

# **Testy na detekci mutací Genotoxicita**

---

# Genetická toxikologie

**Toxikologie** - zkoumání negativního vlivu chemických sloučenin na živé organizmy

**Genetická toxikologie** - 70. léta 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
-

# 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)
-

# Cíle genetické toxikologie

- studium mechanismu účinků různých genotoxických faktorů
  - vývoj detekčních systémů s požadovanými vlastnostmi
  - hodnocení genotoxického potenciálu látek
  - analýza environmentálních směsí
  - hodnocení **expozice** vybraných populací
  - studium vlivu genotoxických vlivů na výskyt **vybraných onemocnění**
  - studium geneticky determinované **citlivosti** ke genotoxickým faktorům
-

# Genotoxické látky a karcinogeny

**Nádory** mohou vznikat vlivem expozice člověkem připravených a přírodních karcinogenních látek v potravě, vodě, léčích, tabákovém kouři, ovzduší a působením radonu a infekčních agens. tj. vlivem řady prokarcinogenních a karcinogenních faktorů.

- **Karcinogeny genotoxické** (působí ve fázi iniciace)  
**Poškozují DNA** a jejich účinek je zpravidla ireverzibilní. **Mají primárně bezprahový účinek.** Pro chemické kancerogeny je typický elektrofilní charakter a schopnost vytvářet kovalentní vazby s DNA.  
**Primární (přímé) karcinogeny** mají tyto vlastnosti bez nutnosti biotransformace (např. alkylační látky),  
**Sekundární (nepřímé) karcinogeny** až po biotransformaci (např. aflatoxiny, polycyklické aromatické uhlovodíky, nitrosaminy aj.)
- **Karcinogeny epigenetické**  
**Nereagují přímo s DNA.** Působí jinými mechanismy (**imunosuprese** – purinové deriváty, **hormonální mechanismy** – **estrogeny**, cytotoxické účinky atd.). Tyto látky se někdy nazývají **promotory** a navazují na předchozí poškození DNA buňky.

# Mutace vs. epimutace (epigenetické změny)

**Epimutace** – jakékoliv změny ve fenotypu, **které nejsou důsledkem změny sekvencí DNA.** Tyto změny mohou být stabilní a dědičné a zahrnují změny **v metylaci DNA, kontrole transkripce a translace a postranlačních modifikace.**

- **Epigenetické procesy** lze definovat jako **modulace genové exprese** prostřednictvím mechanismů, které jsou nadřazeny dané primární sekvenci – např. odlišná **exprese různých kopií stejného genu (alel)** – dvě alely někdy i se **shodnou primární genetickou informací** se dědí do potomstva v odlišných stavech (**genomový imprinting**).
-

# 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**

---

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

## Prospektivní přístup

- 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. a expozice odpovědi lidského organismu na působení genotoxicky aktivních faktorů prostředí.*

## Retrospektivní přístup

---



# Identifikace mutagenní aktivity sloučeniny

- **informační zdroje...**
- **metoda SAR** (structure-activity relationship) – počítačové modelování a simulace (např. reakce s DNA)

**biologické testy mutagenity**

---

# Informace o mutagenních/karcinogenních vlastnostech jednotlivých chemikálií (př. 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 o 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

**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 předstřížený (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 rozznat 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 materiálů, proto se snažíme uvést takové CAS číslo, které by vystihovalo produkt co nejlépe. 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 číselný ekvivalent jsou určeny pouze pro vnitřní potřebu firmy.  
**N** Číslo standardních rizikových a bezpečnostních vet  
**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.

O oxidující	F+ výsoce hořlavý	T extrémně hořlavý	T toxický	T+ výsoce toxický
Xi dráždivý	Xn zdraví škodlivý	C žiravý	E výbušný	N nebezpečný pro životní prostředí

## Bezpečnostní listy

## Výstražné symboly

**H-věty** jsou standardní věty o nebezpečnosti chemických látek a jejich směsí. Jsou součástí globálně harmonizovaného systému klasifikace a označování chemikálií a nahrazují dřívější **R-věty** se stejným účelem a obdobným obsahem.

**H341** Podezření na genetické poškození

**H350** Může vyvolat rakovinu

**H351** Podezření na vyvolání rakoviny

**P-věty** jsou standardizované pokyny pro bezpečné zacházení s chemickými látkami a jejich směsmi

# 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**.

International Agency for Research on Cancer



### International Programme on Chemical Safety

#### International Programme on Chemical Safety



Through the International Programme on Chemical Safety (IPCS), WHO works to establish the scientific basis for the sound management of chemicals, and to strengthen national capabilities and capacities for chemical safety.

Chemical safety is achieved by undertaking all activities involving chemicals in such a way as to ensure the safety of human health and the environment. It covers all chemicals, natural and manufactured, and the full range of exposure situations from the natural presence of chemicals in the environment to their extraction or synthesis, industrial production, transport, use and disposal.

– Ten chemicals of major public health concern



United States Environmental Protection Agency

Search

Learn the Issues | Science & Technology | Laws & Regulations | About EPA | About Administrator McCarthy

# Legislativa

- V současné době je velmi významnou legislativou v zemích Evropské unie nařízení č. 1907/2006 o zřízení programů **Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH)**

a

## **European Chemicals Agency (ECHA)**

- Nařízení se vztahuje na chemické látky, vyráběné a dovážené do Evropské unie v množství větším než je **1 t** za rok.
  - Výrobci, dovozci a uživatelé těchto chemických látek **musí** po zpracování předepsané zprávy o chemické bezpečnosti a **vyhodnocení míry rizika** požádat o jejich registraci u ECHA.
-

# Testy mutagenity

# TESTY NA DETEKCI MUTACÍ

Aneb...jak můžeme mutageny odhalovat ?

AA – (mutagen, mutace) → Aa

Jak dokážeme existenci recesivní mutaci a – fenotypový projev ?



Testovací organizmy a principy testů

**a** - haploidní  
mikroorganismy

diploidní generace M<sub>2</sub>

**Aa x Aa** → **aa**

**Aa** → **aa**

**X<sup>a</sup>Y**

# Příklady testů mutagenity

## cca 200 testů

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

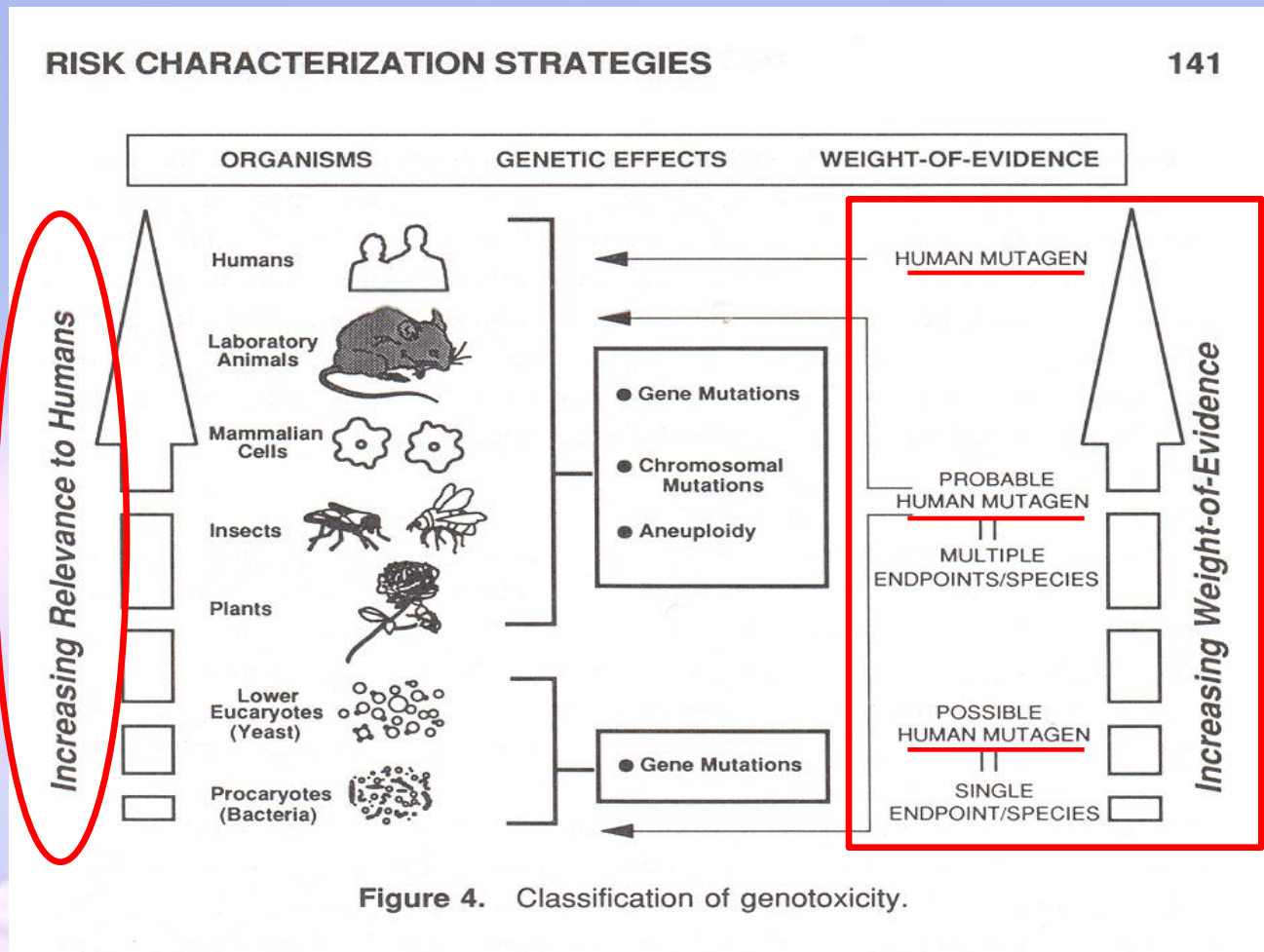
Phylogenetic endpoint	GAP		GTX	NTP
	Chemicals <sup>a</sup>	Entries <sup>b</sup>	Chemicals	Chemicals <sup>c</sup>
Prokaryotes				
DNA damage	115	309	676	
Gene mutation	282	3635	2694	1702 (SAL)
Lower eukaryotes				
DNA damage	18	22		
Recombination	99	266	506	
Gene mutation	101	276	352	
Chromosomal aberrations	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)

# 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 **poškození** či **reparaci** DNA**
-



# Výpovědní hodnoty testů mutagenity ve vztahu k člověku



# Faktory omezující extrapolaci výsledků na člověka

- látkový **metabolismus** člověka a ostatních organismů
  - uspořádání DNA eukaryot a prokaryot
  - **reparační mechanismy** u vyšších eukaryot
  - konečný projev mutačního poškození, který se u člověka manifestuje **změnou jeho zdravotního stavu**
-

# Přehled v současnosti doporučovaných testů pro stanovení genotoxicity pro komerční chemikálie

Test	Example(s)	Effect measured	Test Guideline number	
			OECD	EPA
<b>In vitro—bacterial and mammalian cells</b>			OECD	EPA
Bacterial mutagenicity	Ames (Salmonella) test <i>E. coli</i> test	Gene mutations	471	870.5100
Mammalian cell mutation	Mouse lymphoma test CHO- <i>hprt</i> test	Gene mutations	476	870.5300
Mammalian cell cytogenetics	CHO, CHL, or human lymphocyte chromosome aberrations; MN test	Chromosome damage Nondisjunction	473 487 <sup>a</sup>	870.5375 —
Bacterial DNA damage	SOS test	DNA damage repair	—	870.5500
Mammalian cell DNA damage	UDS Comet assay DNA adduct formation	DNA damage	482 — —	870.5550 — —
<b>In vivo—rodent somatic cells</b>				
Transgenic rodent gene mutation	Big Blue mouse MutaMouse	Gene mutations in various tissues	—	—
Bone marrow cytogenetics	Aberrations, micronuclei, aneuploidy	Chromosome damage Nondisjunction	475 474	870.5385 870.5395
DNA damage	Liver UDS Comet assay DNA adducts	DNA damage leading to strand breaks	486 <sup>b</sup>	—
<b>In vivo—rodent germ cells</b>				
Heritable gene mutations	Mouse-specific locus test	Gene or chromosome damage in F1	—	870.5195 870.5200
Male germ cell cytogenetics	Spermatogonial, spermatocyte cytogenetics	Chromosome damage	483	870.5380
Sperm cell chromosome damage	Dominant lethal assay	Chromosome damage incompatible with embryo survival	478	870.5450
Heritable sperm cell chromosome damage	Heritable translocation test	Heritable (to F1) chromosome rearrangements	485	870.5460

