

Testy na detekci mutací

Genotoxicita



The international pictogram for chemicals that are sensitising, **mutagenic**, carcinogenic or toxic to reproduction.

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-definice

- ...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 – ochrana zdraví člověka

- **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, lécích, 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.

Klasifikace KARCINOGENŮ

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER) CLASSIFICATION OF CARCINOGENS:

IARC class 1-The substance is carcinogenic to humans.

IARC class 2A-The substance is probably carcinogenic to humans.červené maso...

IARC class 2B-The substance is possibly carcinogenic to humans.

IARC class 3-The substance is not classifiable as to its carcinogenicity to humans.

IARC class 4-The substance is probably not carcinogenic to humans.

Class 1 - příklady

Benzene, benzidine, benzo[a]pyrene, beryllium and beryllium compounds, carbadox, chlornapazine, chloromethyl methyl ether, 1,3-butadiene, 1,4-butanediol dimethanesulfonate (Busulphan, Myleran), cadmium and cadmium compounds, clorambucil, chromium.....uzeniny....

SEZNAM VIZ

https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_IARC_Group_1_carcinogens

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:

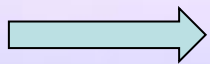
Prospektivní přístup

- 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 mutageních/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**
 Údaje o skladování produktů. Při dlouhodobém 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 nádobky odvážit.
H **Číslo šarže**
I **Výstražné symboly nebezpečnosti**
 Umožňují na první pohled rozoznat 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 nejpřesněji. 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 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.

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

Poučení studentů

Praktická výuka – práce v chemické nebo biologické laboratoři

Zásady bezpečnosti při používání chemických látek a směsí



Poučení studentů musí zahrnovat informace o:

- Rizicích souvisejících s jejich pobytem v areálu vysoké školy.
- Pokynech pro bezpečnou práci vyplývajících z právních předpisů a vnitřních předpisů vysoké školy.
- Zakázaných činnostech.
- Osobních ochranných pracovních prostředcích.
- Mimořádných provozních událostech na pracovišti.

Kdo provádí poučení studentů?

Poučení studentů se provádí dle vnitřních pravidel školy. Pakliže se poučení provádí hromadně na začátku studia, provádí ji obvykle osoba odborně způsobilá v prevenci rizik případně jiná osoba s požadovanou kvalifikací pověřená děkanem (ředitelem VŠ ústavu).

Testy mutagenicity

TESTY NA DETEKCI MUTACÍ – dle fenotypu

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 M₂

Aa x Aa → **aa**

Aa → **aa**

X^aY

Příklady testů mutagenity

cca 200 testů

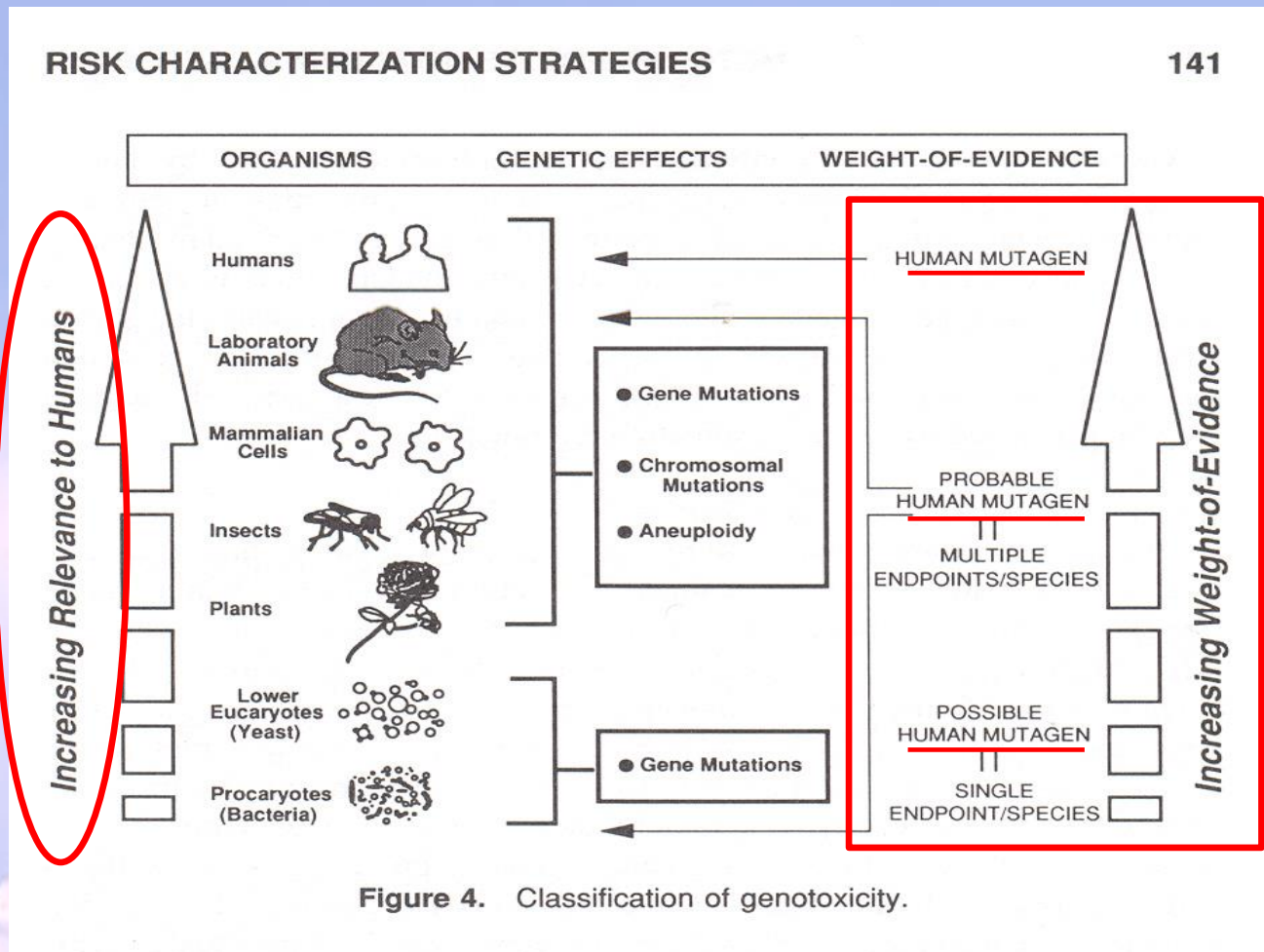
Table 1. Distribution of Tests in Genetic Activity Profile (GAP), Gene-Tox (GTX), and National Toxicology Program (NTP) Databases

Phylogenetic endpoint	GAP		GTX	NTP
	Chemicals ^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)

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**
-

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 delece genových somatických mutací u *Tradescantia*, klon 4430
- test na delece 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 (např. Dominantně Letální Mutace - hlodavci)

