezačleněným do nově vytvořeného jádra). Mikrojádra se analyzují výhradně v těch lymfocytech, které prošly pouze jedním buněčným dělením. K identifikaci takových lymfocytů se používá inhibice cytokinézy pomocí cytochalasinu B. Lymfocyty jsou pak velké, dvoujaderné. Buňky jsou ve vhodné době zpracovány a jsou z nich připraveny mikroskopické preparáty. Preparáty jsou obarveny vhodným barvivem a analyzuje se frekvence mikrojader ve dvoujaderných buňkách.

4. Bezpečnost práce

Metodika vyžaduje práci s:

- a) žíraviny (kyselina octová konc., chromsírová směs)
- b) ostatními jedy (cytochalasin B)
- c) zvláště nebezpečnými jedy (metanol)

Dodržování zásad běžných pro práci v chemické a mikrobiologické laboratoři.
Používání pomůcek osobní ochrany - ochranný oděv, rukavice, roušky.
Dbát na zamezení kontaminace osob i prostředí při práci s rozpouštědly, s nebezpečnými chemickými látkami, s infekcí, včetně likvidace odpadu.

5. Chemikálie a spotřební materiál

Pro použité chemikálie je požadována kvalita čistoty p.a. nebo reagent grade.

Základní chemikálie

Metanol, p.a.
Kyselina octová, 99 %, p.a.
Chlorid draselný, p.a.
Glutamin, 3 %, p.a.

Kulich, Hradec Králové
Penta Chrudim
Merck
Sevac

Mytí skel

Předmytá podložní skla jsou uchovávána v chromsírové směsi. Před použitím jsou skla jednotlivě promyta pod tekoucí vodou, naložena do destilované vody a vychlazena v chladničce.

Barvení preparátů

Po usušení skel volně na vzduchu barvíme preparáty 5% roztokem Giemsa:

Giemsa	5 ml
dest. H ₂ O	80 ml
Sorensenův pufr	15 ml

Doba barvení je 4 - 5 minut, poté preparáty důkladně opláchneme pod tekoucí vodou a necháme uschnout.

Mikroskopická analýza

Mikrojádra se hodnotí v mikroskopu při zvětšení 1 000x pod imersním olejem pro fluorescenci. Hodnotí se 1000 dvoujaderných buněk a stanoví se frekvence buněk s mikrojádry.

Mikrojádru musí být umístěné v cytoplazmě a nesmí být větší než 1/3 jádra.

S jádrem se nesmí překrývat a může se ho dotýkat maximálně v 1 bodě.

Intenzita zabarvení mikrojádra se musí podobat zabarvení jádra, případně být o něco světlejší. V jedné buňce může být nejvíce 6 mikrojader.

8. Rušivé vlivy

kontaminace vzorků, médií a laboratorního nádobí, možný výpadek el. energie během kultivace, lidský faktor

9. Validace metody

Používá se standardní metoda odvozená od mezinárodně normované, používané laboratořemi celého světa a ověřované mezilaboratorním porovnáváním.

Literatura

Carrano A.V., Natarajan A.T.: Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. Mutation Res., 1988, 204, 379 - 406

Standardní metodika, Příloha AHEM č.20/1989, 16-17.

Vyhláška Ministerstva zdravotnictví 251/1998 Sb.(Změna: 208/2001 Sb.)

OECD Guidelines For Chemicals, 22nd January, 2001

specifičnost - metoda je specifická pro detekci mikrojader v savcích somatických buňkách *in vitro* a není ovlivněna žádnými ostatními složkami

negativní odchylka - falešně negativní výsledek hrozí při analýze technicky nekvalitních preparátů, které se ale nemají analyzovat

Test na detekci přenosných translokací

9.4.2 Heritable translocation test

Translocations are chromosomal interchanges involving exchanges of non-homologous segments. If such an exchange occurs in a parental germ cell and is a balanced, reciprocal exchange, any progeny resulting from the union of this gamete with a normal gamete from the opposite-sex parent will be a translocation heterozygote. Translocation heterozygotes are generally of normal appearance but have reduced fertility because they produce duplication-deficient gametes as a result of aberrant multivalent meiotic chromosome pairing and segregation (Figure 9.4). This reduced fertility provides the basis for the detection of translocations (Adler, 1978, 1980; Bishop and Kodell, 1980; Generoso *et al.*, 1980).

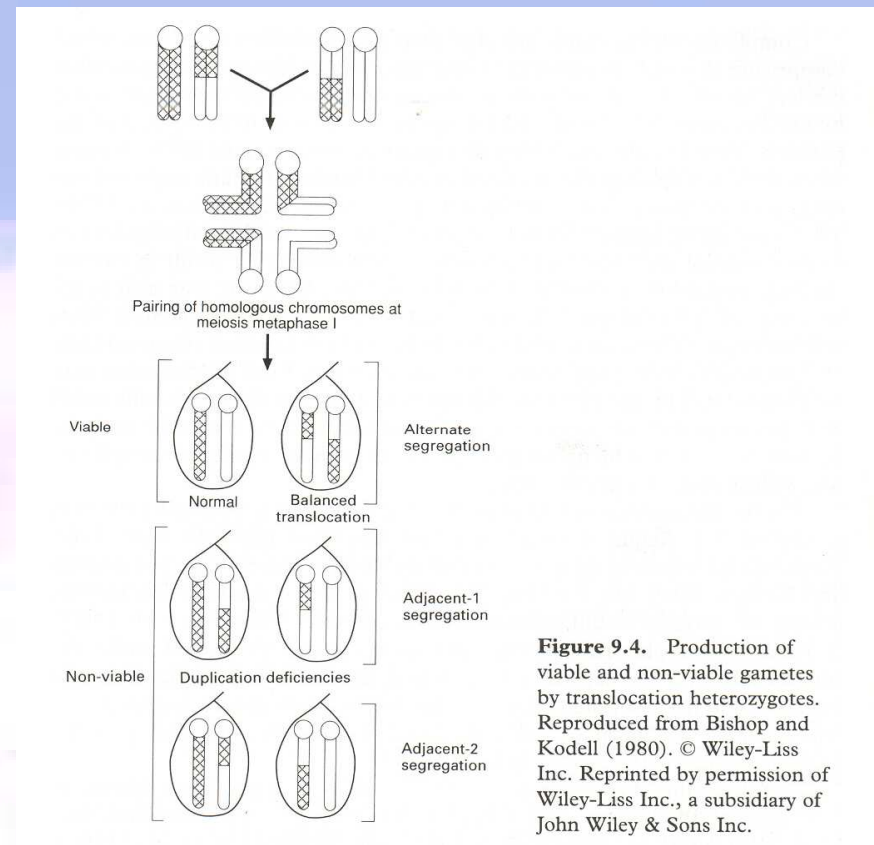


Figure 9.4. Production of viable and non-viable gametes by translocation heterozygotes. Reproduced from Bishop and Kodell (1980). © Wiley-Liss Inc. Reprinted by permission of Wiley-Liss Inc., a subsidiary of John Wiley & Sons Inc.

Použití FISH v genetické toxikologii

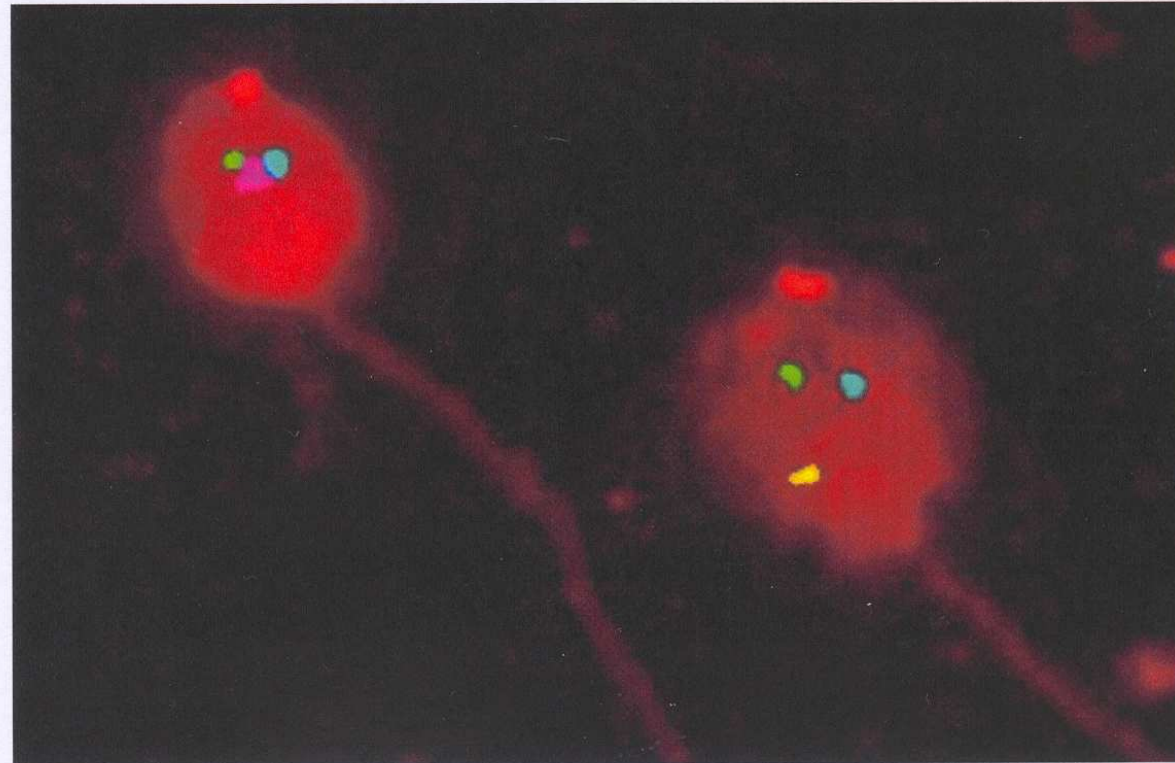
Materiál: lymfocyty, b. bukální sliznice, spermie...

detekce disomií ve spermiích po působení mutagenů nebo u infertilních mužů

detekce původu mikrojadér - centromerické sondy detegují přítomnost či nepřítomnost centromery v mikrojadře

detekce stabilních chromozomových aberací - translokace

Vyšetření spermíí – testy na detekci abnormality tvaru spermie a detekce aneuploidie ve spermíích