## 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 vivo
- mikronukleus test

### 2. OVĚŘOVACÍ TESTY

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

### 3. DOPLŇKOVÉ TESTY

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

# Hodnocení mutagenity jednotlivých chemických látek – systém „baterií testů“ (košů) podle použití chemikálií

Amesův  
test ←

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 dřevě)	mikroorganismy savci (DLM - kostní dřevě) 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 (Dominantně Letální Mutace - hlodavci)**

# Příklad testovací baterie (Kanada) pro látky s omezeným použitím

Figure 1. Mutagenicity Testing at LOC I

LOC I			
CRITERIA <sup>a</sup>	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 <sup>b</sup>	Salmonella/mammalian microsome assay plus Mammalian <i>in vitro</i> chromosome aberration assay		
TEST RESULTS	<table border="1"> <tr> <td>Both negative</td> <td>One or both positive</td> </tr> </table>	Both negative	One or both positive
Both negative	One or both positive		
CONFIRMATION OF <i>in vivo</i> RESULTS <sup>c</sup>	<table border="1"> <tr> <td>Not applicable</td> <td>Not applicable</td> </tr> </table>	Not applicable	Not applicable
Not applicable	Not applicable		
CONCLUSION	<table border="1"> <tr> <td>Nonmutagen</td> <td><i>in vitro</i> mutagen</td> </tr> </table>	Nonmutagen	<i>in vitro</i> mutagen
Nonmutagen	<i>in vitro</i> mutagen		
RECOMMENDED ACTION	<table border="1"> <tr> <td>No further testing required<sup>d</sup></td> <td>a) Review exposure b) Elevate to LOC II if indicated</td> </tr> </table>	No further testing required <sup>d</sup>	a) Review exposure b) Elevate to LOC II if indicated
No further testing required <sup>d</sup>	a) Review exposure b) Elevate to LOC II if indicated		

## 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 resistance 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

## Biomarkery:

1. **expozice** – např. stanovení **DNA aduktů**
2. **vnímavosti** – vypovídají o genetické predispozici - analýza genetických **polymorfismů**, geny pro epoxidhydrolázu, glutathion- S-transferázu aj.
3. **účinku** – např. mutace v genech **p53, HPRT lokus, získané chromozomové aberace !**

# Monitorování prostředí - detekce environmentálních genotoxických látek

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

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

- **chromozomové aberace**
  - **genové mutace**
-



# Příklady využití *in situ* Tradescantia testu – radioizotopy v půdě

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 ( $2.58 \pm 0.17$  pink mutant events per  $10^3$  hairs or  $1.34 \pm 0.09$  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 ( $1.70 \pm 0.14$  or  $0.88 \pm 0.07$ , 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  $^{137}\text{Cs}$ ,  $62.5 \pm 4.4$  mBq/g  $^{60}\text{Co}$ , 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.



# 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. typhimurium His 1974	his <sup>+</sup> kolonie	Salmonella typhimurium 27 rut., 7 exp.	zpětná mut. his <sup>-</sup> -> his <sup>+</sup>	>> 1000	++	+++
E. coli WP2 1976	trp <sup>+</sup> kolonie	E. coli 4	zpětná mut. trp <sup>-</sup> -> trp <sup>+</sup>	>>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]

# 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 reparace**
  - **mutace *rfa*** – zasahuje lipopolysacharidovou membránu bakteriálních buněk – zvyšuje se **permeabilita** povrchu bakteriálních buněk
  - **přítomnost plasmidu kódujícího rezistenci k ampicilinu či tetracyklinu** – **zvyšuje citlivost k mutagenům**
-

# Plotnový test mutagenity podle Amese

Nejpoužívanější kmeny:

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

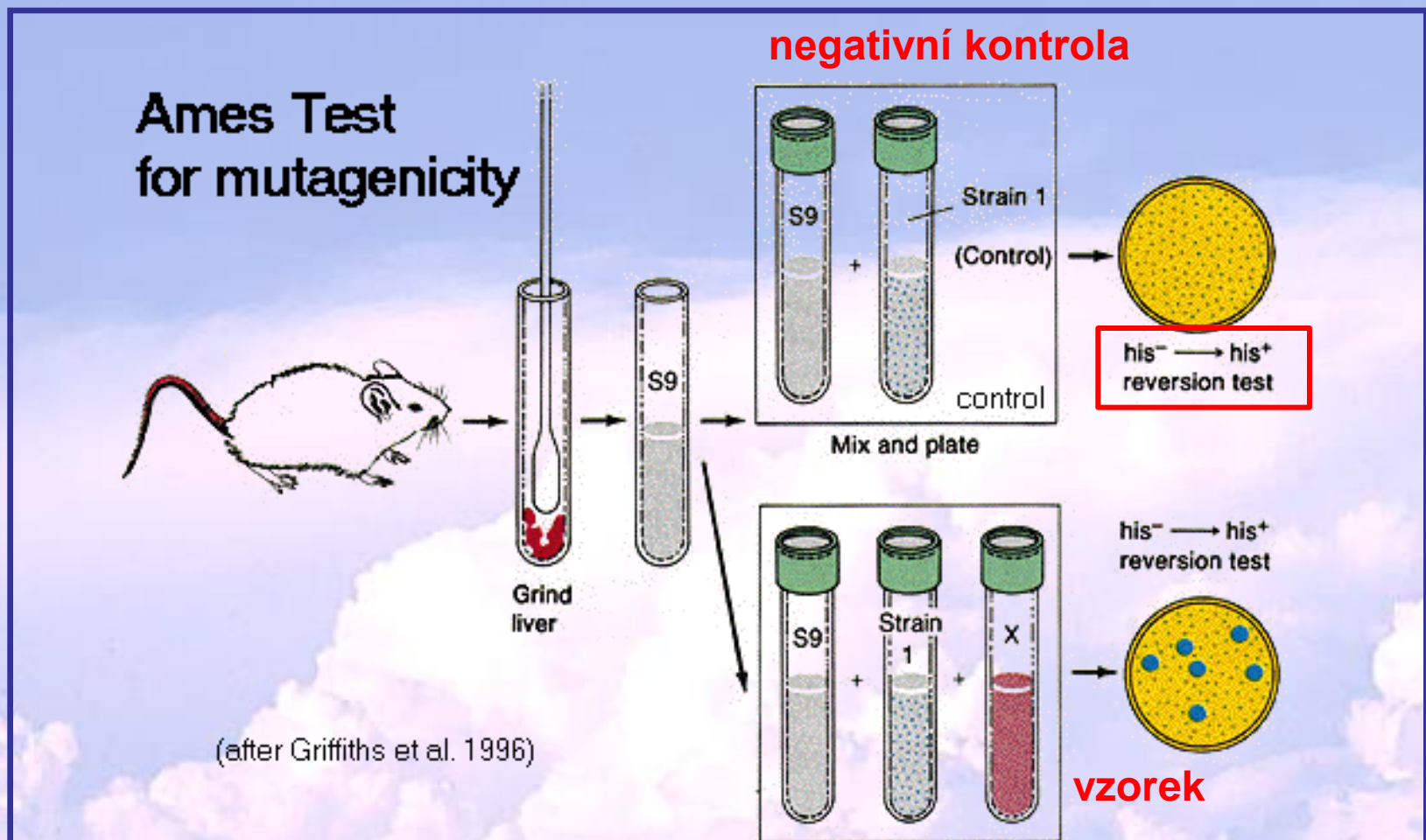
## **Provedení:**

- 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)**

# Amesův test

(*Salmonella typhimurium*) – princip zpětné mutace



Mutagenní potenciál sloučeniny se stanoví na základě počtu pozorovaných kolonií po 48 hodinách

# Příklady mutagenů používaných jako pozitivní kontrola u A. testu

## 2. 1. 2. Doporučené diagnostické mutageny

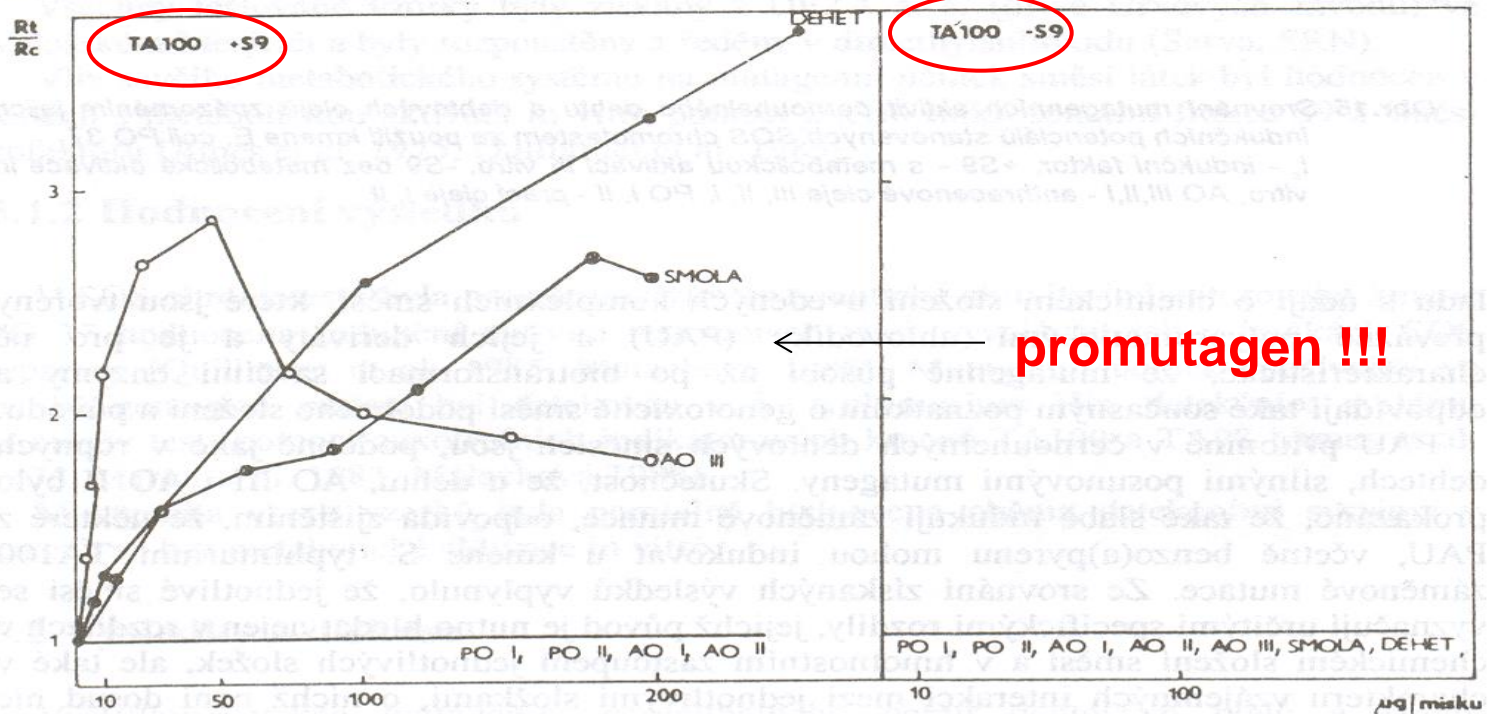
K ověření citlivosti indikátorových bakteriálních kmenů *Salmonella typhimurium* HIS<sup>-</sup>, užívaných v Amesově testu, se používají následující diagnostické mutageny (hodnoty pro dávky jednotlivých látek v ug/misku jsou uváděny pro klasický plotnový test - plate incorporation assay):

KMEN	LÁTKA	S9	ug/misku	ROZPUSTNOST
TA100	azid sodný	-	1.5	H <sub>2</sub> O
TA100	2-anthramin	+	0.5	DMSO
TA98	2-AF	+	10.0	DMSO
TA98	DNFA	-	20.0	DMSO
TA97	ICR-191	-	1.0	H <sub>2</sub> O
TA102	mitomycin C	-	0.5	H <sub>2</sub> O
TA1535	EMS (roztok)	-	1.0ul	H <sub>2</sub> O
TA1538	2-AF	+	10.0	DMSO
TA1537	2-AF	+	10.0	DMSO
TA98/NR	2-anthramin	+	0.5	DMSO
TA98/ 1,8DNP <sub>6</sub>	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 Ames. testu při testování mutagenity černouhelného dehtu (obsahuje hlavně PAU)