Příklad testovací baterie (Kanada) pro látky s omezeným použitím

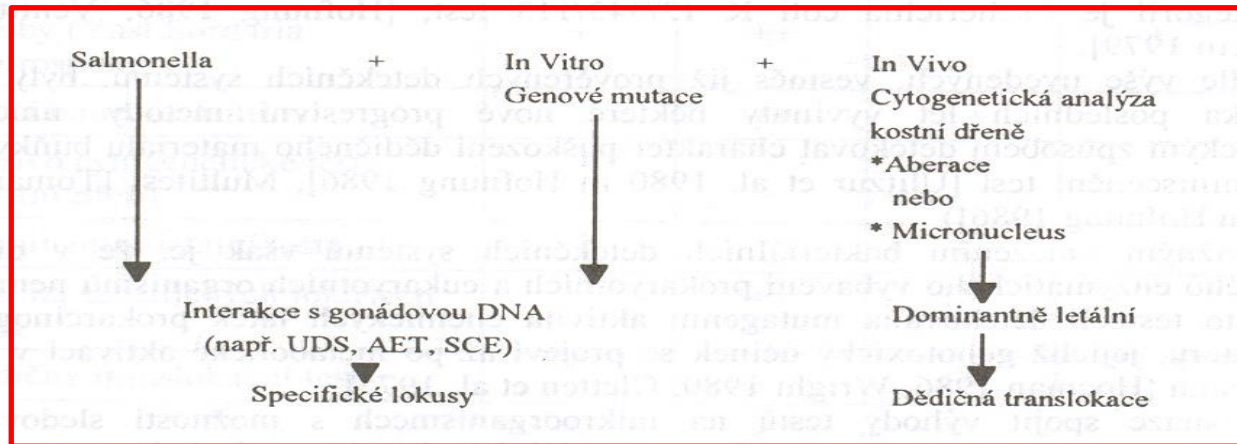
Figure 1. Mutagenicity Testing at LOC I

	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	<div style="border: 2px solid red; padding: 5px; text-align: center;"> Salmonella/mammalian microsome assay plus Mammalian <i>in vitro</i> chromosome aberration assay </div>	
TEST RESULTS	Both negative	One or both positive
CONFIRMATION OF <i>in vivo</i> RESULTS ^c	Not applicable	Not applicable
CONCLUSION	Nonmutagen	<div style="border: 2px solid red; padding: 5px; text-align: center;"> <i>in vitro</i> mutagen </div>
RECOMMENDED ACTION	No further testing required ^d	a) Review exposure b) Elevate to LOC II if indicated

90. léta min století.....OECD guidelines

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 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 ± 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.

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 (Degrassi 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, Kotlářská 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

Principy testů

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 ⁺ 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]

Plotnový test mutagenity podle Ames

- 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 přidatné markery **zvyšující citlivost** k chemickým látkám:
 - **mutace *uvrB*** – **vyřazení** a blokáda syntézy enzymů **excizní reparače**
 - **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**

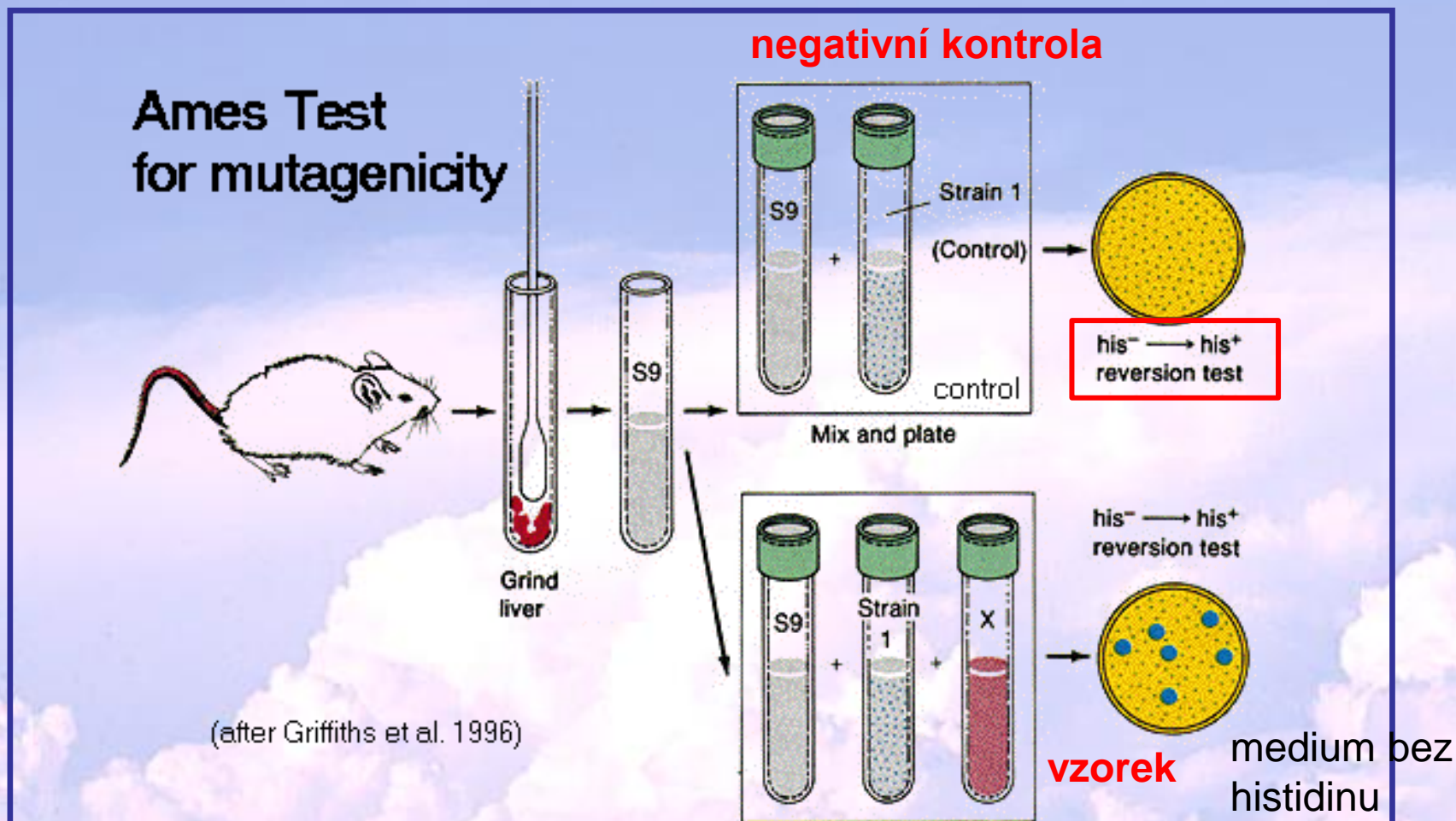
Provedení:

- 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

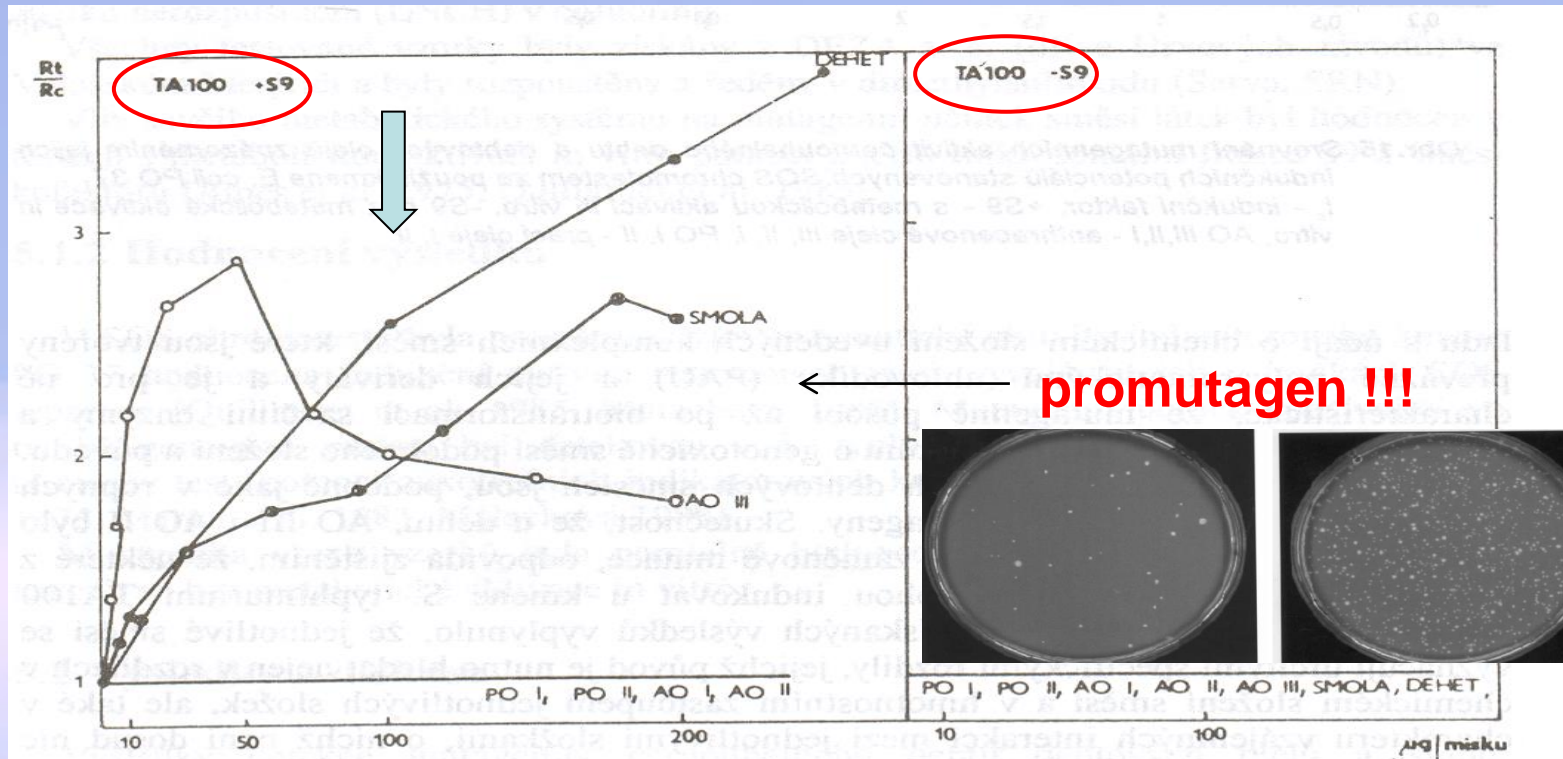
K ověření citlivosti indikátorových bakteriálních kmenů *Salmonella typhimurium* HIS⁻, užívaných v Amesově testu, se používají následující diagnostické mutageny (hodnoty pro dávky jednotlivých látek v $\mu\text{g}/\text{misku}$ jsou uváděny pro klasický plotnový test - plate incorporation assay):

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)	-	1.0ul	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 !!!

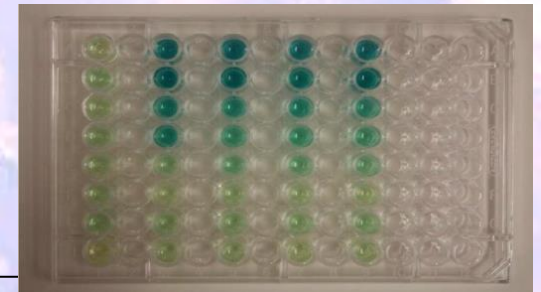
Příklad použití Ames. testu při testování mutagenity černouhelného dehtu (obsahuje hlavně PAU)



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⁺ 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 !**
- 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)**
- laboratorně je metoda založena na biochemické analýze **indukovatelné β -galaktozidázy** hodnocené **kolorimetricky !**
- **mutagenita – indukce SOS systému**