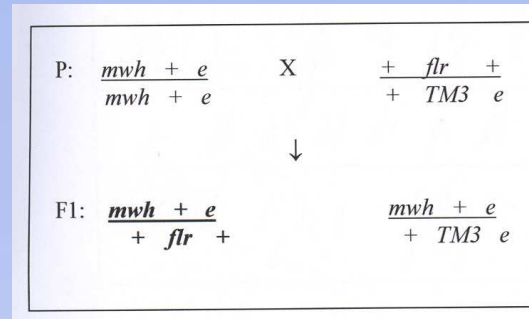
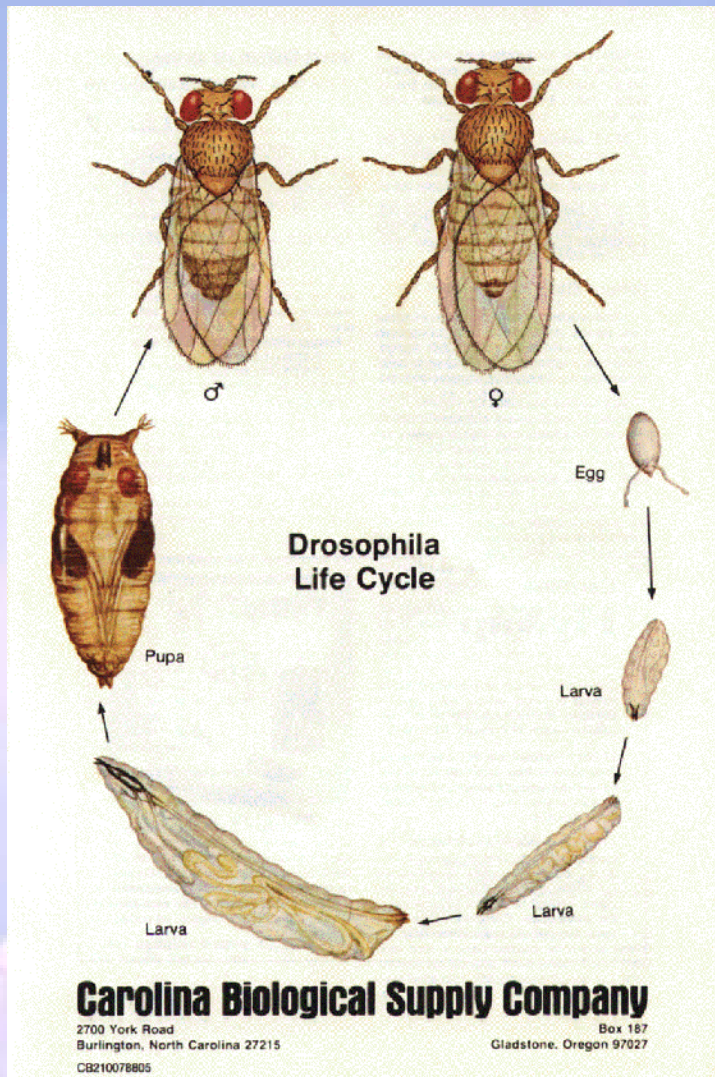
4. **Vyšetření aneuploidií chromozomů ve spermíích.** Jedná se o lidské spermie pro jejichž vyšetření byla použita směs pěti DNA sond. Červený signál identifikuje chromozom 13, zelený 21, modrý 18, žlutý Y a fialový X. Jedna spermie nese chromom X (vlevo), druhá Y.

Testy mutagenity na *Drosophila melanogaster*

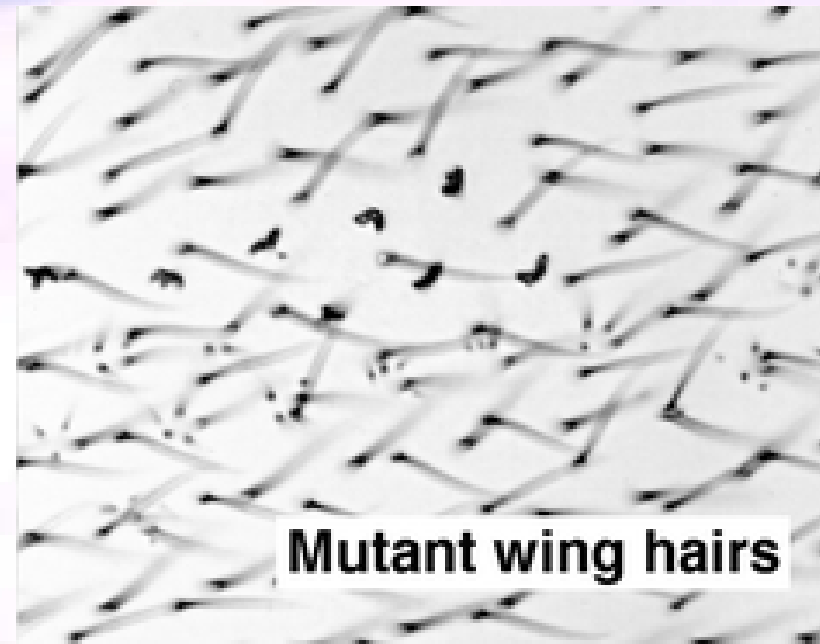
- test na detekci somatických mutací a rekombinací (SMART)
- detekce recesivně letálních na pohlaví vázaných mutací (Basc, CIB)



Test na detekci somatických mutací a rekombinací (SMART) u *Drosophila melanogaster*



Obr.4. Schema křížení kmene *mwh* a *flr*, za vzniku transheterozygotních jedinců.



Wing spot test

APLIKACE: WING SPOT TEST

POSTUP:

1. VÝBĚR VIRGINELNÍCH SAMIČEK KMENE *FLR*
2. KŘÍŽENÍ SE SAMEČKY KMENE *MWH*

SAMEČEK		SAMIČKA
$\frac{mwh + e}{mwh + e}$	X	$\frac{+ flr^3 +}{+ TM1 e}$
	↓	
$\frac{mwh + e}{+ flr^3 +}$		

3. VÝBĚR LARVIČEK SE PROVÁDÍ PO 72-14 HODOD NAKLADENÍ VAJÍČEK
4. APLIKACE CEMICKÉ LÁTKY
POTRAVNĚ
INHALAČNĚ
INJEKČNĚ
AKUTNĚ (1-6 HOD)
CHRONICKY (48-96 HOD)
5. VÝBĚR IMÁG SAMIČEK
6. PREPARACE KŘÍDEL A JEJICH FIXACE NA TRVALÝ PREPARÁT
7. MIKROSKOPICKÉ PROHLÍŽENÍ PŘI ZVĚTŠENÍ 400-500X

Fenotypové projevy mutace mwh a flr



Obr.1. Mutace typu mwh



Obr.2. Mutace typu flr³

SMART test

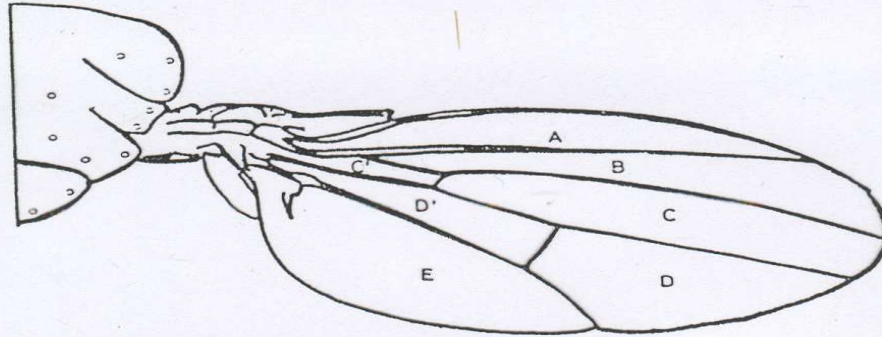
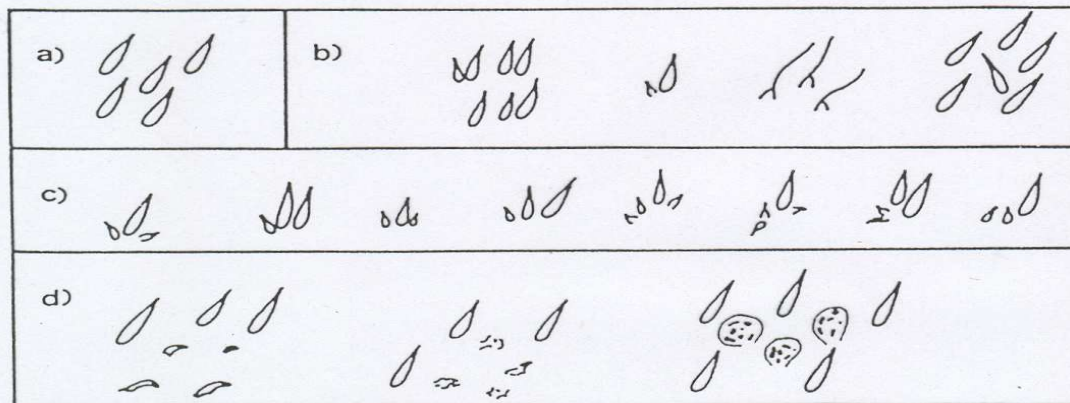


Fig. 2. Normal half mesothorax showing the regions A-E of the wing surface scored for spots (after Garcia-Bellido and Merriam [1971a]).



mwh
flr

Fig. 3. Trichomes on the wing blade. a) Normal, b) deviate trichomes not counted as mwh or flr, c) configurations indicative of mwh, d) typical manifestations of flr.