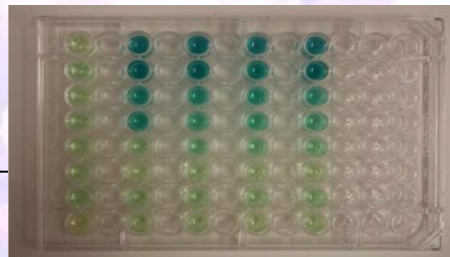


**Obr.16** Srovnání mutagenních aktivit černouhelného dehtu a dehtových olejů stanovených na základě indukce záměnových mutací v Amesově testu za použití kmene *S. typhimurium* His<sup>+</sup> TA100  
 Rt/Rc - stupeň zvýšení počtu revertantů, v testu bez metabolické aktivace (-S9) nevykazovala žádná 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**
- 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  **$\beta$ -galaktozidázy (fúze sfiA genu s lacZ genem)**
- laboratorně je metoda založena na biochemické analýze **indukovatelné  $\beta$ -galaktozidázy** hodnocené **kolorimetricky**



# SOS reparace

(koordinovaná syntéza enzymů a činnost reparačních mechanismů indukovaná poškozením DNA)

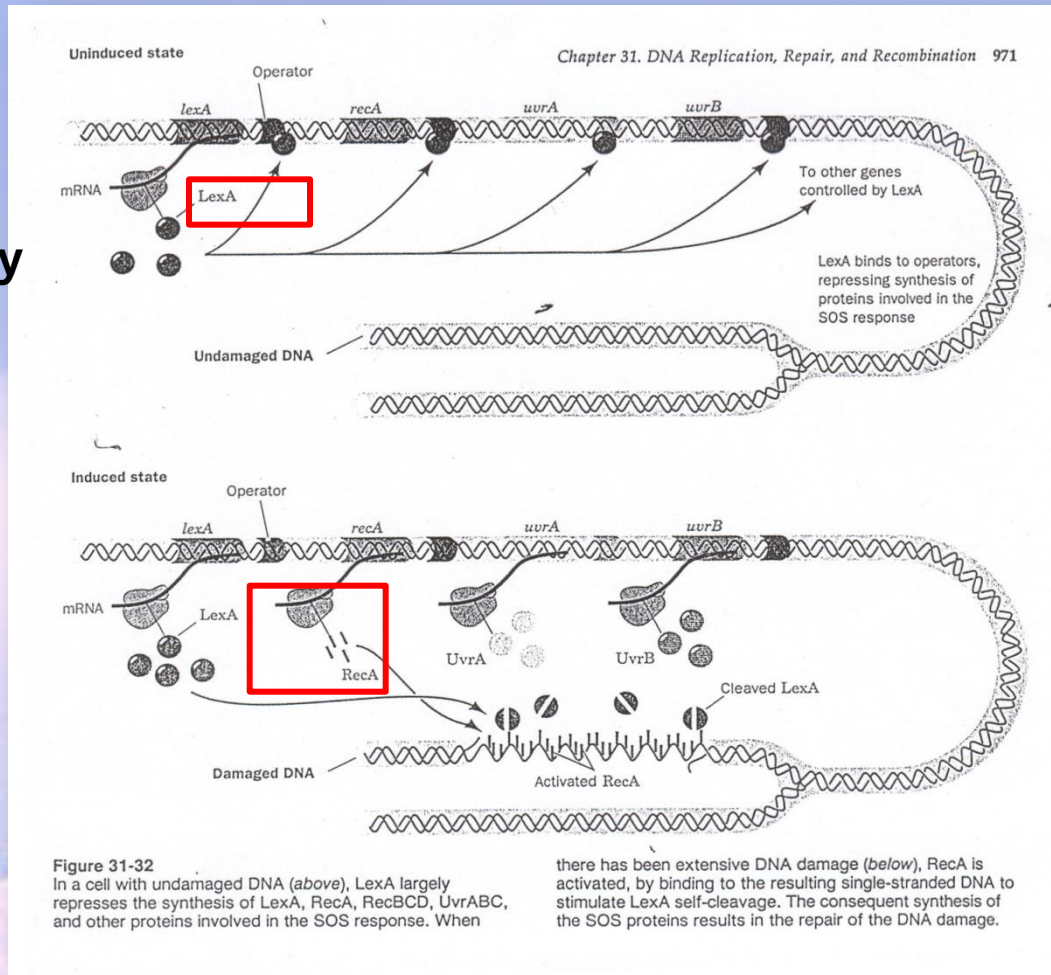
Geny **lexA**  
**recA**  
a jejich produkty

Lex A a Rec A  
proteiny

Inducibilní  
reparace -  
error prone !



Mutagenní



# SOS reparační

## LexA protein se

v malém množství, váže na *lexA*-operátor a na operátory genu *recA* a jiných genů regulovaných LexA-represorem. Tyto geny se exprimují v malých množstvích proteinů. Proto se RecA-protein nachází konstitutivně též v neindukovaných buňkách.

◆ 2. Vlivem poškození DNA (např. vznikem pyrimidinových dimerů blízko replikační vidlice) se aktivuje RecA-protein. Tato aktivace se uskutečňuje vazbou RecA-proteinu na jednořetězcové úseky v mezerách vytvořených diskontinuální syntézou DNA za dimery.

◆ 3. Interakce LexA s aktivovaným RecA-proteinem vede k proteolytickému štěpení LexA.

◆ 4. V indukovaném stavu vede dereprese *recA*<sup>+</sup> - genu k produkci velkého množství RecA-proteinu. Též jiné geny, které jsou regulovány LexA-proteinem, jsou dereprimovány.

◆ 5. Když indukční signál zmizí (pravděpodobně opravou jednořetězcových mezer), množství aktivního RecA-proteinu klesne, LexA-represor se hromadí a geny regulované LexA-represorem jsou opět reprimovány.

Indukovatelné geny na obr. 413 jsou např. geny *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD*, jejichž produkty jsou tyto proteiny:

◆ **UvrA-protein**, který se váže na DNA ozářenou UV-světlem; tvoří komplex s UvrB-proteinem.

◆ **UvrB-protein**, který se váže na UvrA-protein. V komplexu s tímto proteinem má helikázovou funkci.

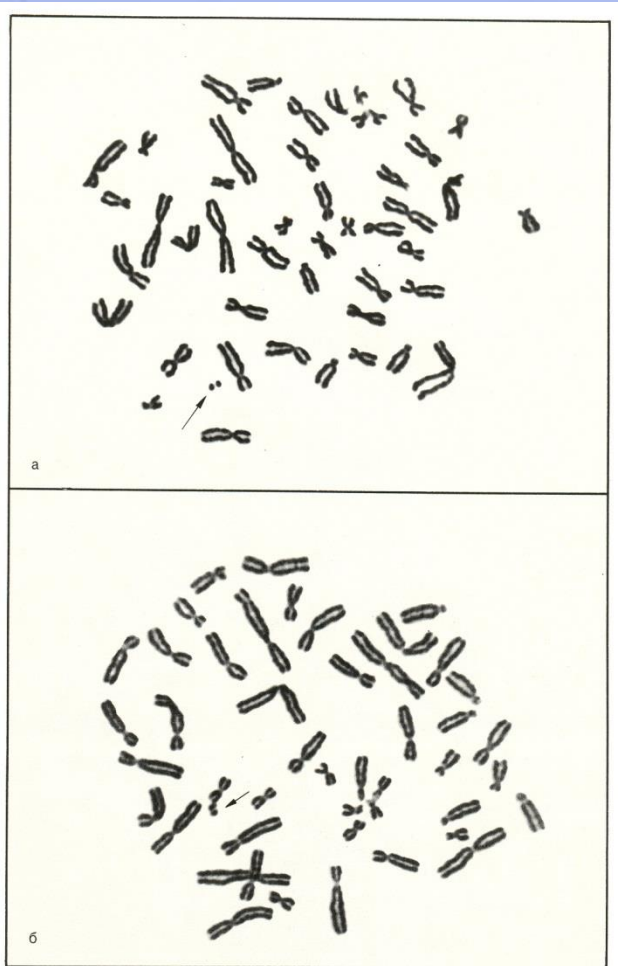
◆ **UvrC-protein** působící v komplexu s UvrB-proteinem jako endonukleáza.

◆ **UvrD-protein** působící jako 3'-5'-helikáza II.

Indukovatelné geny  
podílející se na  
opravě poškozené  
DNA



# Cytogenetické testy - poškození chromozomů vyvolané působením mutagenů



## Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů (CALPL)

biologický expoziční test  
biomarker expozice a účinku genotoxických látek

využití: monitorování pracovního prostředí u profesionálně exponovaných osob  
testování chemických látek

### Metodika:

kultivace periferních lymfocytů (48 hod.)

kolchicin (2 hod.) – zastavení mitotického dělení ve stadiu metafáze

fixace, barvení Giemsou

mikroskopické hodnocení metafázických chromozomů

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

## ***in vitro – testování chemických látek***

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**, 22<sup>nd</sup> 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 jadem, 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:*

- žiravinami (kyselina octová konc., chromsírová směs)
- ostatními jedy (kolchicin)
- zvláště nebezpečnými jedy (metanol)
- 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.



# Cytogenetická metoda = biomarker expozice genoxickým látkám

## *In vivo test - CAPL*

= biomarker účinků na člověka  
(predikce rizika vzniku nádorů)

Použití jako **skupinový expoziční test** (nejméně 20 osob) i k posouzení **expozice jednotlivce**

CHA = detekce časného genotoxického efektu

Pozdní genotoxický efekt = nádory



**Předpokládá se, že zvýšená frekvence aberací znamená expozici v několika posledních měsících před vyšetřením !!!**

**Preventivní prohlídky zaměstnanců pracujících v prostředí s vyšším rizikem genotoxicity !!!**

---

# MUTAGEN



**Primární léze DNA** ► zlomy vláken, alkylace aj. alterace bazí, „cross links“

► **dvouřetězcový zlom v DNA (DSB)**



**Reparace**, event. chybná reparace, nezreparované poškození



**Chromozomová aberace !!!**

**Hodnocení ZCHA:** skupina > 20 osob à 100 mitóz/osobu  
jednotlivci, skupina < 20 osob à mitóz



# Cytogenetická Analýza Periferních Lymfocytů = CAPL

**Materiál:** lymfocyty periferní krve, G0 fáze, v organismu přežívání 1000-1500 dní

**Kultivace:** 48 hod, zpracování jako při karyotypování

**Barvení** - konvenční metoda !!!! – barvení Giemsa -  
**ne G-pruhování !**

**Nestabilní aberace !!!**

**Hodnocení:** počet aberantních bb. / 100/200 hodnocených mitóz

**Typy aberací:** zlomy chromatidové a chromozomové  
acentrické fragmenty  
di- a tricentrické chromozomy  
kruhové chromozomy, výměny

**Hodnocení nálezů:** → % AB.B. = % aberantních buněk  
rozdíly v hodnocení jednotlivců a skupin (min 20 osob) -

---

# Hodnocení a interpretace nálezů

## Rozdíly v hodnocení jednotlivců a skupin:

### Skupinové hodnocení:

- méně než 2 % AB.B. (aberrantních buněk) – hodnota shodná se spontánní frekvencí
- 2-4 % AB.B. – zvýšená expozice genotoxickým látkám - (dop. kontrola 1 x ročně)
- více než 4 % AB.B. – vysoká expozice genotoxickým látkám – zvýšené riziko nádorového onemocnění !
- (dop. kontrola za 2-4 měsíce, podávání vitamínů)

### Individuální hodnocení:

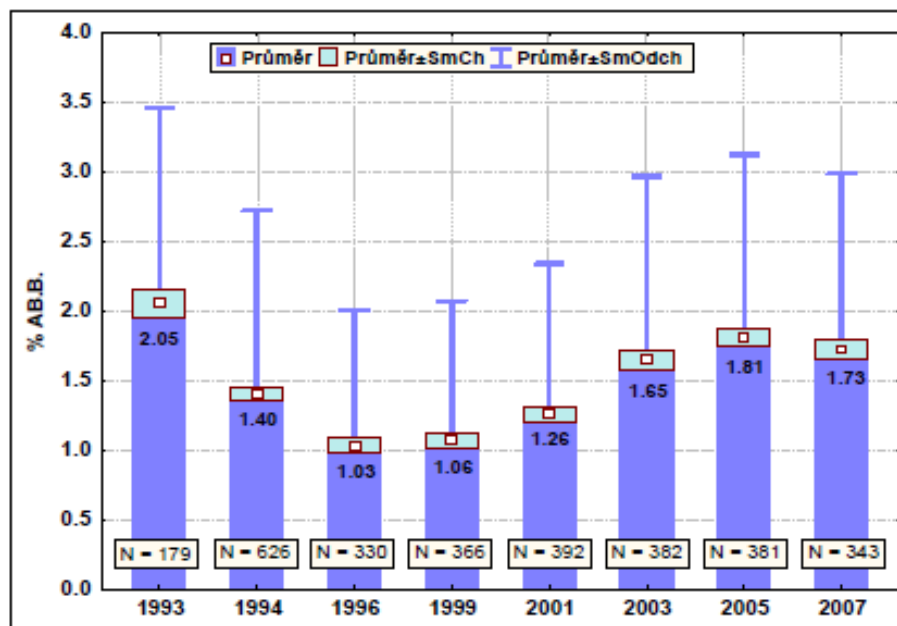
Individuální hodnoty do 5 % AB.B. nejsou považovány za zvýšené

Opakované zjištění 5 a více % AB.B. je důvodem vyřazení osoby z expozice – šetření z hlediska hygieny práce !