SOS reparace

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

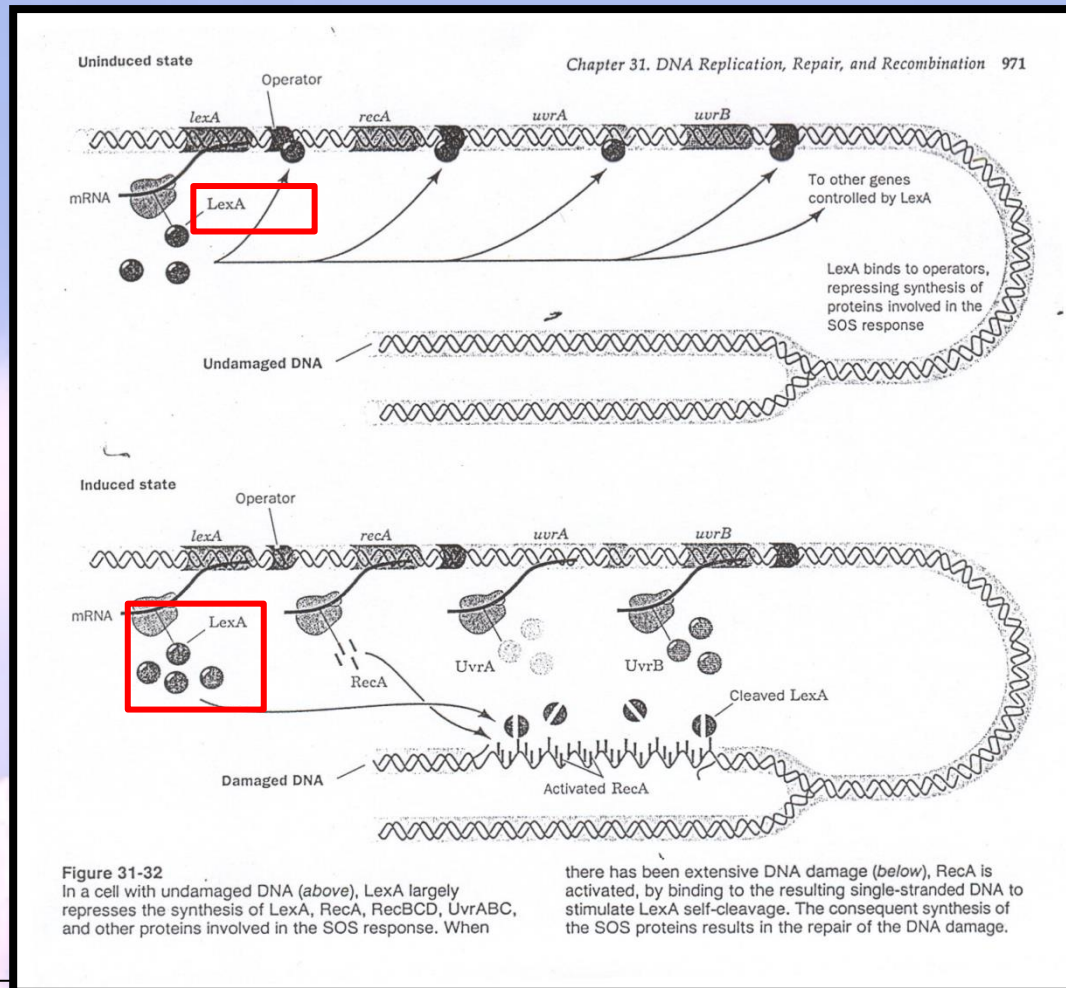
Geny **lexA**
recA
a jejich produkty

Poškození DNA -
aktivace rec A
proteinu – stěpení
lex A – exprese
genů SOS boxu

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*⁺ - 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.

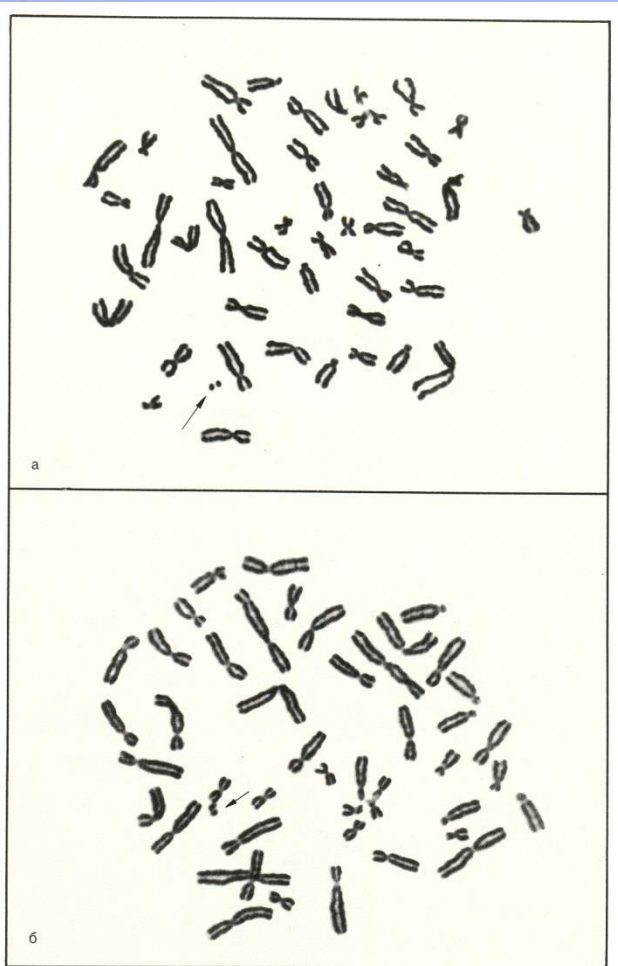
◆ **UvrC-protein** působící v komplexu s UvrB-proteinem jako endonukleáza.

◆ **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, 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 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.

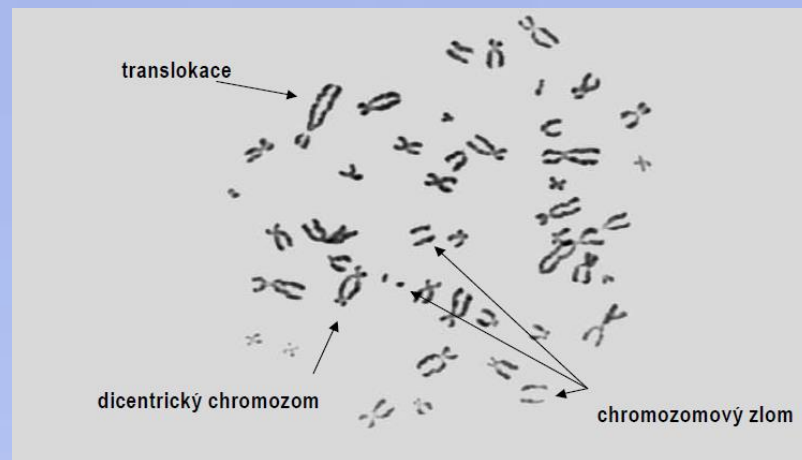
4. Bezpečnost práce

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 200 mitóz

Poškození genetického materiálu buňky analyzované jako chromozomové aberace, je projevem biologického efektu genotoxických faktorů (např. chemických sloučenin a jejich metabolitů). Metoda přímo prokazuje expozici člověka genotoxickým látkám s klastogenním účinkem, jehož projevem je indukce chromozomových aberací v somatických buňkách. Zlomy a přestavby chromozomů představují riziko aktivace onkogenů a deaktivace tumor supresorových genů.

Indukovaná poškození chromozomů somatických buněk prokazatelně zvyšují v lidské populaci riziko nádorových i degenerativních onemocnění, negativně ovlivňují funkci buněčných reparačních mechanismů a zasahují do procesu apoptózy.

Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů se používá jako biologický skupinový expoziční test. Metoda umožňuje také zhodnocení expozice genotoxickým látkám u jednotlivců.