SMART test - princip

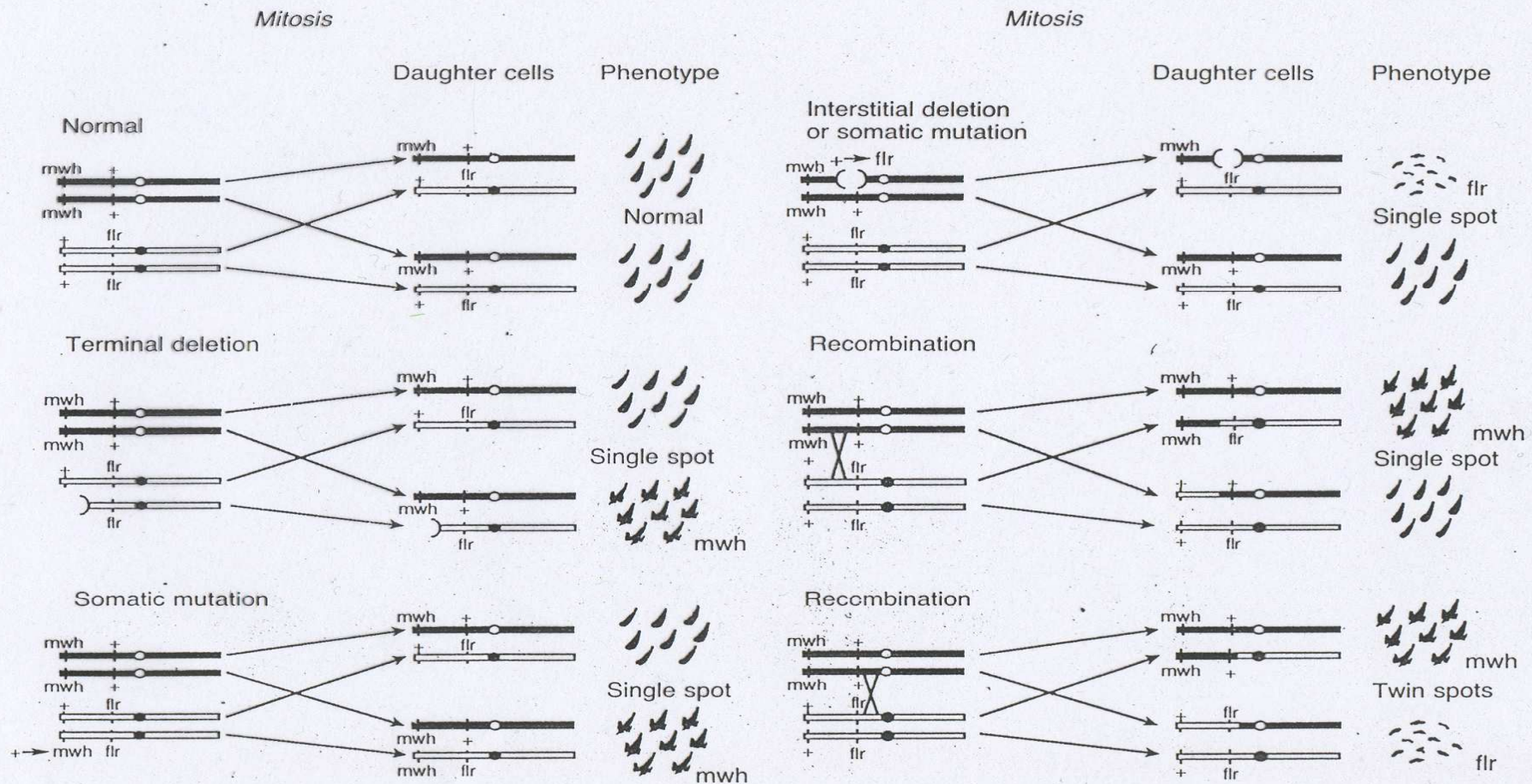
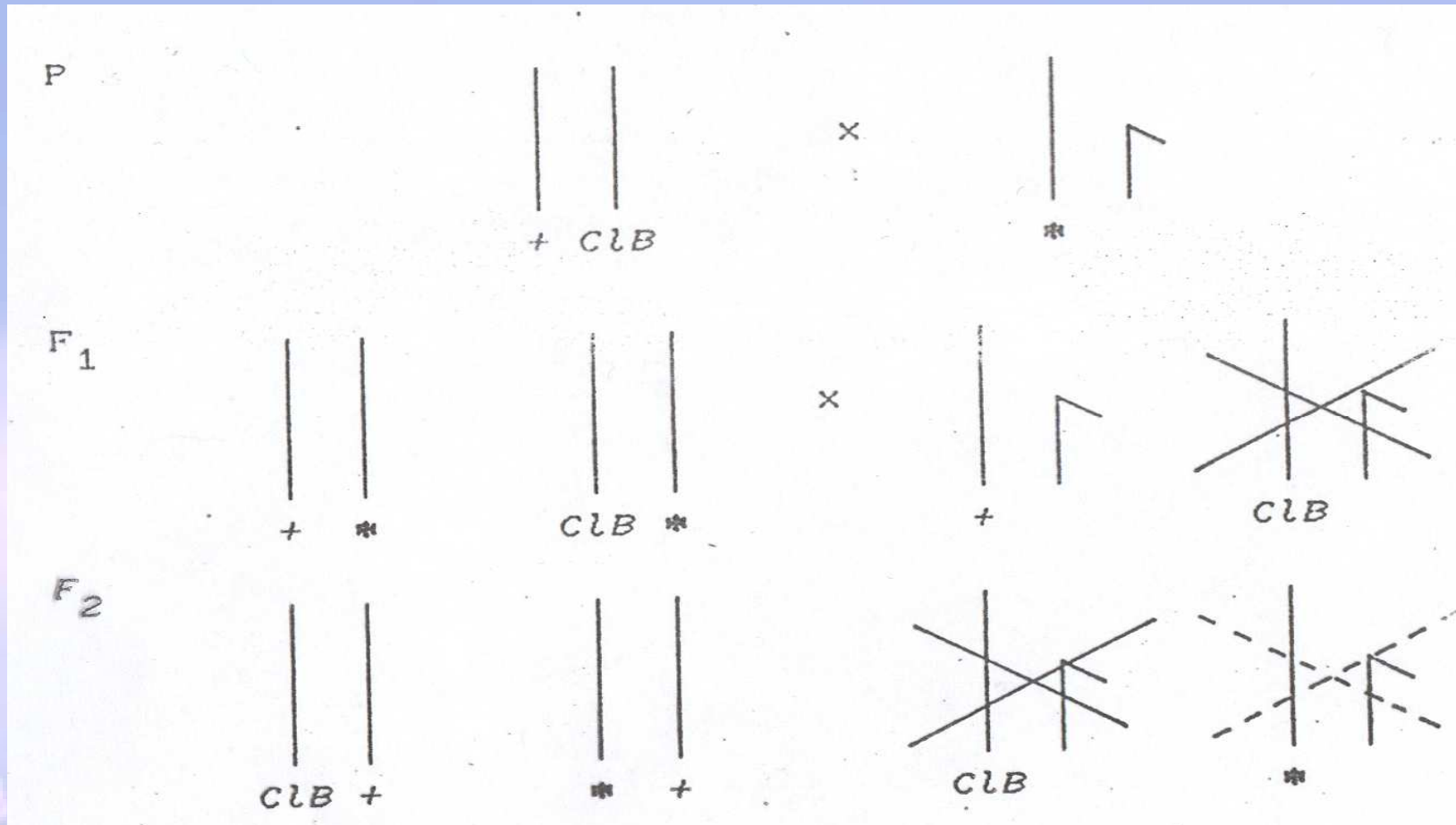


Fig. 2. The origin of mosaicism during mitotic divisions in the wing. Point mutation or deletion of *mwh* and *flr* gives rise to single spots. Recombination between *mwh* and *flr* gives rise to a *mwh* single spot. Twin spots of *mwh* and *flr* are produced by recombination between the centromere and *flr*.