---

# Spontánní frekvence

Spontánní frekvence aberantních buněk (AB.B.)  
u dospělých (1993 – 2007)



# Cytogenetická analýza periferních lymfocytů – biologické monitorování

## PRŮVODKA PRO CYTOGENETICKOU ANALÝZU PERIFERNÍCH LYMFOCYTŮ

Pořadové číslo:

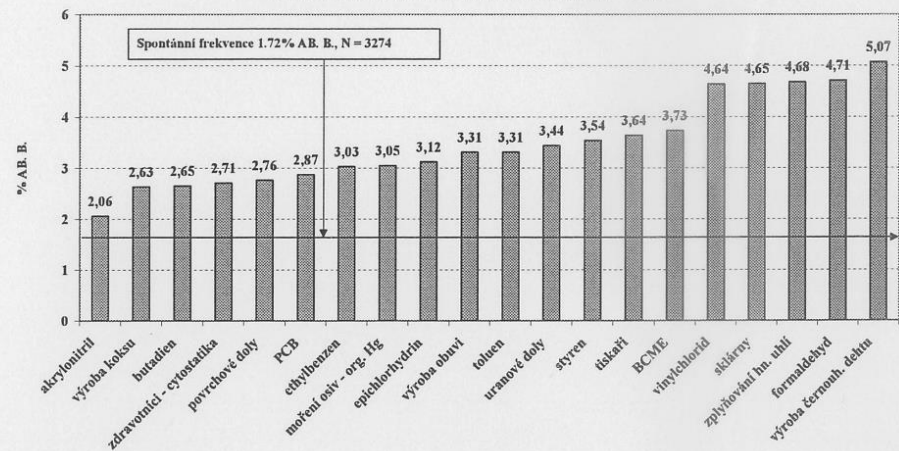
Příjmení: \_\_\_\_\_ Rok narození: \_\_\_\_\_  
 Jméno: \_\_\_\_\_ Rodné číslo: \_\_\_\_\_  
 Bydliště: \_\_\_\_\_ Datum odběru: \_\_\_\_\_

pracoviště v době odběru:.....  
 v riziku: ano – ne  
 virové onemocnění v posledních 3 měsících: ano – ne  
 jiná onemocnění (jaká):.....  
 léky před odběrem: ano – ne  
 jaké: .....  
 pravidelné, dlouhodobé užívání léků: ano – ne  
 jaké: .....  
 hormonální antikoncepce: ano – ne  
 alkohol 24 h před odběrem: ano – ne  
 pivo, víno, tvrdý – kolik:.....  
 nekuřák (jak dlouho): ano – ne  
 kuřák (kolik denně): ano – ne  
 rtg vyšetření v posledních 3 měsících: ano – ne  
 radioterapie (kdy): ano – ne  
 expozice chemickým látkám v zaměstnání: ano – ne  
 kdy a jakým: .....  
 práce s chemikáliemi mimo zaměstnání (barvy, postřiky): ano – ne  
 kdy a s jakými: .....  
 očkování v posledních 3 měsících (jaké): ano – ne  
 jiné okolnosti v posledních 3 měsících:.....

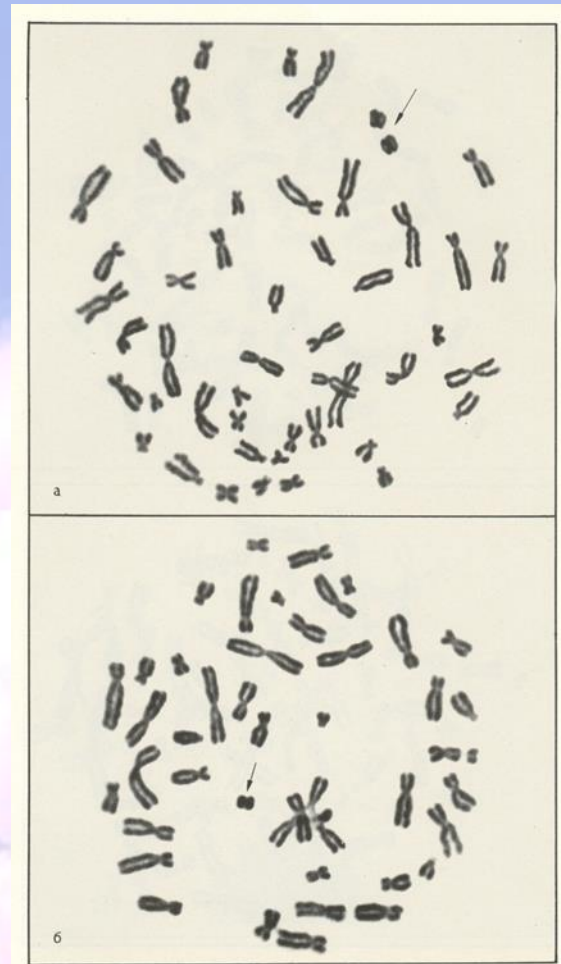
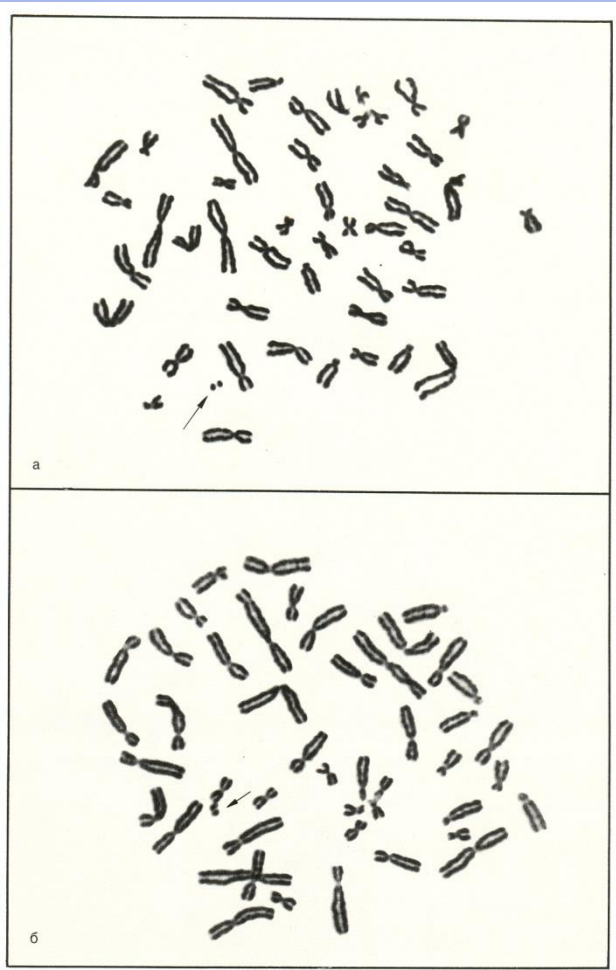
Nehodící se škrtněte

22

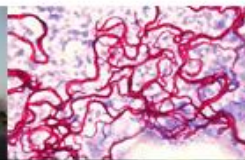
FREKVENCE CHROMOZOMOVÝCH ABERACÍ PŘI PROFESIONÁLNÍ EXPOZICI GENOTOXICKÝM LÁTKÁM V LETECH 1977 - 2006



# Příklady aberací - párový fragment, kruhový chromozom



# ZDRAVOTNÍ ÚSTAV SE SÍDLEM V BRNĚ



Domů | Poradny | Objednávky | O nás

## Služby pracoviště genetické toxikologie

### Cytogenetické vyšetření lidských periferních lymfocytů (CAPL)

Vyšetření:	Vzorek	Odběr	Doporučená odběrová souprava	Teplota úschovy do transportu	Transport	Doba výsledku
CAPL	Krev nesrážlivá heparinizovaná (2 ml)	Po 7 - 9 Út 7 - 9 Dle domluvy	Jednorázová souprava na odběr krve s heparinem	V chladničce, nesmí zmraznout!!!	Nejlépe v den odběru (bez mrazících vložek)	14 dní od doby odběru 1 měsíc u skupin

Pokyny pro odběr krve na cytogenetickou analýzu si můžete stáhnout → [ZDE](#)

Průvodka pro cytogenetické vyšetření je ke stažení → [ZDE](#)

→ Provádíme biologické monitorování v oblasti prevence nádorových onemocnění u osob profesionálně i neprofesionálně exponovaných mutagenním a karcinogenním látkám (genotoxickým látkám) a neexponovaných osob ovlivněných těmito látkami z životního prostředí.

## Genetická toxikologie

Služby

O laboratoři

## Ordinace genetické toxikologie

Ordinační doba na pracovišti Brno, Gorkého 6 :

PO:	7,00 - 9,00
ÚT:	7,00 - 9,00
ST:	-
ČT:	-
PÁ:	-

Telefon: 541 421 231 nebo 541 421 230

# CAPL - samoplátci

## Placené služby - Oddělení lékařské genetiky

### Pro samoplátce nabízíme

- Vyšetření 6 základních mutací genu CFTR asociovaného s onemocněním cystická fibróza
- Vyšetření 50 mutací genu CFTR asociovaného s onemocněním cystická fibróza, ke stažení - [CF](#)
- Prenatální vyšetření - diagnostika aneuploidií chromozomů 13,18,21,X a Y z amniotické tekutiny in vitro metodou QF - PCR za 24 - 48 hodin, ke stažení - [QF PCR](#)
- Prenatální vyšetření - diagnostika aneuploidie chromozomů 21 z amniotické tekutiny in vitro metodou Direct QF PCR za 3 hodiny, ke stažení - [directQFPCR](#)
- Určení pohlaví

### CENÍK č. 127/2013-09.5

#### Cytogenetická analýza periferních lymfocytů

Pro Oddělení lékařské genetiky byla provedena kalkulace na Cytogenetickou analýzu periferních lymfocytů u osob profesionálně i neprofesionálně exponovaných mutagenními a karcinogenními (genotoxickými) látkami. Každý pacient musí být s cenou výkonu nejprve seznámen a poté mu bude vystaven doklad, na jehož podkladě provede úhradu. Cena je osvobozena od DPH.