Cytogenetická Analýza Periferních Lymfocytů = CAPL - postup

Materiál: T-lymphocyty periferní krve, G0 fáze, v organismu přetrvání 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

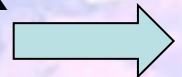
acentrické fragmenty

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

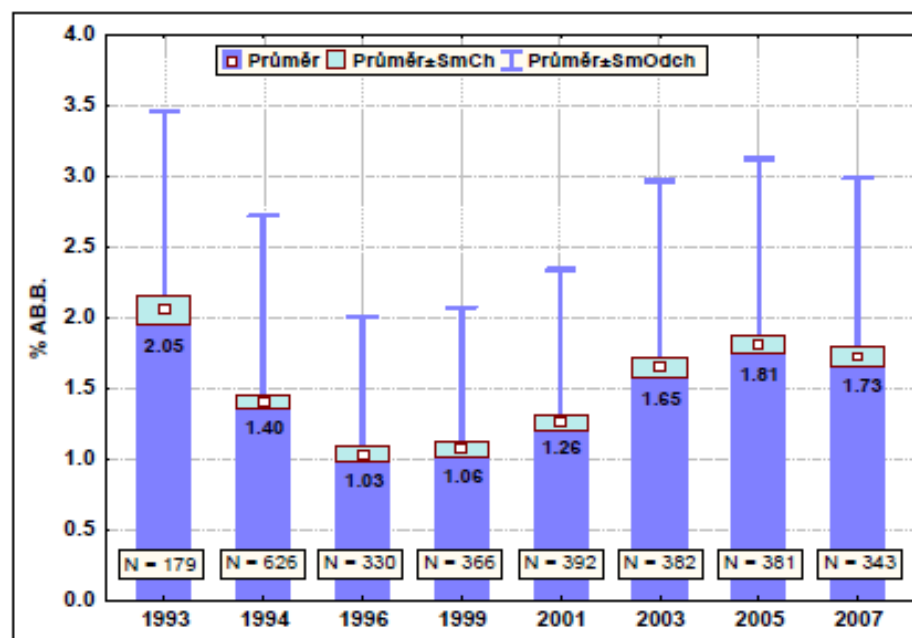
Opakované zjištění 5 a více % AB.B. je důvodem vyřazení osoby z expozice – šetření z hlediska hygieny práce !

Individuální hodnocení – interpretace výsledků

- U pacientů s vysokými hodnotami, tj. 5 a více % AB.B., se opakují odběry **za 3 – 6 měsíců** včetně šetření z hlediska hygieny práce a dalších klinických a laboratorních vyšetření. Opakovaný nálezn 5 a více % AB.B., zejména jsou-li přítomny závažné typy aberací jako např. chromozomové výměny, DIC, TIC, je důvodem k **dočasnému nebo i k trvalému vyřazení pacienta z expozice.**
 - Výsledky cytogenetického vyšetření jednotlivců se zasílají závodnímu lékaři formou zprávy o cytogenetickém vyšetření, kde jsou uvedeny údaje pro jednoznačnou identifikaci vzorku a výsledek formou číselných údajů pro % AB.B., Z/B, počet analyzovaných buněk. Zpráva o cytogenetickém vyšetření obsahuje ještě aberace závažného typu: V1, V2 a buňky s více než 5 aberacemi, případně jiný detailní popis aberací.
-

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:

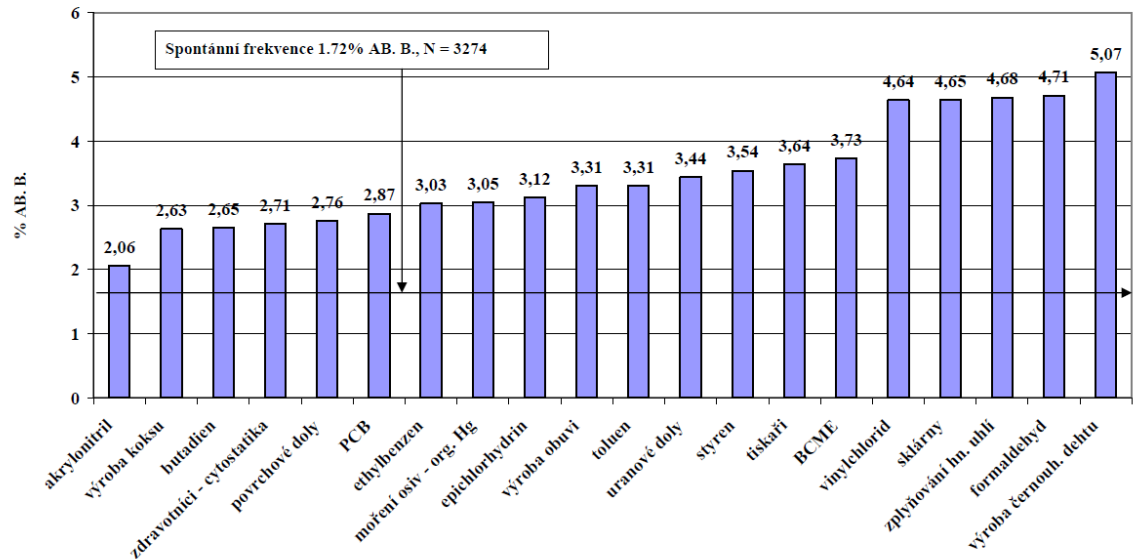
Příjmení: _____ Rok narození: _____
 Jméno: _____ Rodné číslo: _____
 Bydliště: _____ Datum odběru: _____

pracoviště v době odběru:..... ano – ne
 v riziku: ano – ne
 virové onemocnění v posledních 3 měsících: ano – ne
 jiná onemocnění (jaká):..... ano – ne
 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:.....

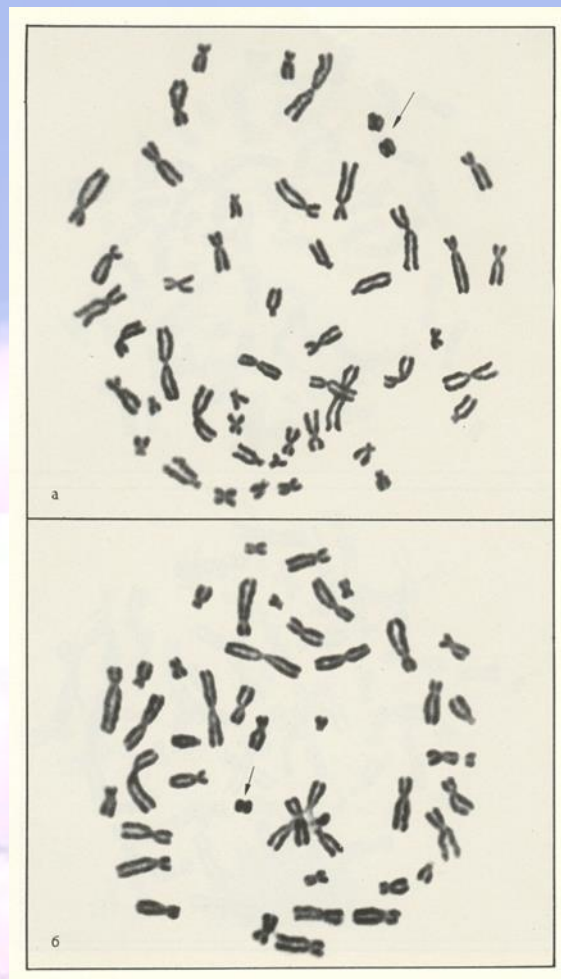
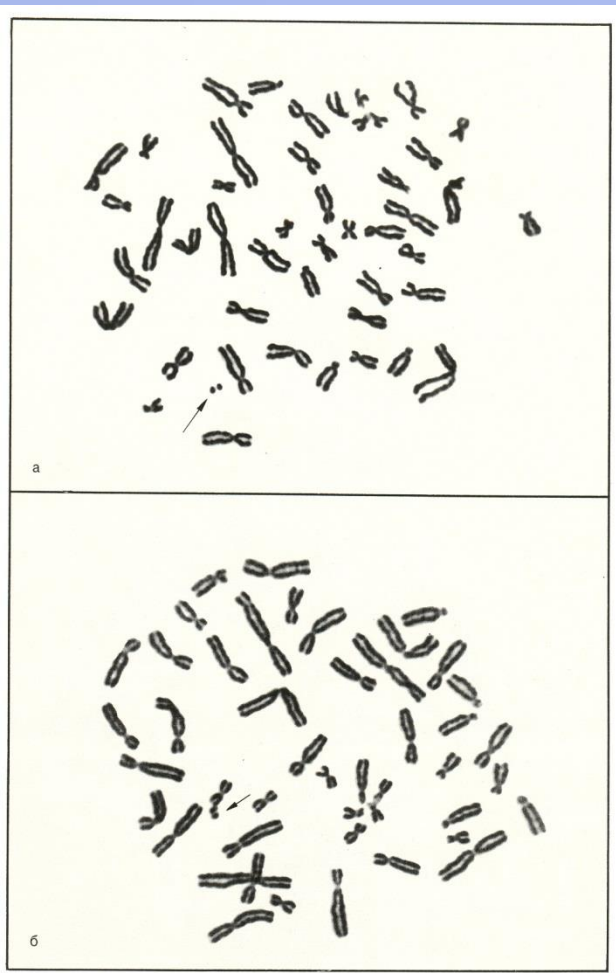
Nehodící se škrtněte