ClB test u *Drosophila melanogaster*

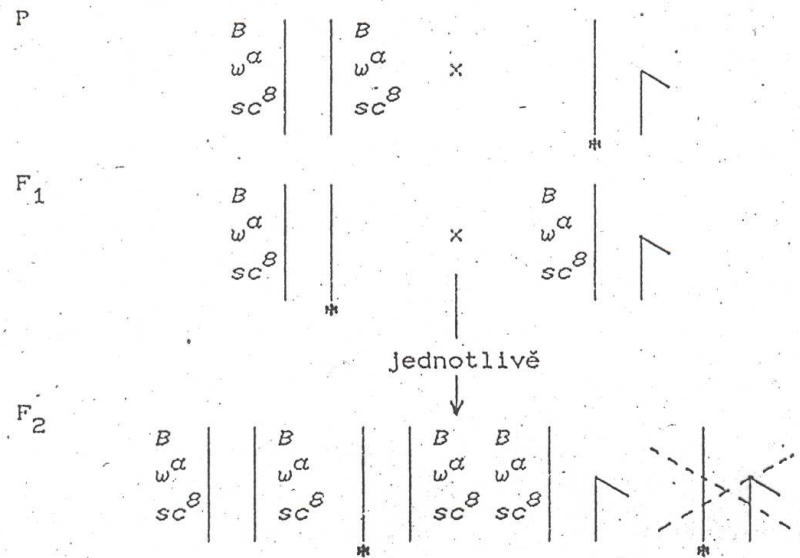


1.7.16 Detekce recesivně letálních na pohlaví vázaných mutací
(Basc, M-5)

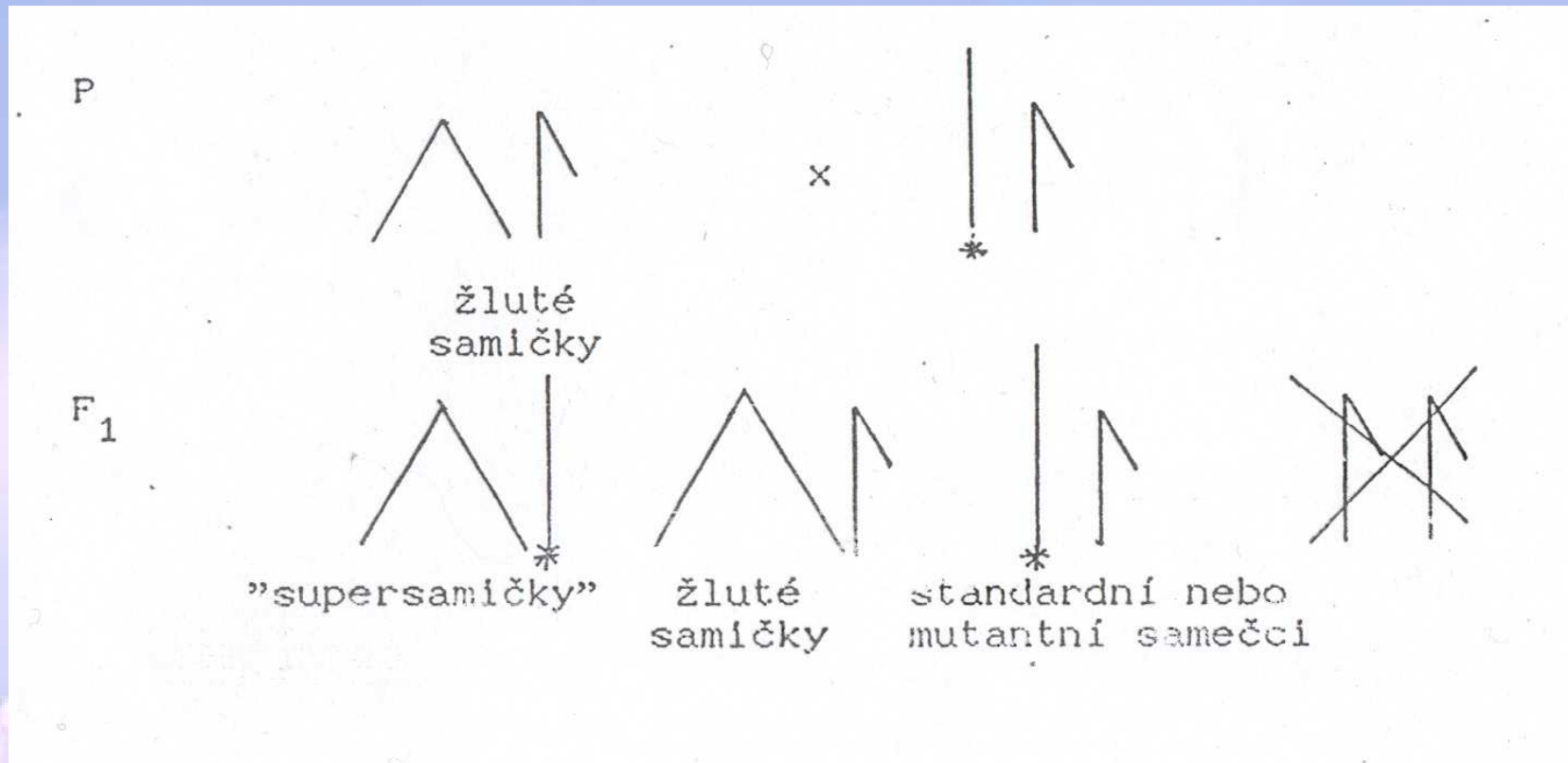
Cíl: Seznámení se s testovacím kmenem Basc (M-5) a metodou detekce mutací.

Samičky testovacího kmene jsou homozygotní pro alely B , w^α a sc^B lokalizované na chromozómu X. B je alela bar podmiňující zmenšení počtu očních facet a tedy zúžené oči, w^α je recesivní alela podmiňující meruňkové zbarvení očí (apricot) a sc^B znamená oblast scute s inverzí zabraňující crossing-overu. Tento testovací kmen Basc se někdy také nazývá M-5 (Müller-5).

Při detekci letálních na pohlaví vázaných mutací křížíme samičky testovacího kmene (zúžené oči meruňkové barvy) s testovanými samečký. V F_1 se objeví červenooké samičky se zúženými očima a samečci se zúženými očima meruňkové barvy. Tyto samičky a samečky křížíme jednopárově. V potomstvech jednotlivých párů, tj. v F_2 , sledujeme fenotyp samiček a samečků.



Attached X test – *Drosophila melanogaster*



Spot test u myši (somatické mutace)



**Působení mutagenu na
embrya heterozygotní pro
geny barvy srsti**

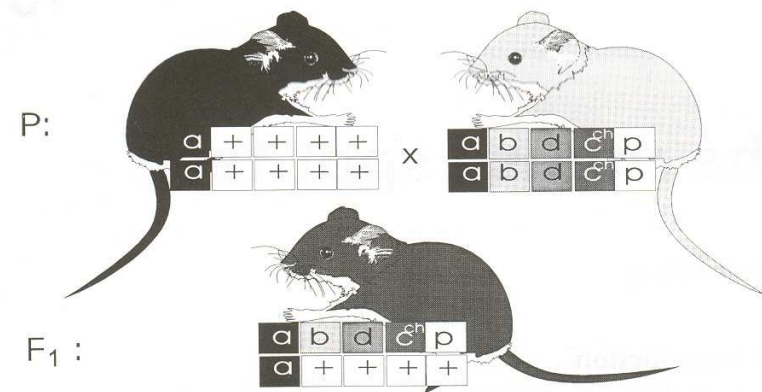


Figure 10.1. Principle of the mouse spot test exemplified with the cross C57BL x T-stock.

Spot test u myši (somatické mutace)

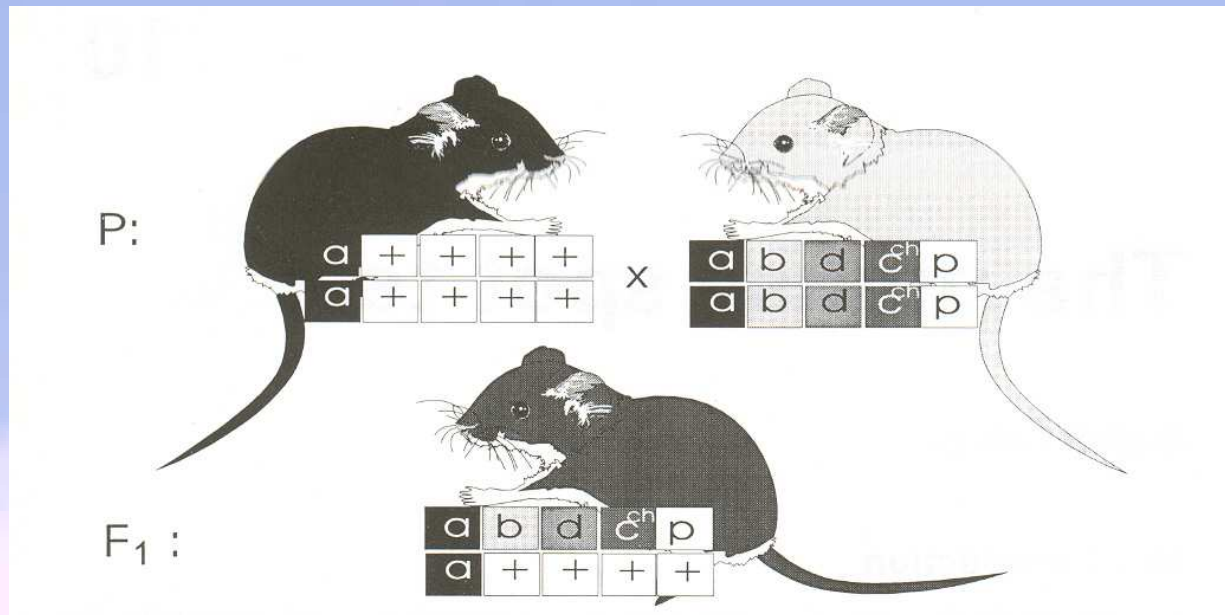


Figure 10.1. Principle of the mouse spot test exemplified with the cross C57BL x T-stock.

10.3 Test principle

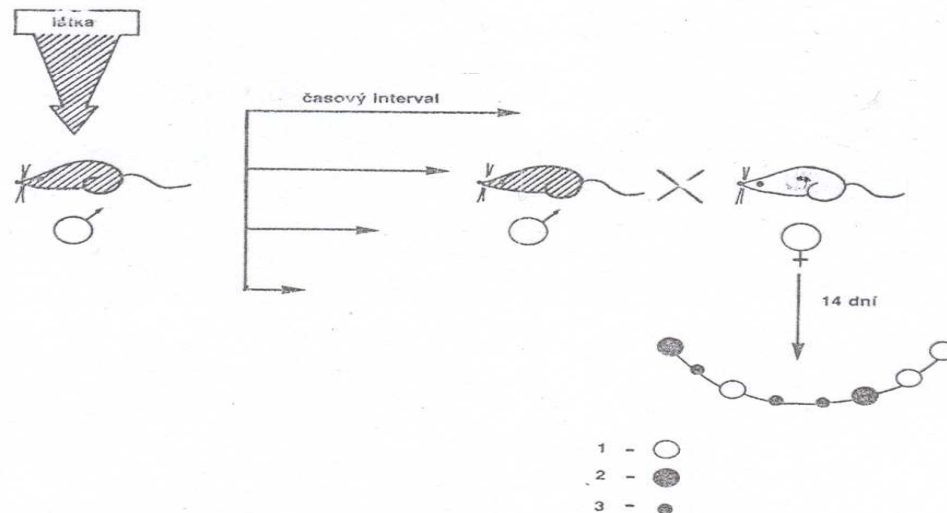
Embryos heterozygous for different recessive coat colour mutations are treated *in utero* with a mutagen, preferably between the 9th and the 11th day of fetal development. This is normally performed by intraperitoneal (i.p.) injection or treatment *per os* of the mother. If this treatment leads to the alteration or loss of the wild-type allele of one of the recessive coat colour genes in a pigment precursor cell, a colour spot will develop after several cell divisions.