Název	Cena
Analýza 100 mitóz	2 500,00 Kč
Analýza 200 mitóz	4 000,00 Kč

# 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.

**Existuje závislost četnosti aberací na věku !!!**

---



# **Další cytogenetické testy:**

**Mikrojaderný test**

**Sesterské chromatidové výměny (SCE)**

**Test na detekci translokací (FISH)**

**Přednáška Cytogenetika**

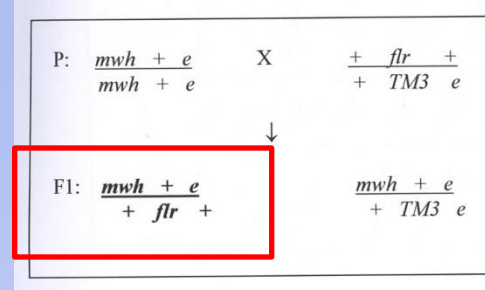
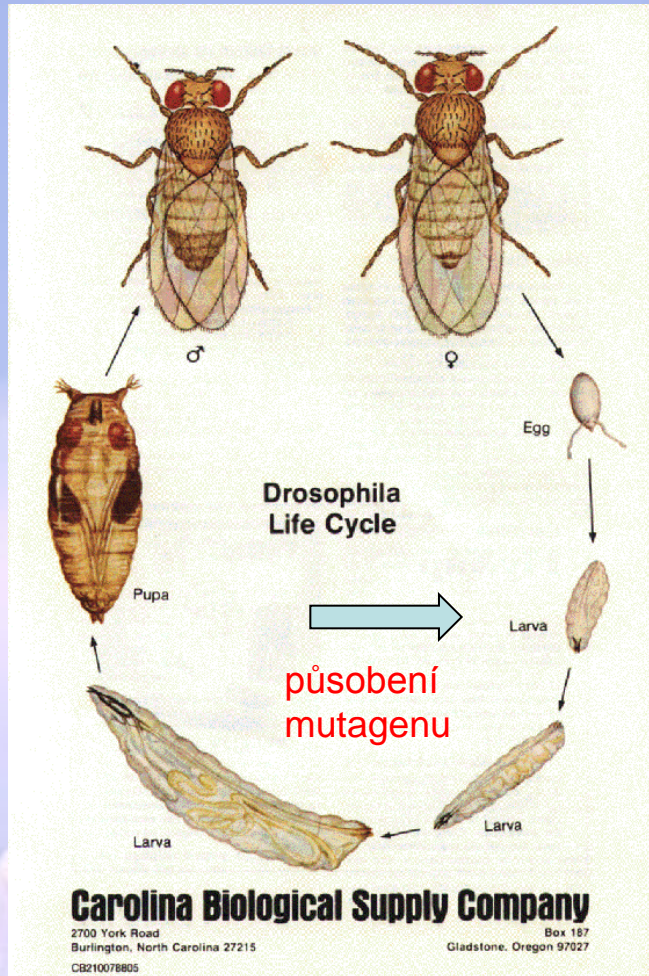
---

# Testy mutagenity na *Drosophila melanogaster*

- test na detekci **somatických** mutací a rekombinací (**SMART**)
- detekce recesivně letálních na pohlaví vázaných mutací (**CIB, Basc, attached X**)  
- **gametické mutace**



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



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



# SMART test – mutace v genech *mwh* a *flr* na křídlech

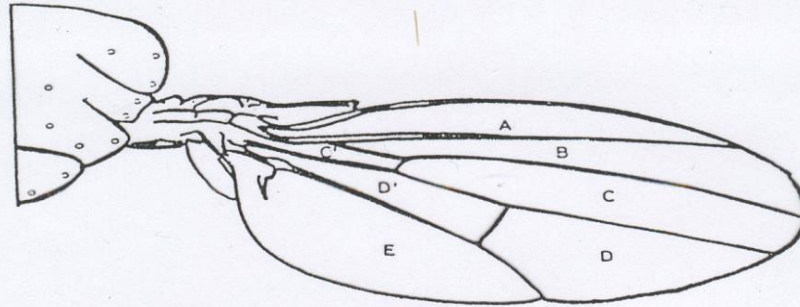
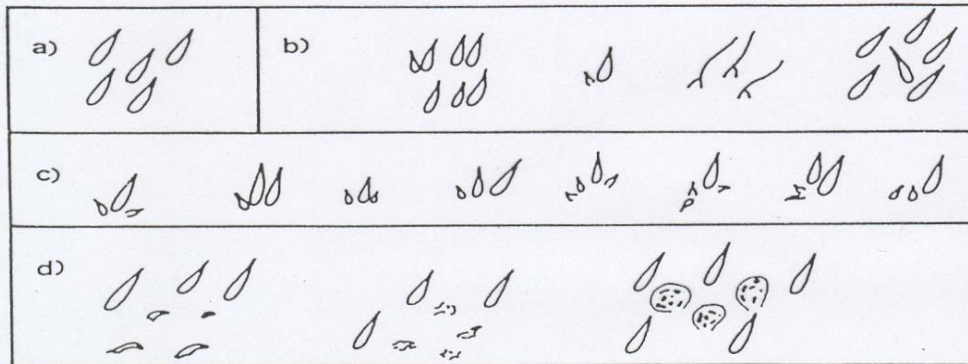


Fig. 2. Normal half mesothorax showing the regions A-E of the wing surface scored for spots (after Garcia-Bellido and Merriam [1971a]).



*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*.

# Fenotypové projevy mutace mwh a flr



Obr.1. Mutace typu mwh



Obr.2. Mutace typu flr<sup>3</sup>

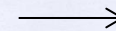
# SMART - wing spot test

## 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	$\frac{+ flr^3 +}{+ TM1 e}$
	↓	
$\frac{mwh + e}{+ flr^3 +}$		



**Ab/aB**

Heterozygoti – trans  
Testovací kmen

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

# SMART test – princip – mutace standardní alely u heterozygota

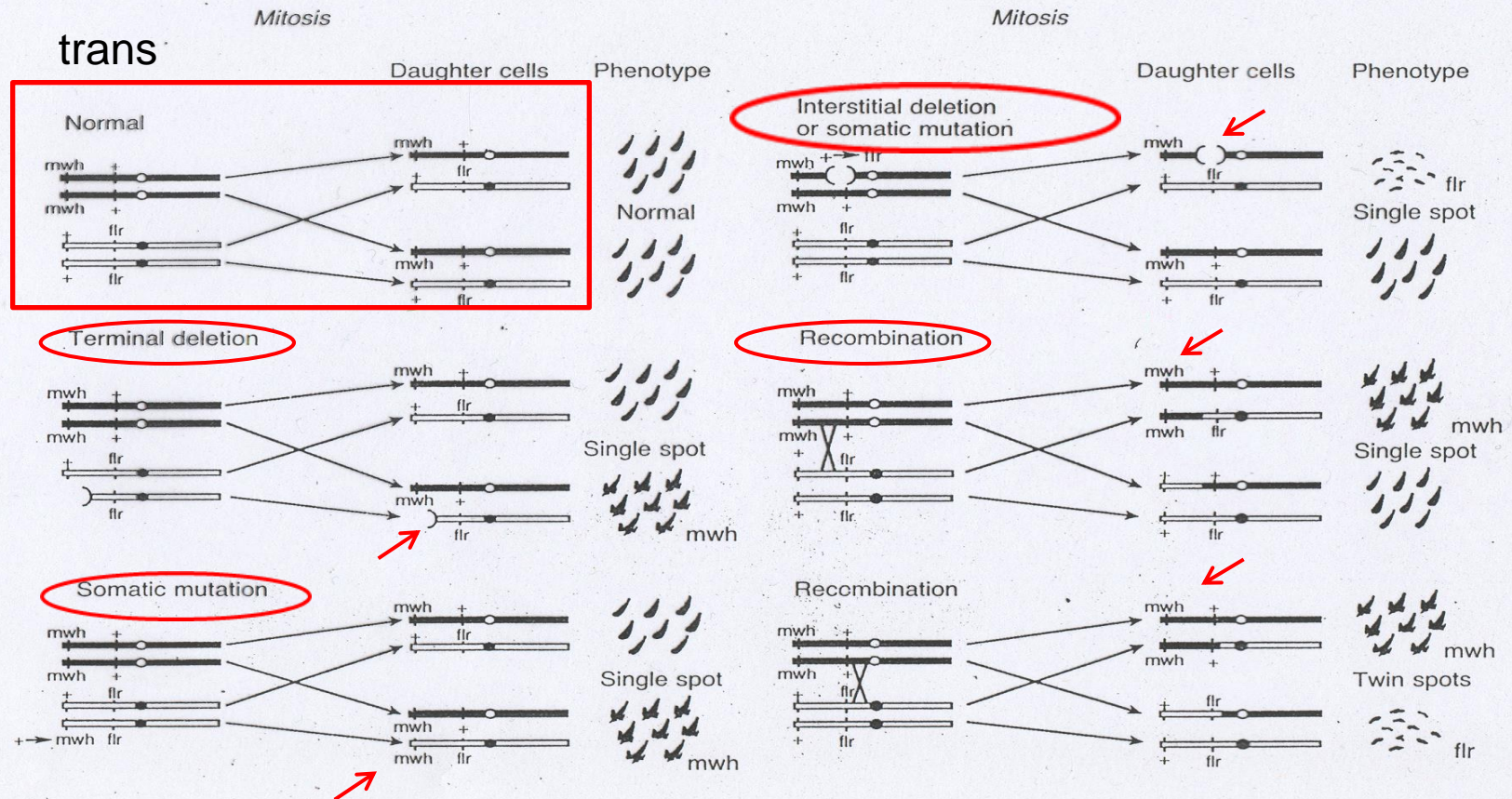
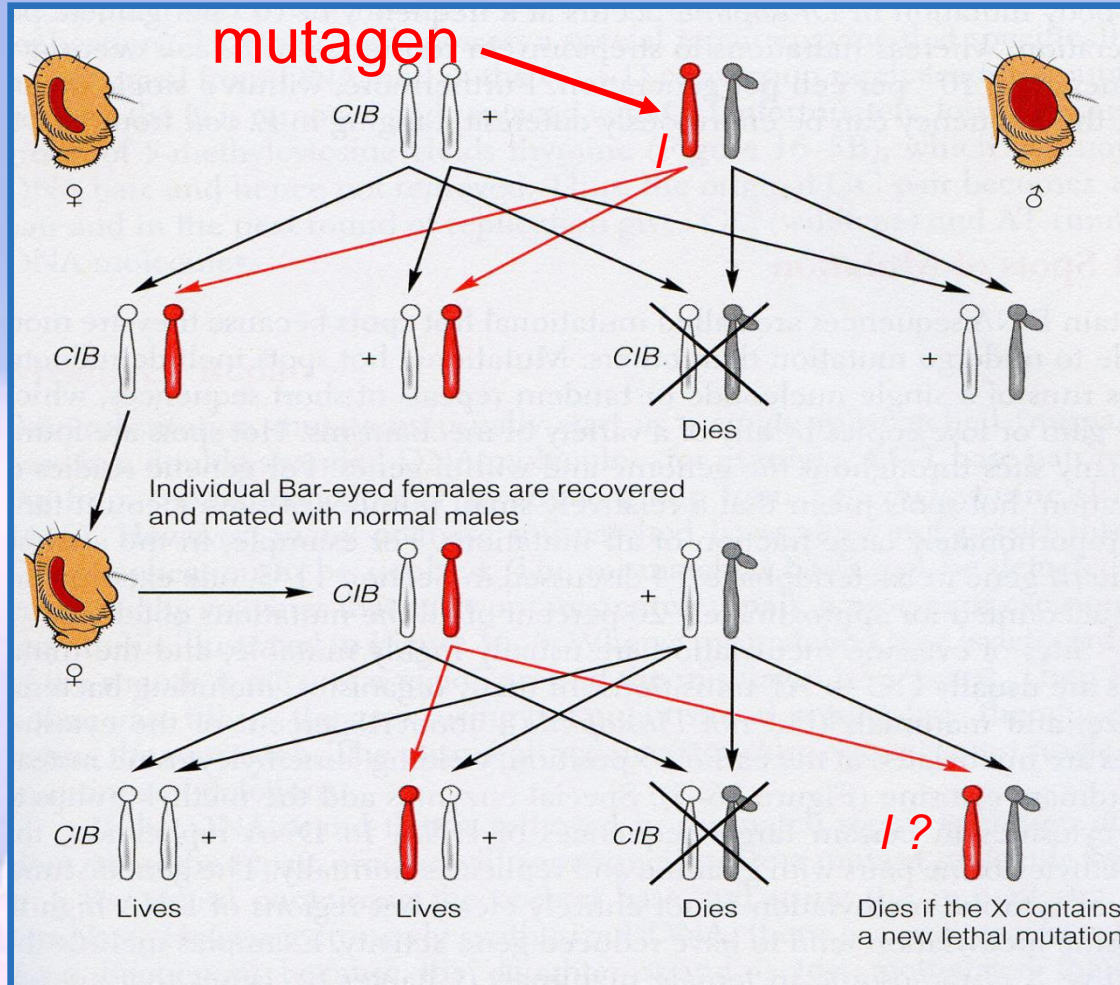
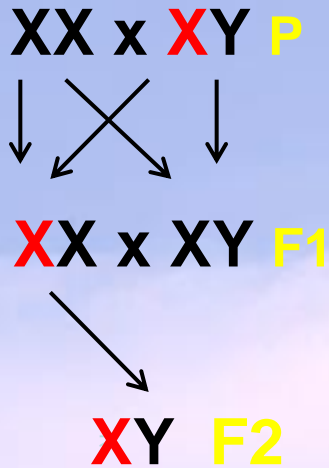