22

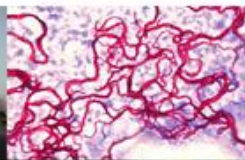
FREKVENCE CHROMOZOMOVÝCH ABERACÍ PŘI PROFESIONÁLNÍ EXPOZICI GENOTOXICKÝM LÁTKÁM V LETECH 1977 - 2006



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: Bi6270 Cytogenetika

Testy mutagenity na *Drosophila melanogaster*

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



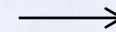
SMART - wing spot test

APLIKACE: WING SPOT TEST

POSTUP:

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

SAMEČEK		SAMIČKA
$mwh + e$		$+ flr^3 +$
X		
$mwh + e$		$+ TM1 e$
↓		
<div style="border: 2px solid red; padding: 5px; display: inline-block;">$\frac{mwh + e}{+ flr^3 +}$</div>		

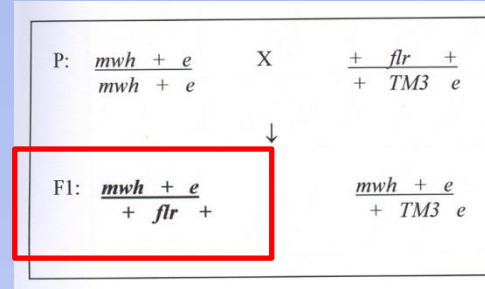
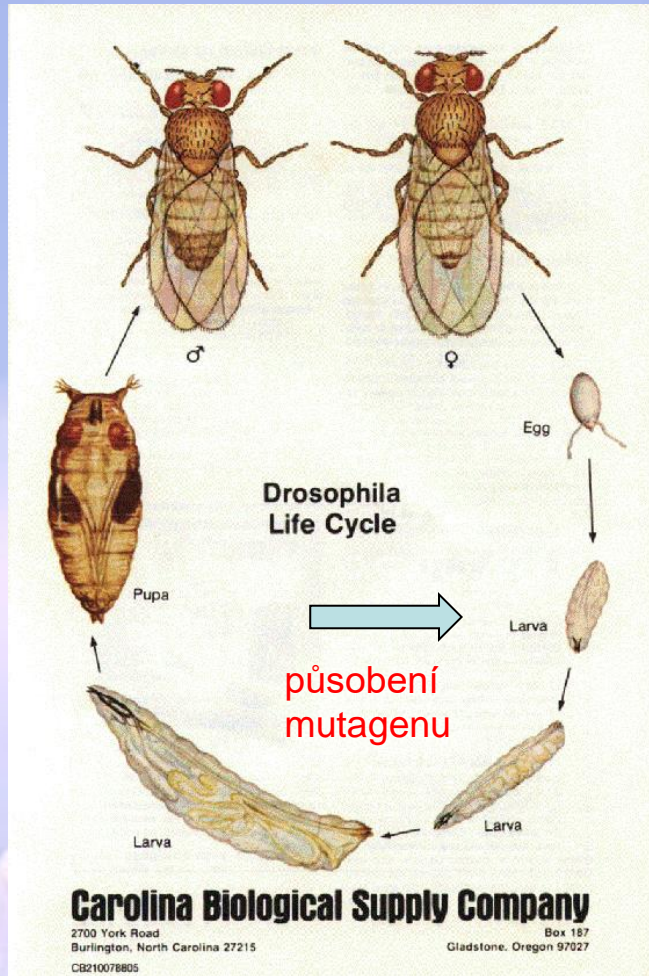


$mwh+ / +flr$

**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

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

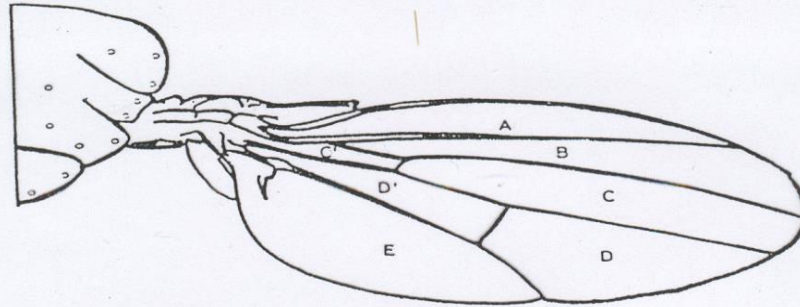
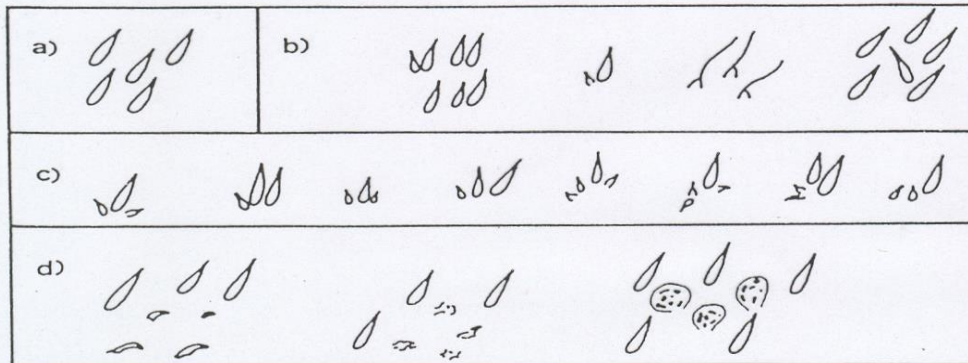


Fig. 2. Normal half mesothorax showing the regions A-E of the wing surface scored for spots (after Garcia-Bellido and Merriam [1971a]).