Test na stanovení dominantních letálních mutací

Test na stanovení dominantních letálních mutací

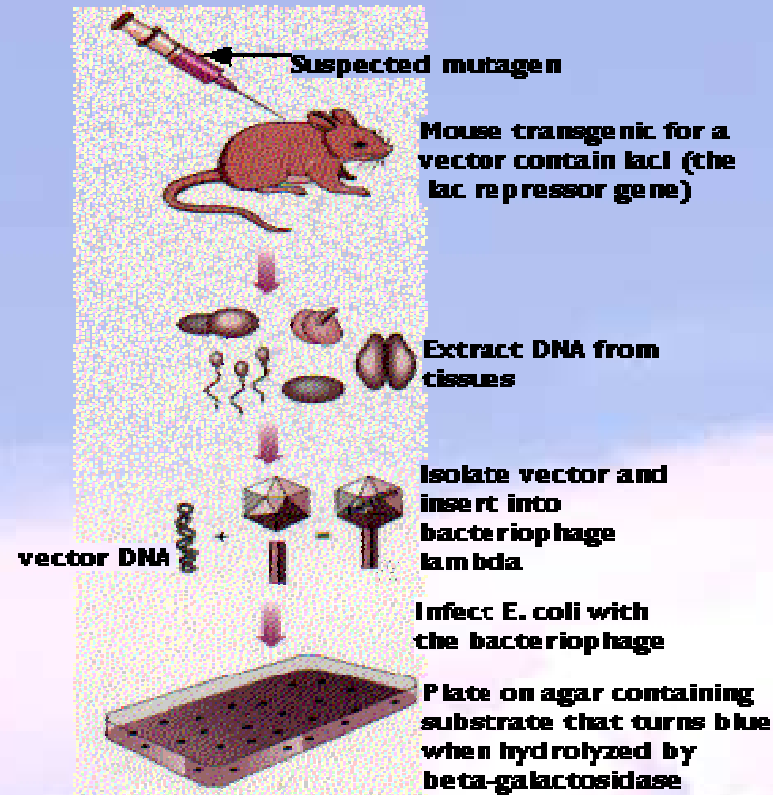
Testem jsou analyzovány genetické změny indukované v pohlavních buňkách (při ovlivnění samců v jednotlivých stadiích zrání spermií, tj. spermatogeneze), které se manifestují po oplodnění samice zastavením raných stadií vývoje zárodku (obr. 59). Podstatou smrti zygot je vznik strukturálních chromozómových mutací (např. translokace), genomových mutací (např. aneuploidie) a také je předpokládán podíl genových mutací (zejména genů řídicích vlastní buněčné dělení).

Látkou ovlivnění samci jsou kříženi po několik týdnů v týdenních intervalech s neovlivněnými samicemi. Dominantní letalita je určována pitváním samic 13.—16. den po zabřeznutí. Stereomikroskopem je zjišťován počet žlutých tělísek ve vaječnicích, v děloze počet živých (1) a resorbovaných (2, 3) zárodků. Ze získaných hodnot jsou určovány charakteristiky dominantní letality.



Obr. 59 Schéma testu na stanovení dominantních letálních mutací u myši (vysvětlení v textu).

Detekce mutací – transgenní myši



Cells with **unmutated** lacI gene produce repressor so no beta-galactosidase is synthesized.

Colorless plaques

Mutation frequency =

Cells with **mutated** lacI gene produce defective lac repressor so beta-galactosidase is synthesized.

Blue plaques

Number of blue plaques
Total number of plaques

Testy na detekci genových mutací v savčích buňkách *in vitro*

Materiál: buňky myšího lymfomu L5178Y a buňky čínského křečka linie V-79

Stanovení mutací v tymidinkinázovém lokusu TK

Buňky deficientní v TK lokusu (TK-) vykazují rezistenci k pyrimidinovému analogu trifluorotyminu (TFT), neboť tento metabolit není inkorporován do DNA. V přítomnosti enzymu TK je však TFT zabudován do DNA – cytotoxicita

Stanovení mutací v HPRT genu (hypoxantinfosforybosyltransferázový gen)

HPRT gen (vázaný na X chromozom) kóduje enzym, který normálně fosforyluje guanin nebo hypoxantin. Této fosforylaci podléhá též **6-thioguanin** (6TG), který se přeměňuje na 6 thioguaninmonofosfát (toxický). Detekce mutantních buněk – vytváří kolonie za přítomnosti 6TG

Frekvence u zdravých lidí je asi $12,5 \times 10^{-6}$

Testy na mutagenitu u rostlin

ROSTLINNÉ TESTOVACÍ SYSTÉMY

TESTY NA GENOVÉ MUTACE:

A. TESTY NA SOMATICKÉ MUTACE:

Glycine max - Spot test
Tradescantia - Stamen hair test

B. TESTY NA GAMETICKÉ MUTACE:

Arabidopsis thaliana - Mullerův šešulový test
Hordeum vulgare - detekce chlorofyl. mutantů v M_2
Zea mays - detekce recesivních mutantů v M_2
- "waxy" test v pylových zrnech

TESTY NA CHROMOZOMOVÉ MUTACE:

- analýza chromozomálních aberací v metafázi nebo anafázi
- detekce SCE
- mikrojaderný test

TESTOVACÍ ORGANISMY:

- *Allium cepa* ($2n = 16$)
- *Hordeum vulgare* ($2n = 14$)
- *Vicia faba* ($2n = 12$)

Rostlinné testy na detekci mutagenů



Mullerův embryonálně letální test u *Arabidopsis thaliana*

- test na detekci recesivních embryonálně letálních a chlorofylově defektních mutací
- sledování embryí budoucí generace v nezralých semenech v šešulích rodičovských rostlin

Příprava základního roztoku $0,25 \text{ mmol.l}^{-1}$ MNU (m.h.=103):

1 mmol.l^{-1} MNU = 10,3 mg/100 ml pufru

$2,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ MNU = 5,15 mg/ 20 ml pufru

1 ml $2,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ MNU + 9 ml pufru = 10 ml $0,25 \text{ mmol.l}^{-1}$ MNU

Pufr: $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ citrát-fosfátový pufr: 5,1 g kys. citronové +
18,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ rozpustíme v 1.000 ml vody.

Pro každou koncentraci použijeme asi 500 semen (12 mg) a namočíme je v 4 až 5 ml zkumavkách do 2 ml (2 000 μl) roztoku na dobu 24 hod. ve tmě při 25°C . Potom roztok se semeny přelejeme přes nálevku s filtračním papírem. Semena na filtračním papíru v nálevce pak 30 min. promýváme vodovodní vodou.

Semena vyséváme do truhlíků se zemínou tak, jak bylo uvedeno výše. Od každé koncentrace vysejeme semena do 120 až 150 jamek.

Před začátkem dozrávání šesulí hodnotíme četnost embryonálních letálních a chlorofylových mutací embryonálním testem. Zároveň hodnotíme stupeň sterility, tj. relativní počet semen v těch třech po sobě následujících šesulích, ve kterých sledujeme případná mutantní embrya. V každé variantě působení hodnotíme celkem 100 rostlin, tj. 300 šesulí.

Při hodnocení zapisujeme u každé šesule, zda se v ní vyskytla některá embryonální nebo chlorofylová mutace. Četnost mutací se vyjádří jako procento šesulí, ve kterých se vyskytly mutace (do hodnocení se nezapočítávají šesule, které mají 3 nebo méně semen).

K vyjádření stupně sterility zařazujeme hodnocené šesule do čtyř tříd podle počtu semen včetně mutantních:

třída 1 0 až 3 semena

třída 2 4 až 16 semen

třída 3 17 až 29 semen

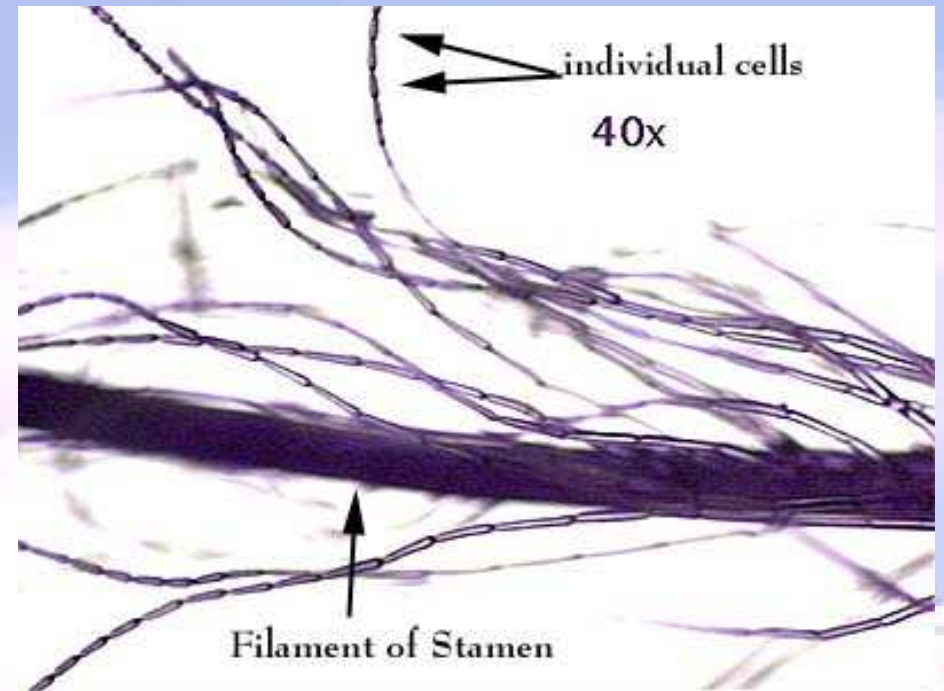
třída 4 30 a více semen.

Spočítáme počet šesulí v každé třídě a vyjádříme je jako procento z celkového počtu šesulí. Toto procento vynásobíme koeficientem. Pro třídu 1 je tento koeficient 1, pro třídu 2 = 0,75, pro třídu 3 = 0,25 a pro třídu 4 = 0. Součet hodnot (% krát koeficient) vyjadřuje stupeň sterility.