Fig. 2. The origin of mosaicism during mitotic divisions in the wing. Point mutation or deletion of *mwh* and *flr* gives rise to single spots. Recombination between *mwh* and *flr* gives rise to a *mwh* single spot. Twin spots of *mwh* and *flr* are produced by recombination between the centromere and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

# CIB test u *Drosophila melanogaster*



V případě vzniku letální mutace – nebudou v generaci F2 samečci

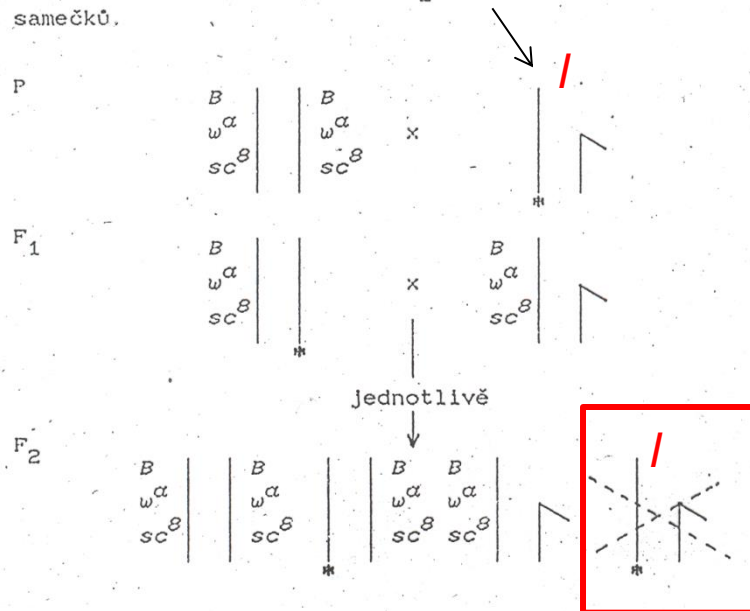


1.7.16 Detekce recesivně letálních na pohlaví vázaných mutací  
(Basc, M-5)

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

Samičky testovacího kmene jsou homozygotní pro alely  $B$ ,  $w^\alpha$  a  $sc^B$  lokalizované na chromozómu X.  $B$  je alela barvopodmiňující zmenšení počtu očních facet a tedy zúžené oči,  $w^\alpha$  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.



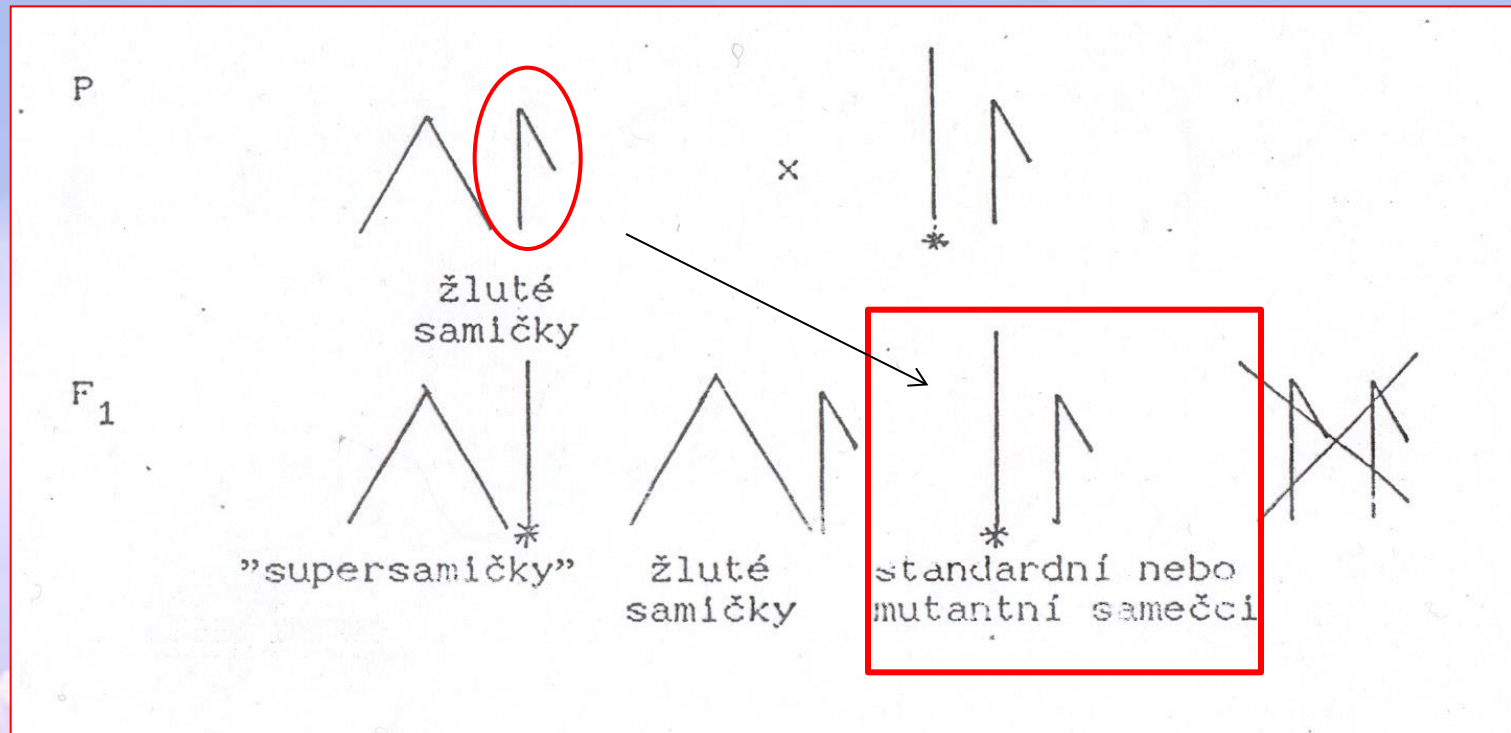
**Můžeme**  
**detegovat**  
**letální mutace**  
**V**  
**chromozomu**  
**X jak u**  
**samiček, tak u**  
**samečků !**

**V F<sub>2</sub> vznikne jen jedna kategorie samečků !!!**

# Attached X test – *Drosophila melanogaster*



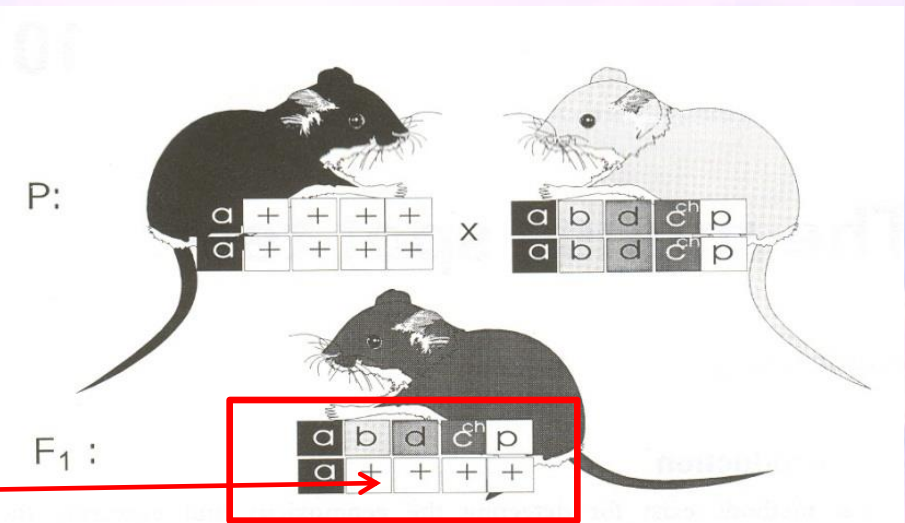
Výsledky – už v generaci F1 !!!



# Spot test u myši (somatické mutace)



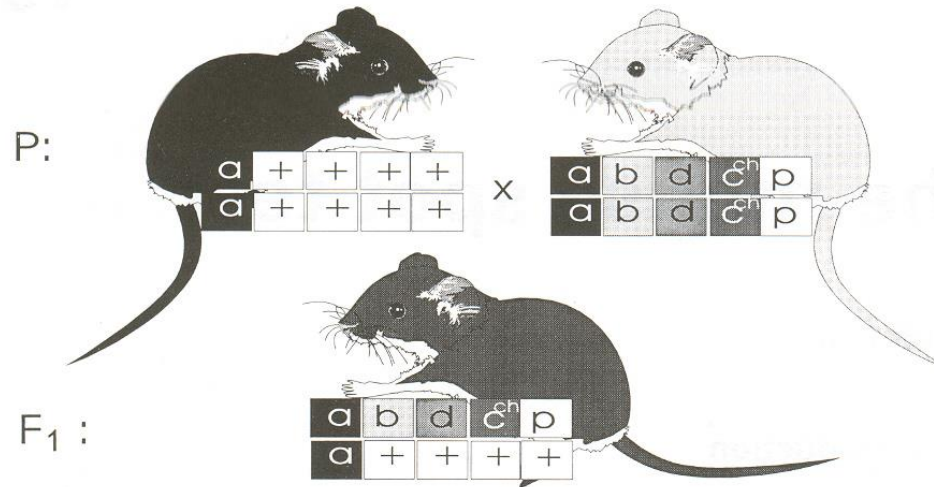
**Působení mutagenu na  
embrya heterozygotní pro  
geny barvy srsti !**



**Mutace  
standardní alely**

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

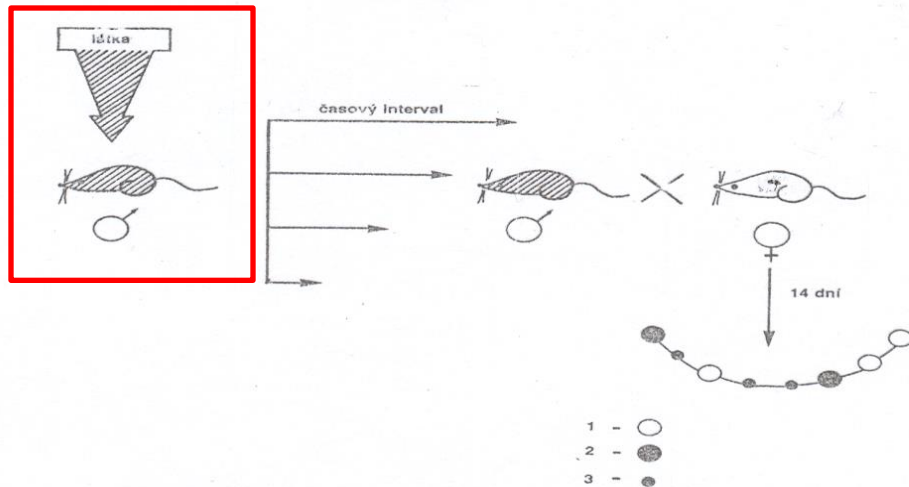
Embryos heterozygous for different recessive coat colour mutations are treated *in utero* with a mutagen, preferably between the 9th and the 11th day of fetal development. This is normally performed by intraperitoneal (i.p.) injection or treatment *per os* of the mother. If this treatment leads to the 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 zygota je vznik strukturních 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 myší (vysvětlení v textu).

Genetické změny ve spermiích - aberace, genové mutace

zánik zygot u samic

# HPRT test – rezistence k 6 thioguaninu

**HPRT test (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase test;** mutagenicity assay *in vitro*: mammalian cell gene mutation test)

**V79 Chinese hamster cells have one functional copy** of the gene which codes for the **HPRT enzyme**. HPRT enzyme activity is important for DNA synthesis. The use of the toxic nucleoside analog **6-thioguanine (6-TG)** forms the basis for cell selection following treatment. Cells without a mutation are poisoned by 6-TG, while mutant cells survive and form colonies. **Those cells that are able to form colonies are assumed to be mutant cells resulting from either a spontaneous mutation or from an induced mutation caused by a chemical agent.** This assay is used to evaluate the potential of a chemical, formulation or extract to induce mutations at the *hprt* locus of CHO cells.

---

# 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 šesulový 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 na detekci gametických mutací u *Arabidopsis thaliana*

- mutagenem působíme na semena
- test na detekci recesivních embryonálně letálních a chlorofylově defektních mutací
- sledování embryí budoucí generace  $M_2$  v nezralých semenech v šešulích rodičovských rostlin



**Recesivní mutaci detekujeme už v generaci  $M_1$  (normálně až v  $M_2$ )**



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

$1 \text{ mmol.l}^{-1}$  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  $\mu\text{l}$ ) roztoku na dobu 24 hod. ve tmě při  $25^\circ\text{C}$ . 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 zeminou tak, jak bylo uvedeno výše. Od každé koncentrace vysejeme semena do 120 až 150 jamek.