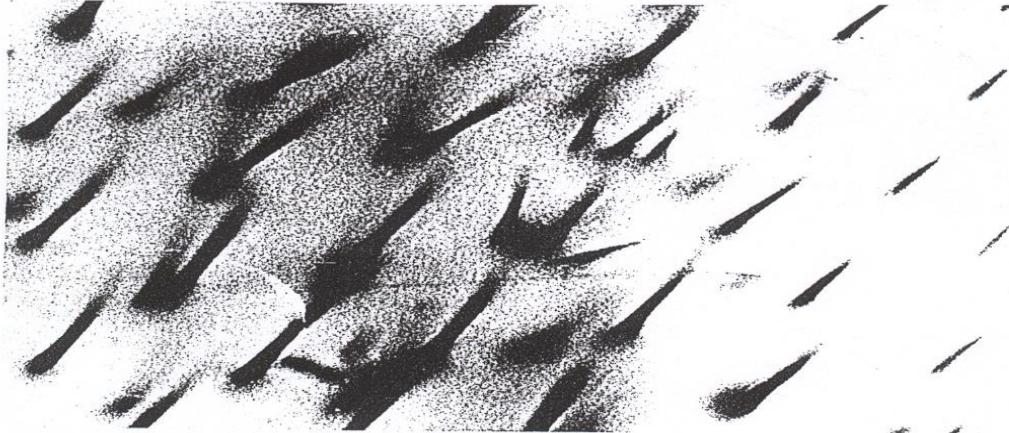


mwh

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 flr³

SMART test – princip – mutace standardní alely u heterozygota či mitot. rekombinace

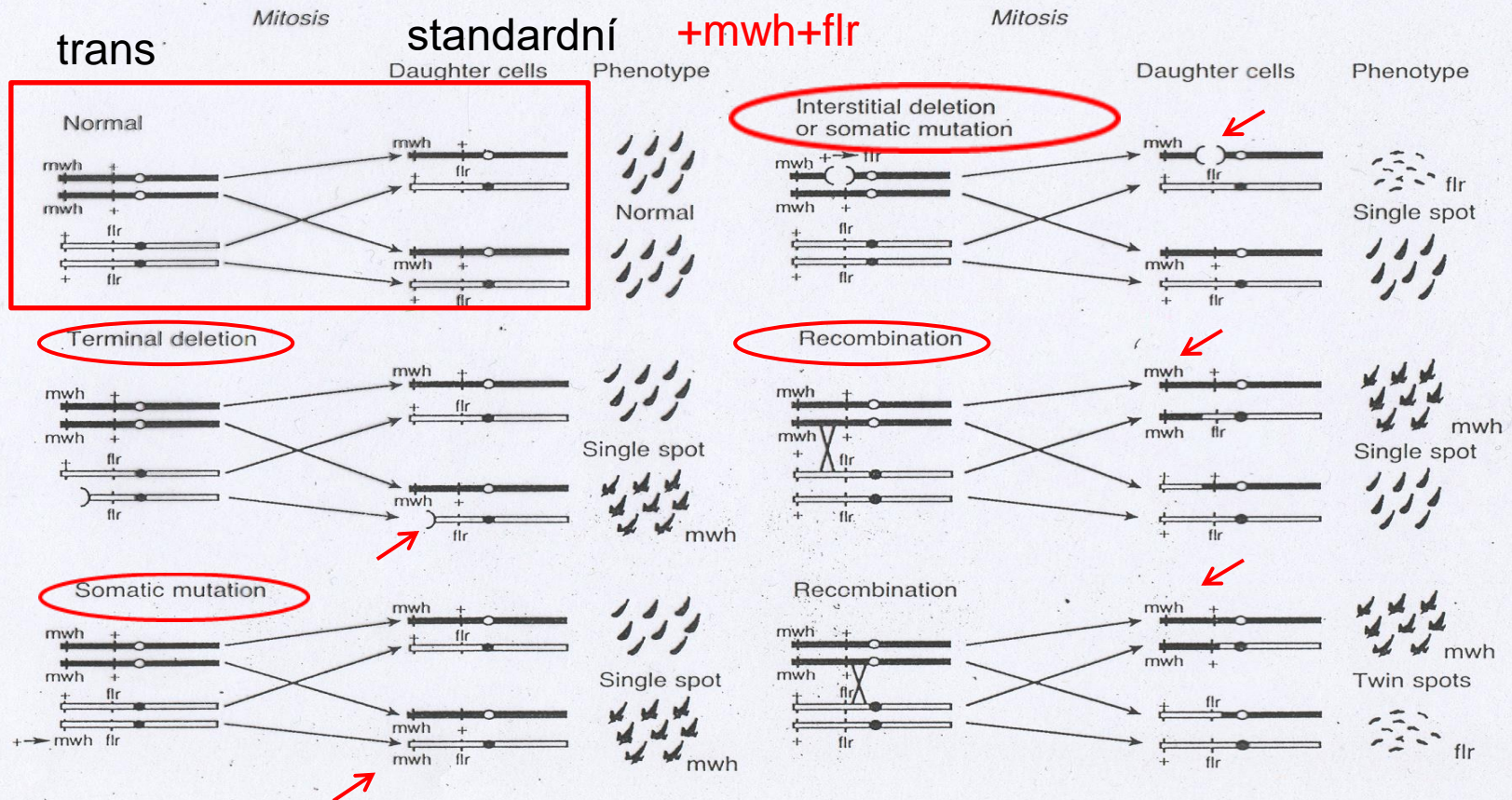
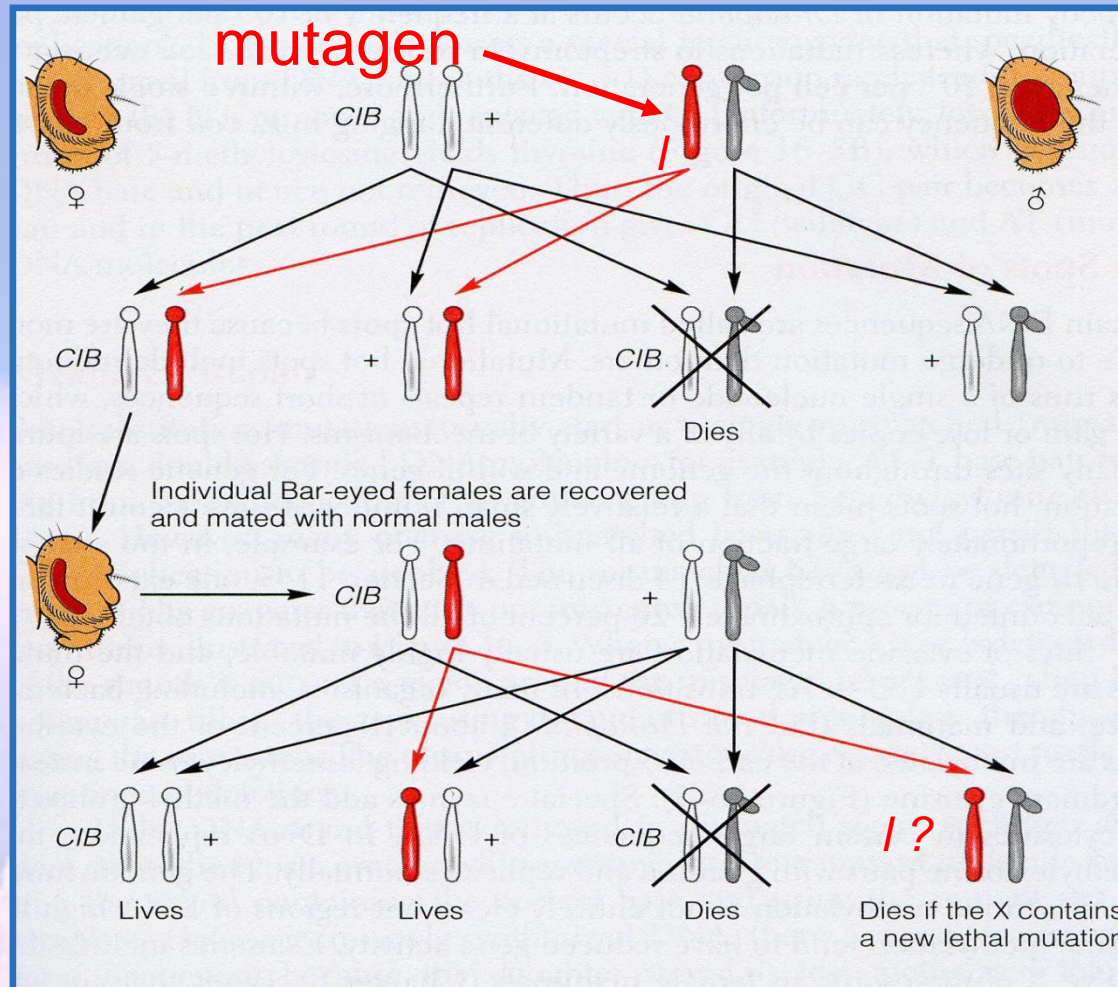