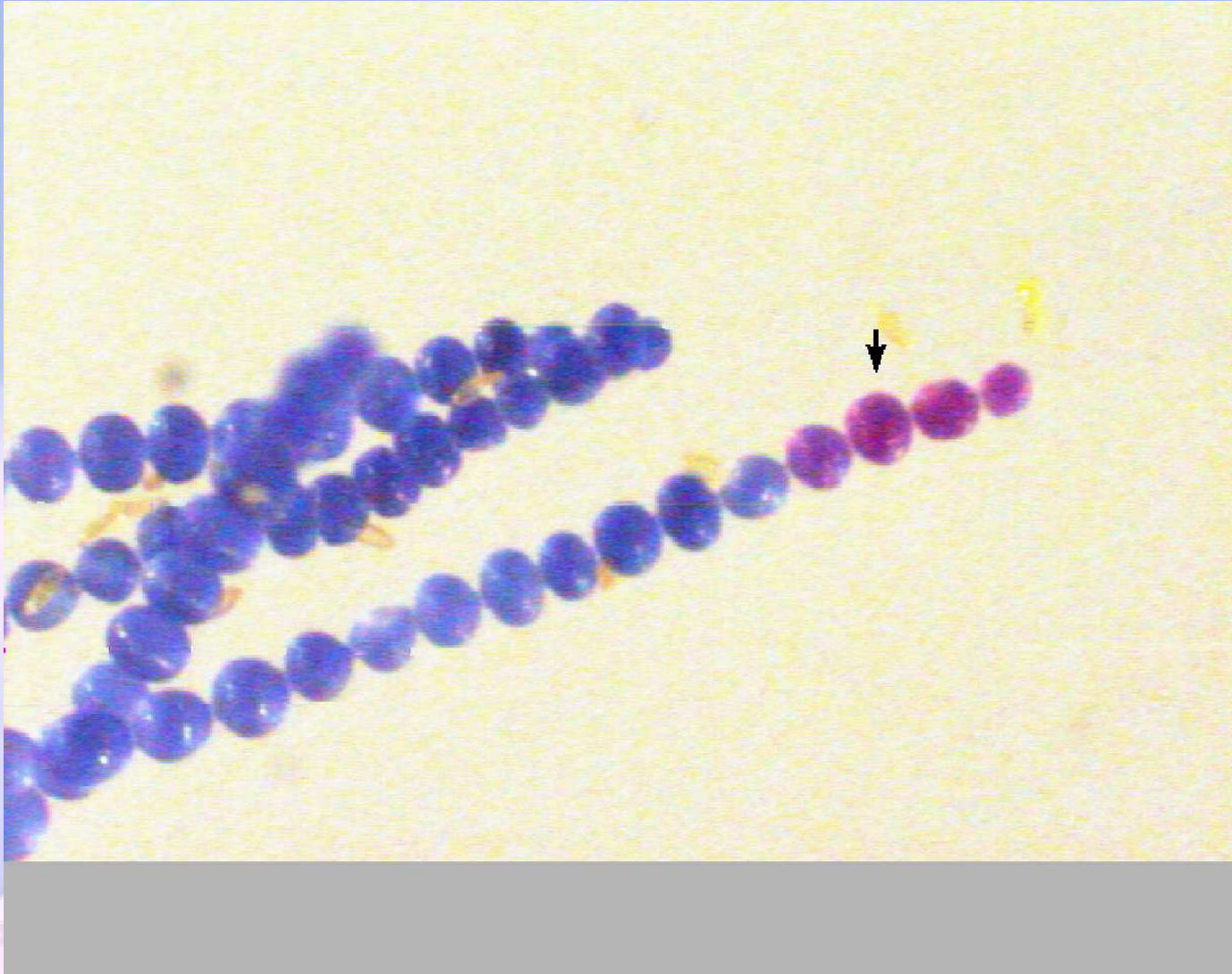
Tradescantia test – test na detekci somatických mutací

- test je založený na výskytu somatických mutací v **trichomech** tyčinek květů klonu *Tradescantia occidentalis*, tento hybridní klon vznikl mezidruhovou hybridizací **T. hirsutiflora** (modrá barva květů) s a *T. subacaulis* (růžové květy)
 - po **mutaci** nebo **deleci** dominantní alely se fenotypově projeví recesivní alela pro **růžové zbarvení**
 - **klon 4430 – citlivý k chem. mutagenům,**
 - **klon 02 – citlivý k účinku ionizujícího záření**
 - Působení mutagenu na: řízky, poupata
 - **každé květenství: 20 poupat, každý květ – 6 tyčinek, každá tyčinka – 50 trichomů**
 - **hodnotí se asi 10 květů**
 - Vhodné pro testování herbicidů, fungicidů, insekticidů, exhaláty ovzduší, znečištění vody, půdy
-

Tradescantia test



Tradescantia test - mutace



Příklady využití *Tradescantia* testu

Mutation Research, 270 (1992) 23–29

© 1992 Elsevier Science Publishers B.V. All rights reserved 0027-5107/92/\$05.00

23

MUT 00341

Tradescantia stamen-hair mutation bioassay on the mutagenicity of radioisotope-contaminated air following the Chernobyl nuclear accident and one year later

Antonina Cebulska-Wasilewska

Radiobiology Department, Institute of Nuclear Physics, 31-342 Cracow, Poland

(Accepted 11 February 1992)

Keywords: Tradescantia bioassay; Somatic mutations; Chernobyl

Summary

This paper presents results of the research on the mutagenic effect of ambient air in the Cracow area. Initial studies were conducted in May 1986, following the Chernobyl accident. Other studies were performed at various sites within the Cracow area in the Spring of 1987. Counts were made of stunted hairs and pink cells in the stamen hairs of *Tradescantia* clone 4430. Mutations scored from the 11th day after the beginning of exposure were used as a measure of the mutagenic effect. The mean mutation frequencies measured in 1986 and 1987 were 0.43 and 0.21 per 100 hairs respectively. The time-dependent development of mutation frequencies observed after the Chernobyl accident showed a correlation with the time-dependent development of total radioactivities measured in the air at that time. The results obtained in 1987 showed on average a significant decrease of ambient air mutagenicity. Still, the variation of mutation rates observed during the investigated period at different sites in the Cracow area was rather high (0.09–0.38 mut/100 hairs). Only the highest frequencies observed in the Spring of 1987 were comparable to the level detected after the Chernobyl accident.

Jpn. J. Genet. (1991) 66, pp. 27–40

Somatic mutation frequencies in the stamen hairs of *Tradescantia* grown in soil samples from the Bikini Island

Sadao ICHIKAWA and Chizu ISHII

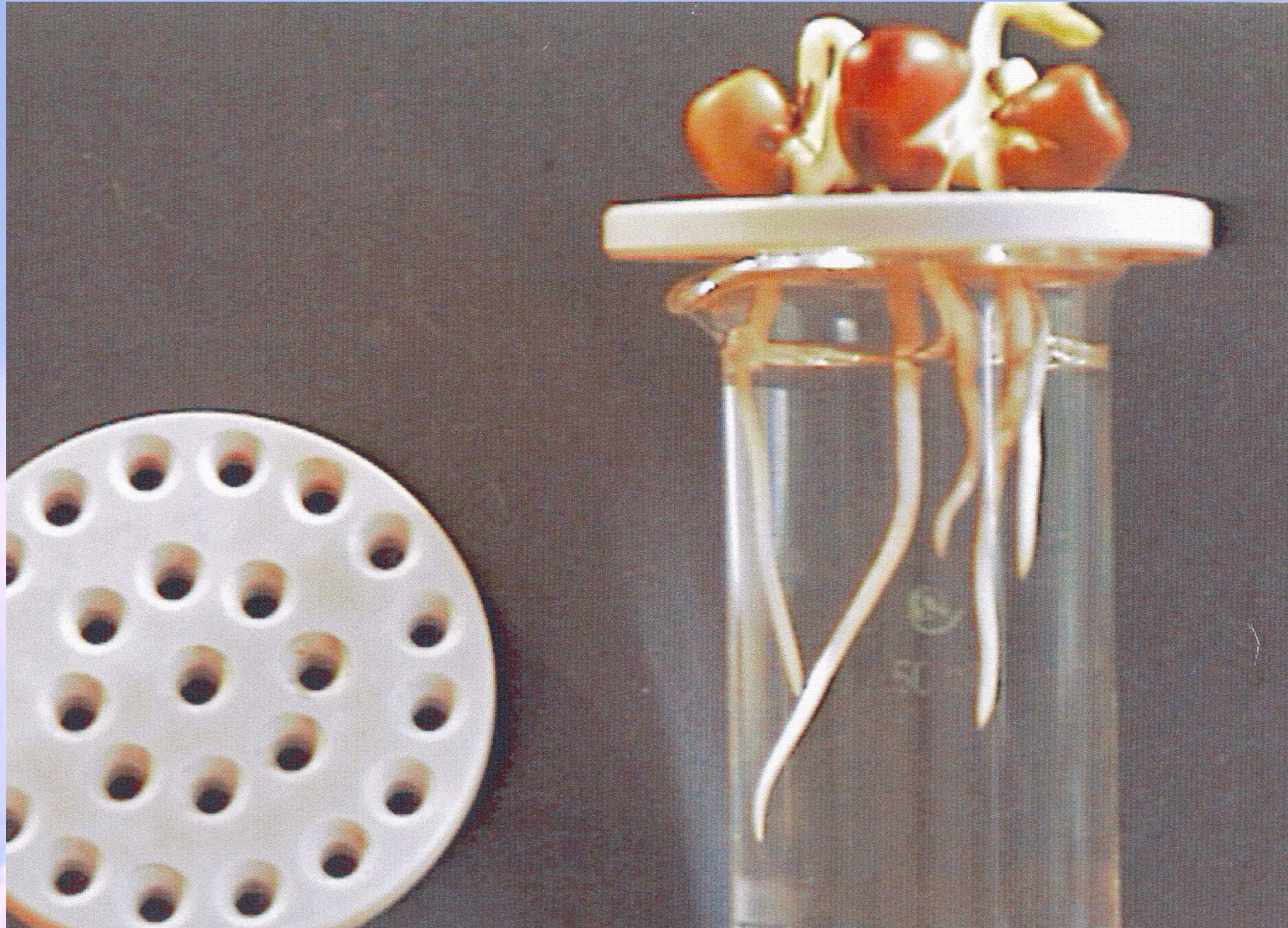
*Laboratory of Genetics, Department of Regulation Biology,
Faculty of Science, Saitama University, Urawa 338*

(Received 11 October 1990)