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

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

K vyjádření stupně sterility zařazujeme hodnocené šešule 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 šešulí v každé třídě a vyjádříme je jako procento z celkového počtu šešulí. 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.

## Arabidopsis assay for mutagenicity

T. Gichner <sup>a,\*</sup>, S.A. Badayev <sup>b</sup>, S.I. Demchenko <sup>b</sup>, J. Relichová <sup>c</sup>, S.S. Sandhu <sup>d</sup>,  
P.D. Usmanov <sup>e</sup>, O. Usmanova <sup>e</sup>, J. Velemínský <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Experimental Botany, Na Karlovce 1a, 16000 Prague 6, Czech Republic*

<sup>b</sup> *Institute of Chemical Physics, Moscow, Russia*

<sup>c</sup> *Faculty of Science, Department of Genetics, Brno, Czech Republic*

<sup>d</sup> *U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC, USA*

<sup>e</sup> *Department of Genetics, Academy of Sciences, Dushanbe, Tajikistan*

Accepted 16 December 1993

---


### Abstract

Four laboratories, two in the Czech Republic (Brno and Prague) and two in the CIS (Moscow and Dushanbe), participated in the International Programme on Chemical Safety's (IPCS) collaborative study to evaluate the utility of the most commonly used plant test systems, including the *Arabidopsis thaliana* assay, for assessing the mutagenic potential of environmental agents. Out of the five compounds evaluated in the Arabidopsis assay, three compounds, i.e., ethyl methanesulfonate, *N*-methyl-*N*-nitrosourea, and azidoglycerol, were reported to be mutagenic by all four participating laboratories. Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) demonstrated a negative response in all four laboratories, whereas maleic hydrazide was reported to be weakly mutagenic by one laboratory and nonmutagenic by the other three laboratories.

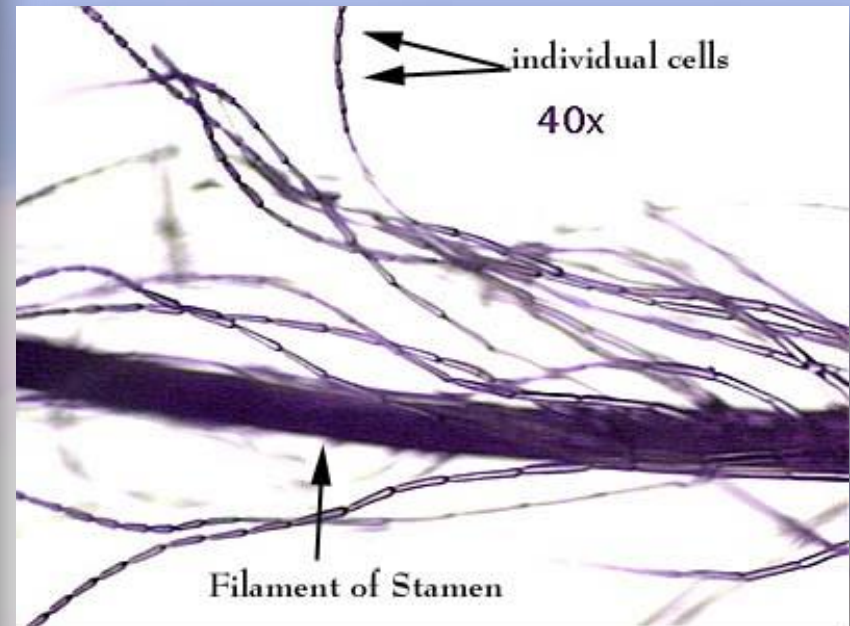
**Keywords:** IPCS collaborative study; *Arabidopsis thaliana*; Embryonic and chlorophyll mutants; Ethyl methanesulphonate; *N*-Methyl-*N*-nitrosourea; Azidoglycerol; Maleic hydrazide; Sodium azide

---

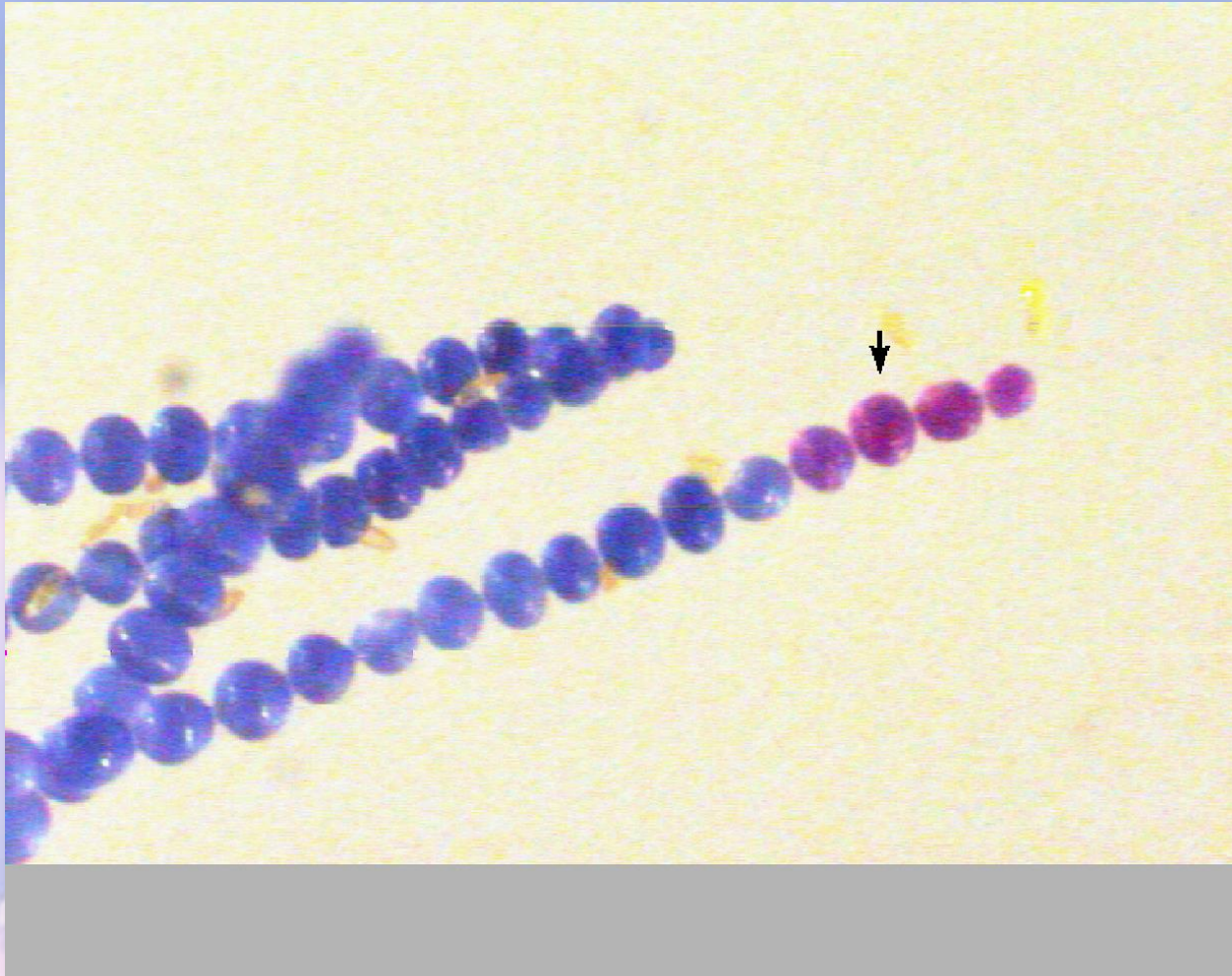
# Tradescantia test – test na detekci somatických mutací

- 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**) **heterozygot Aa !**
  - 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**

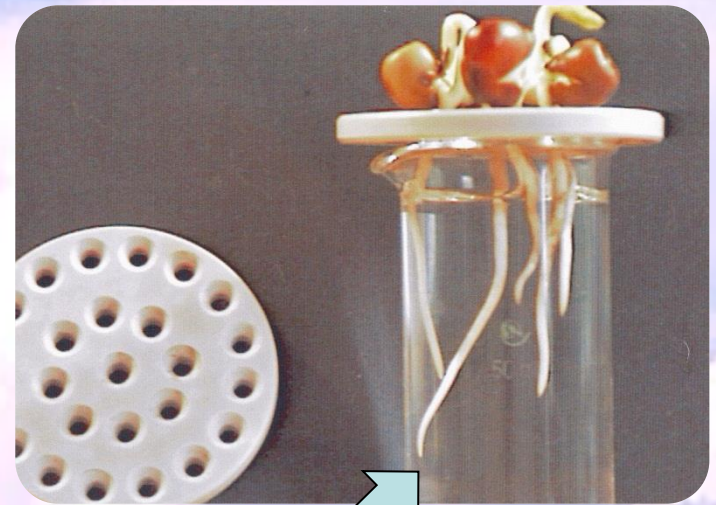
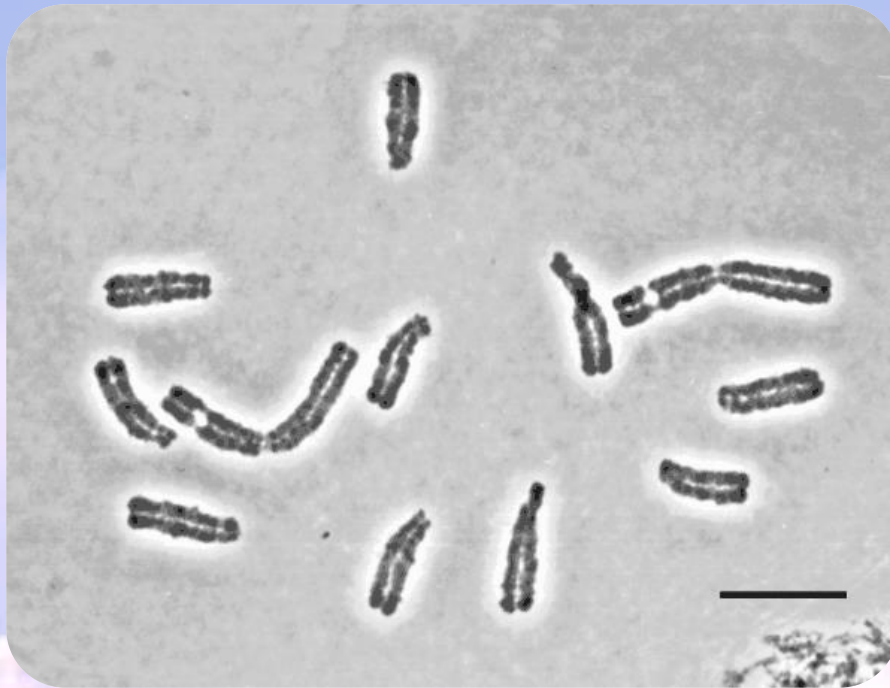
# Tradescantia test



# Tradescantia test - mutace



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



MUT 00343

## The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment

W.F. Grant <sup>a</sup>, H.G. Lee <sup>b</sup>, D.M. Logan <sup>b</sup> and M.F. Salamone <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Plant Science, Macdonald College of McGill University, Ste. Anne de Bellevue, Quebec H9X 3V9, Canada

<sup>b</sup> Department of Biology, York University, North York, Ontario M3J 1P3, Canada and <sup>c</sup> Ministry of the Environment, Biohazards Unit, Rexdale, Ontario M9W 5L1, Canada

(Accepted 3 February 1992)

**Keywords:** Water contamination; *Tradescantia* stamen hair assay; Paper mill effluent

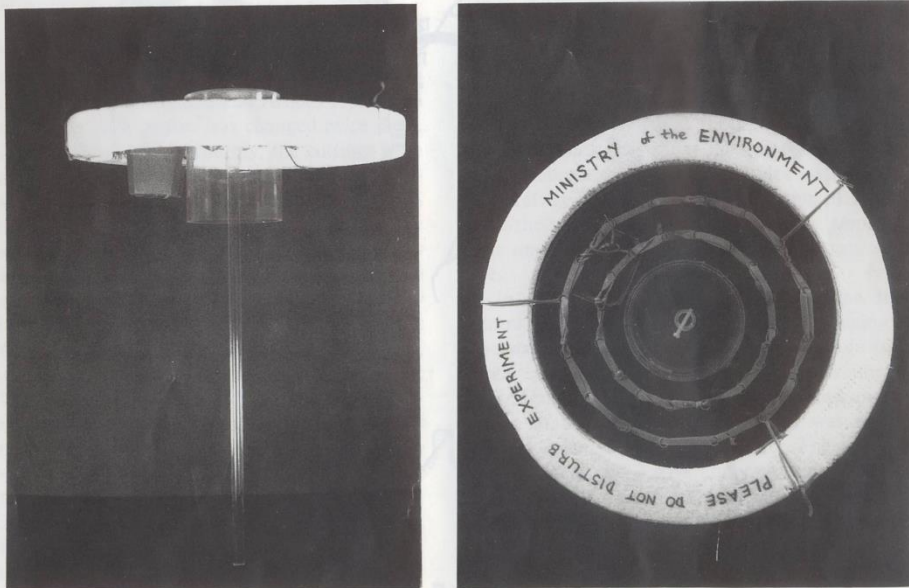


Fig. 1. Photograph of the float which held both the *Tradescantia* cuttings and the *Vicia faba* seedlings showing side and top views. For details see text.