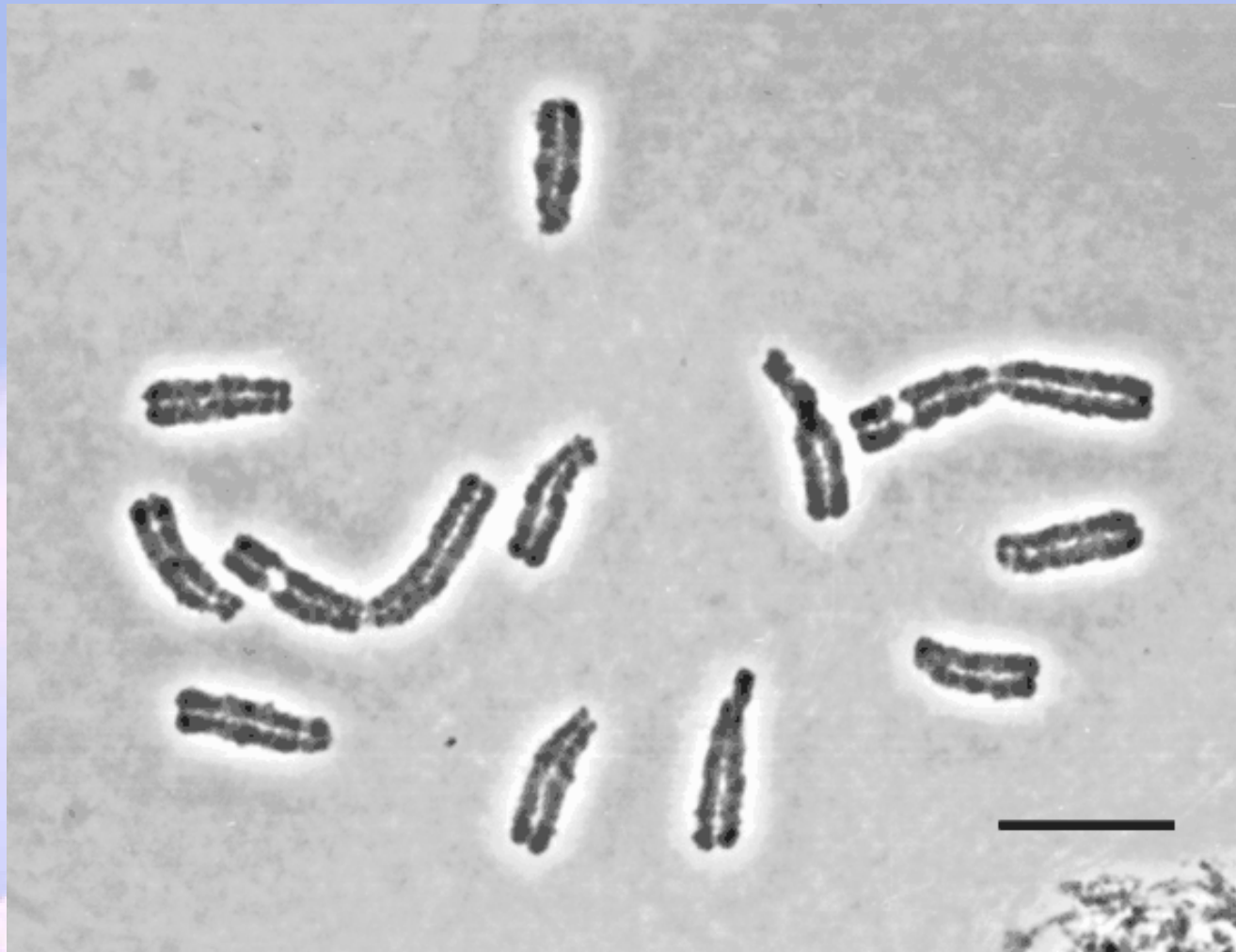
ABSTRACT

Somatic pink mutation frequencies in the stamen hairs of *Tradescantia* BNL 02 clone grown for 76 days in two soil samples taken from the Bikini Island (where a hydrogen bomb explosion test had been conducted in 1954) were investigated. A significantly high mutation frequency (2.58 ± 0.17 pink mutant events per 10^3 hairs or 1.34 ± 0.09 pink mutant events per 10^4 hair-cell divisions) was observed for the plant grown in one of the two Bikini soil samples, as compared to the control plants (1.70 ± 0.14 or 0.88 ± 0.07 , respectively) grown in the field soil of Saitama University. The soil sample which caused the significant increase in mutation frequency contained $6,880 \pm 330$ mBq/g ^{137}Cs , 62.5 ± 4.4 mBq/g ^{60}Co , and some other nuclides; a $150 \mu\text{R/hr}$ exposure rate being measured on the surface of the soil sample. The effective cumulative external exposures measured for the inflorescences of the plant grown in this soil sample averaged at most 60.8 mR, being too small to explain the significant elevation in mutation frequency observed. On the other hand, internal exposure due to uptake of radioactive nuclides was estimated to be 125 mrad (1.25 mGy) as an accumulated effective dose, mainly based on a gamma-spectrometrical analysis. However, it seemed highly likely that this value of internal exposure was a considerable underestimate, and the internal exposure was considered to be more significant than the external exposure.

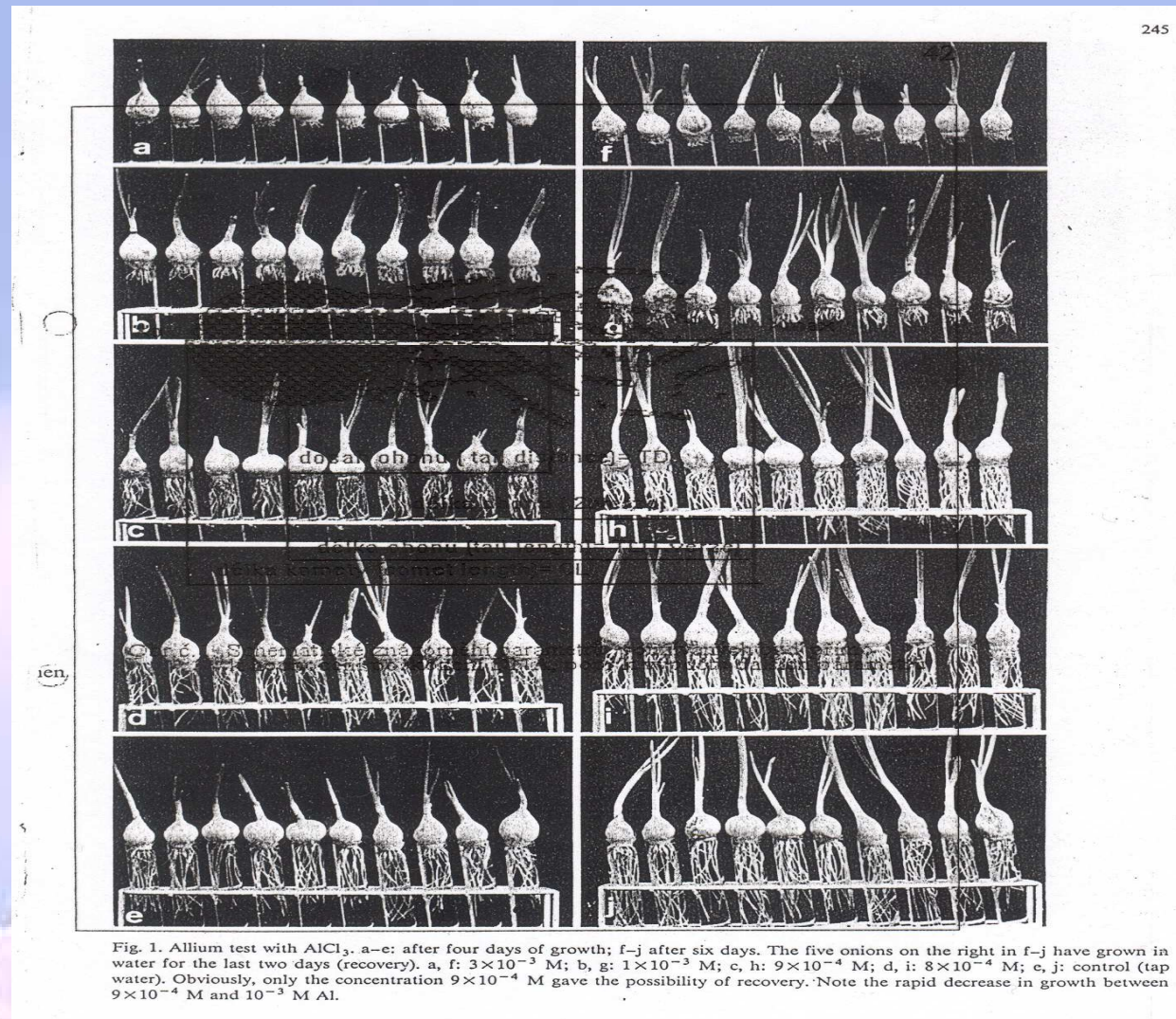
Vicia faba test



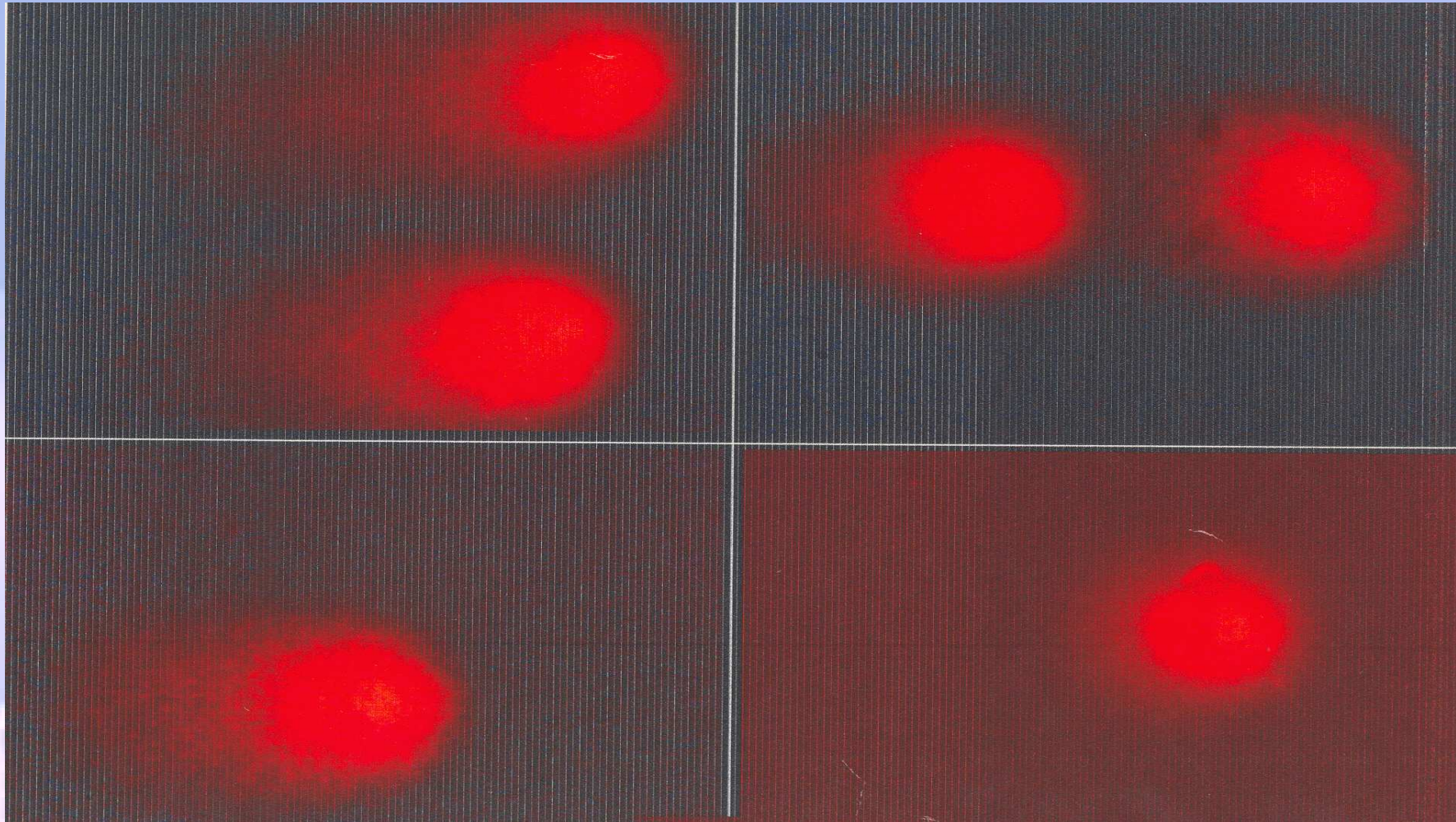
Detekce chromozomových aberací v meristematických buňkách kořenových špiček *Vicia faba*



Allium cepa – kořínkový test (možno detegovat chromozomální aberace, mikrojádra)



**Kometový test (comet assay)
technika detegující poškození DNA a reparaci v
individuálních buňkách**



Kometový test

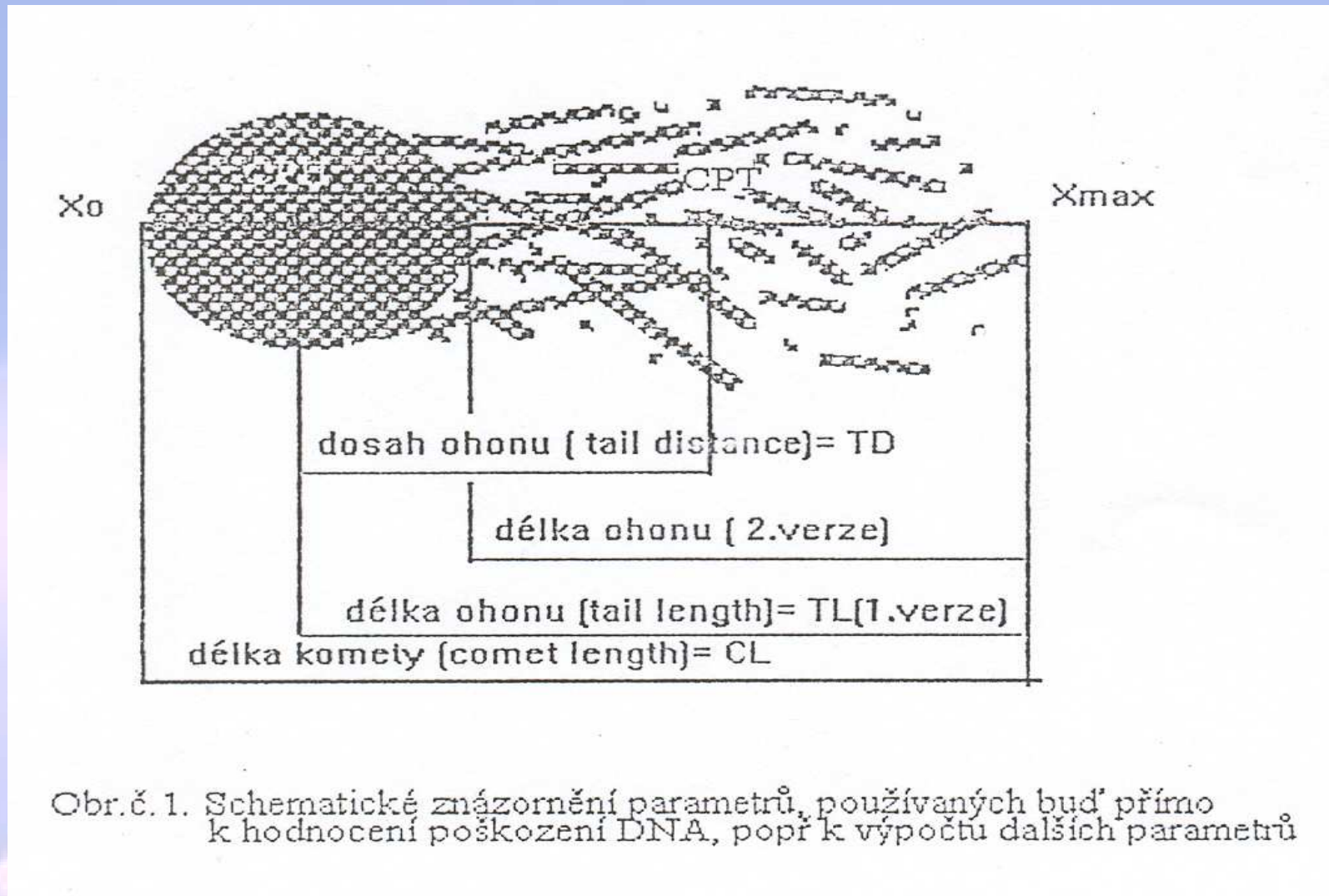
(SCGE – gelová elektroforéza jednotlivých buněk)

- stanovení **zlomů DNA** nebo lézí vedoucích ke zlomům v jednotlivých buňkách (DSB, SSB)

Princip:

- izolace buněk (krev)
 - nanesení na mikroskopická skla s agarózou (2 vrstvy)
 - lze buněk (lyzační pufr, detergenty a soli o vysoké koncentraci)
 - dentaurence
 - elektroforéza – DNA migruje k anodě
 - barvení fluorescenčním barvivem
 - pozorování pod mikroskopem, měření délky komet (jader)
 - délka ohonu je úměrná počtu zlomů !!!
-

Kometový test – parametry používané k hodnocení úrovně poškození DNA



Příklad použití kometového testu

worth et al. (1987). Mean net silver grains per nucleus (i.e., nuclear grains minus cytoplasmic grains) were assessed for 50 cells per culture and two cultures per animal.

Determination of DNA damage using the microgel assay was done according to the method of Singh et al. (1988). Briefly, suspensions of V79 cells, hepatocytes, peripheral blood or bone marrow tritiated in fetal bovine serum were centrifuged at $100 \times g$ and resuspended in 0.5% low melting agarose,

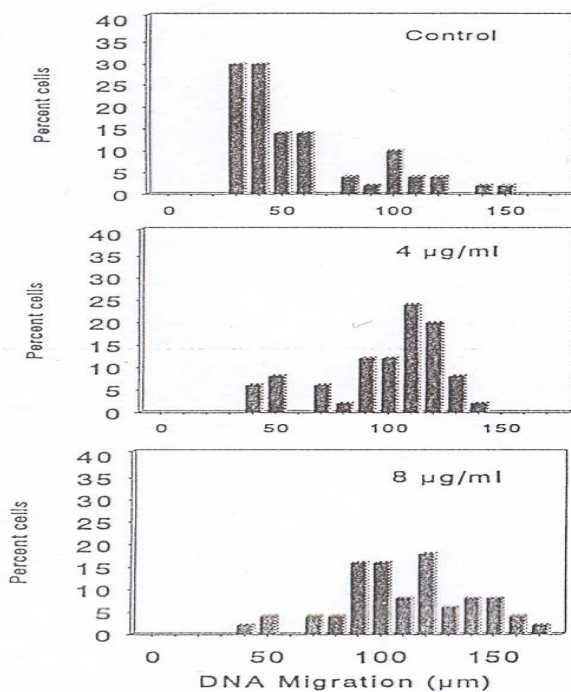


Fig. 1. Distribution of DNA migration in V79 cells treated with CP. Control treated with vehicle (water) at a final concentration of 1%.

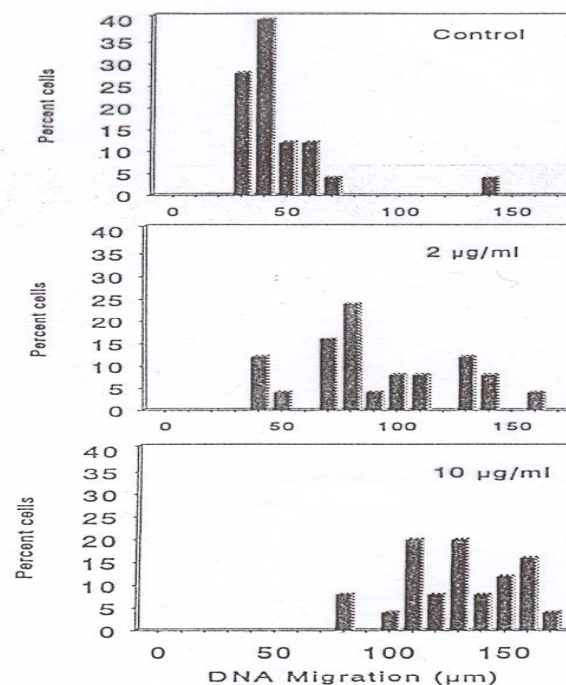


Fig. 2. Distribution of DNA migration in V79 cells treated with BP. Control treated with vehicle (DMSO) at a final concentration of 1%.

and then added to agarose-coated slides. The slides were immersed in cold lysing solution (2.5 mM NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% sarcosinate, 1% Triton X-100 at pH 10) overnight, after which time the slides were placed in an electrophoresis tray with an alkaline-EDTA (300 mM NaOH and 1 mM EDTA) buffer for 20 min to allow the DNA to unwind. Electrophoresis was conducted at room temperature for 20 min at 25 V and approx. 300 MA. The slides were washed, stained with ethidium bromide, and cover-slipped. Using a