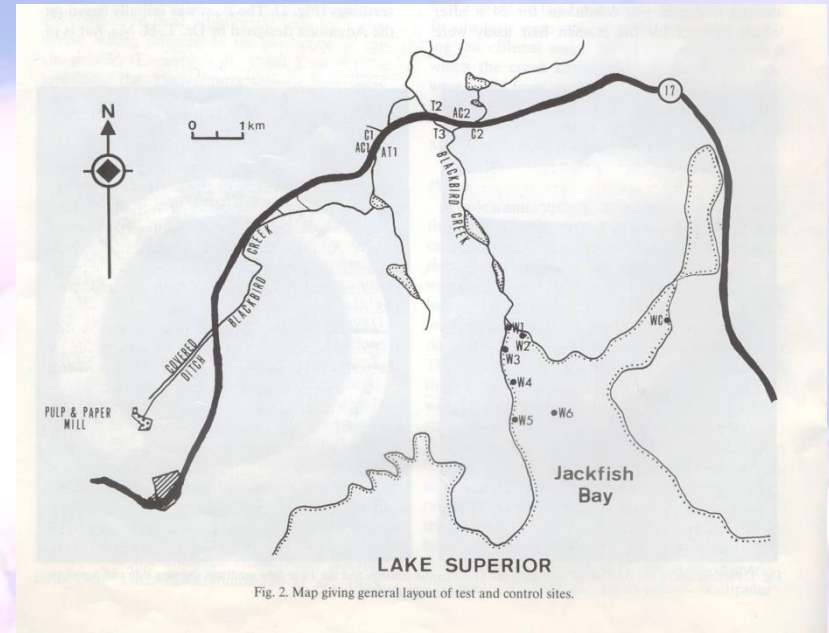


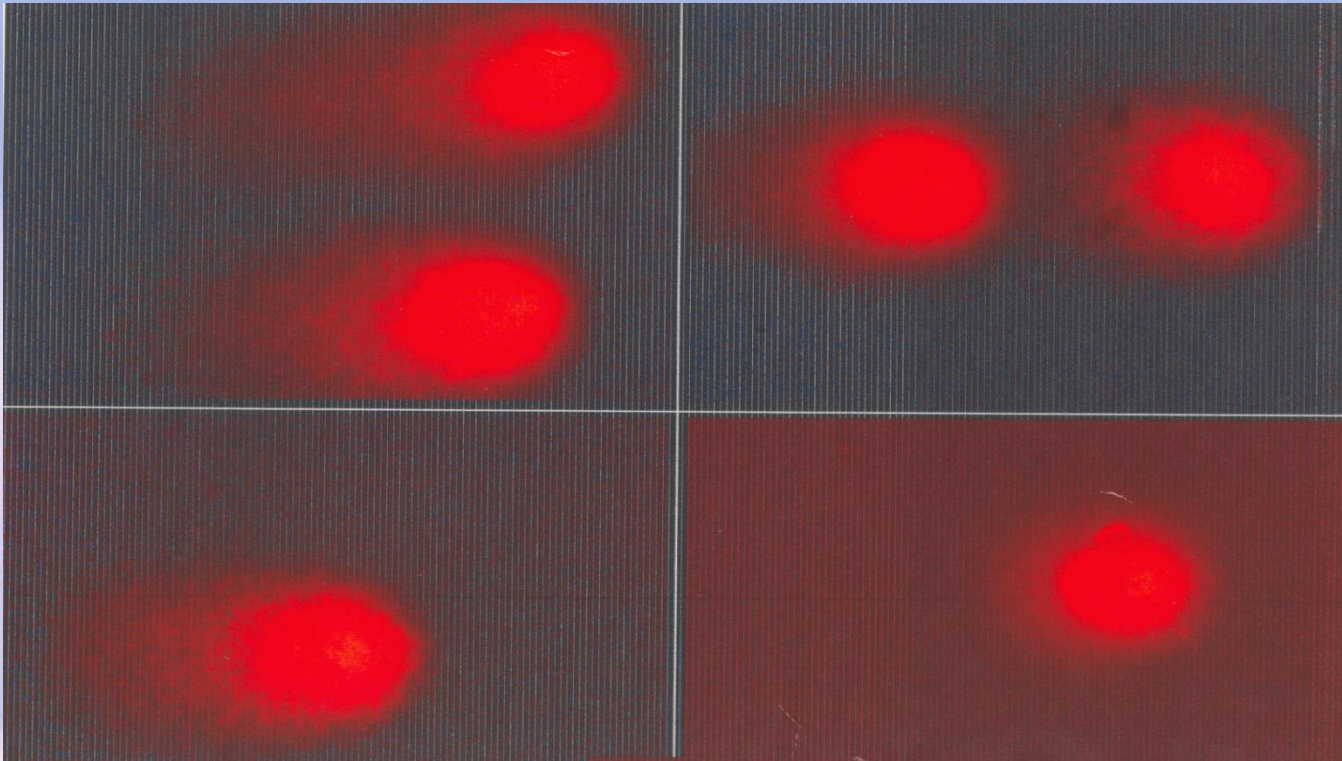
Fig. 2. Map giving general layout of test and control sites.

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

**Östling & Johansson 1984**

elektroforéza celých buněk

fragmenty jaderné DNA vycestují z jader





# Kometový test

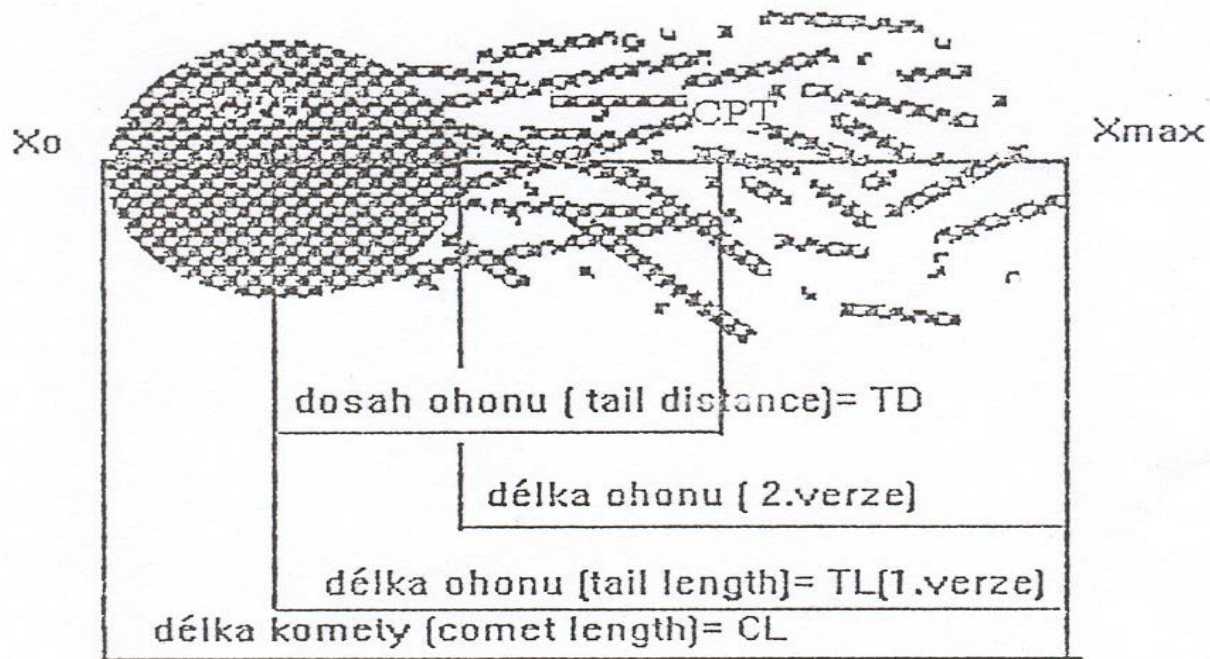
## (SCGE – gelová elektroforéza jednotlivých buněk)

- **stanovení zlomů DNA nebo lézí vedoucích ke zlomům v jednotlivých buňkách (DSB, SSB – dvou a jednořetězcové zlomy)**

### Princip:

- izolace buněk (krev)
  - nanesení na mikroskopická skla s agarózou (2 vrstvy)
  - lze buněk (lyzační pufr, detergenty a soli o vysoké koncentraci)
  - dehtaurace v alkalickém prostředí
  - **elektroforéza (DNA negativní náboj....k anodě)**
  - **fragmenty DNA vzniklé působením mutagenů vycestují z jader...komet**
  - barvení fluorescenčním barvivem - etidiumbromid
  - pozorování pod mikroskopem, měření délky komet (jader)
  - **délka ohonu je úměrná počtu zlomů !!!**
-

# Kometový test – parametry používané k hodnocení úrovně poškození DNA



Obr.č. 1. Schematické znázornění parametrů, používaných buď přímo k hodnocení poškození DNA, popř k výpočtu dalších parametrů

# Příklad použití kometového testu – délka komet po aplikaci benzpyrenu

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 triturated in fetal bovine serum were centrifuged at  $100 \times g$  and resuspended in 0.5% low melting agarose.

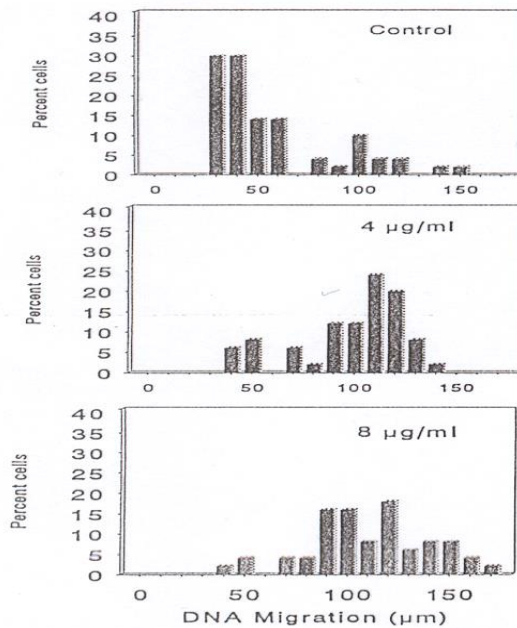


Fig. 1. Distribution of DNA migration in V79 cells treated with CP. Control treated with vehicle (water) at a final concentration of 1%.

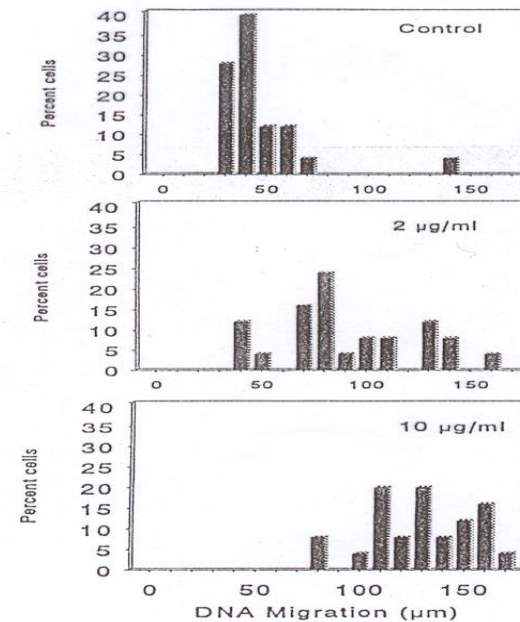


Fig. 2. Distribution of DNA migration in V79 cells treated with BP. Control treated with vehicle (DMSO) at a final concentration of 1%.

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