Fig. 2. The origin of mosaicism during mitotic divisions in the wing. Point mutation or deletion of *mwh* and *flr* gives rise to single spots. Recombination between *mwh* and *flr* gives rise to a *mwh* single spot. Twin spots of *mwh* and *flr* are produced by recombination between the centromere and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

CIB test u *Drosophila melanogaster*

XX x XY P
↓ ↓ ↓
XX x XY F1
↓
XY F2

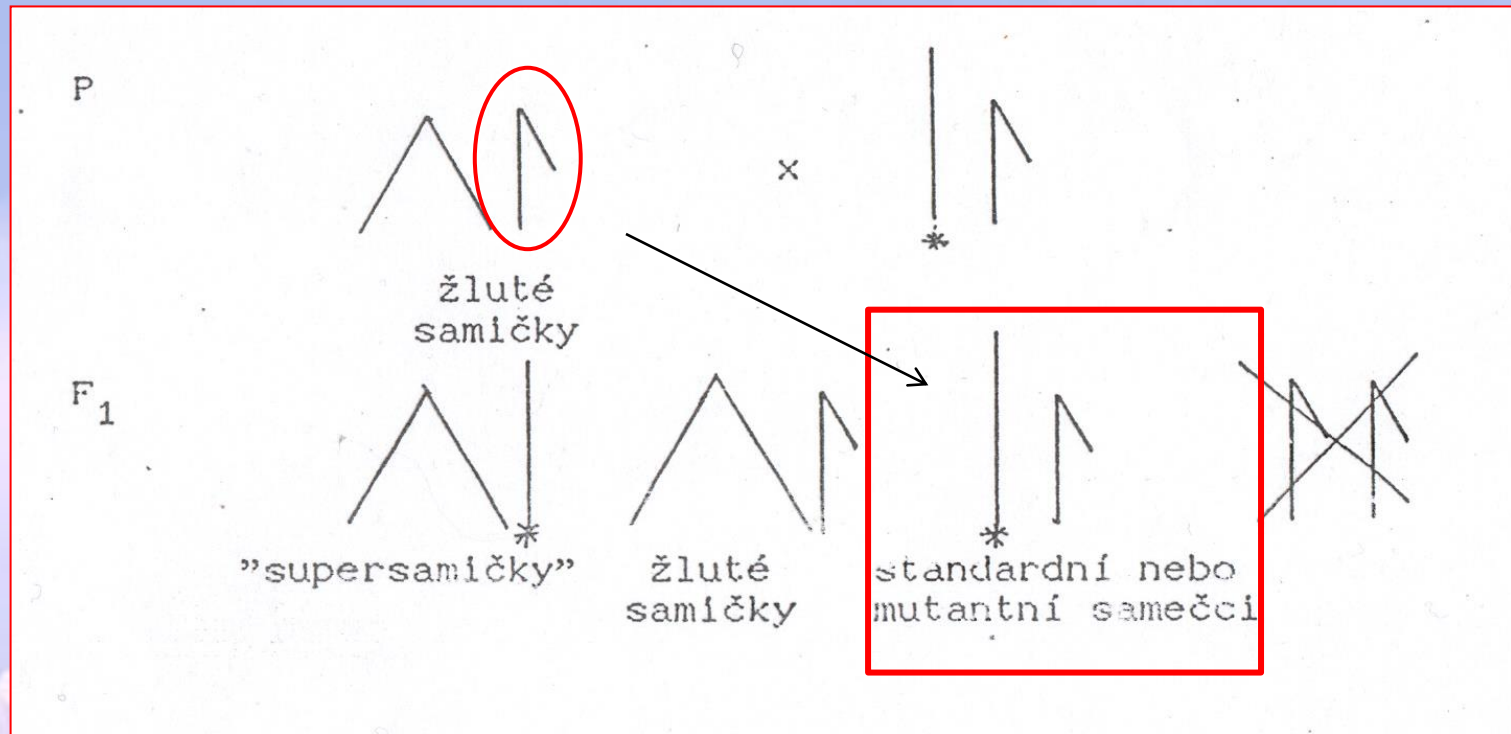


V případě vzniku letální mutace – **nebudou v generaci F2 samečci !**

Attached X test – *Drosophila melanogaster*

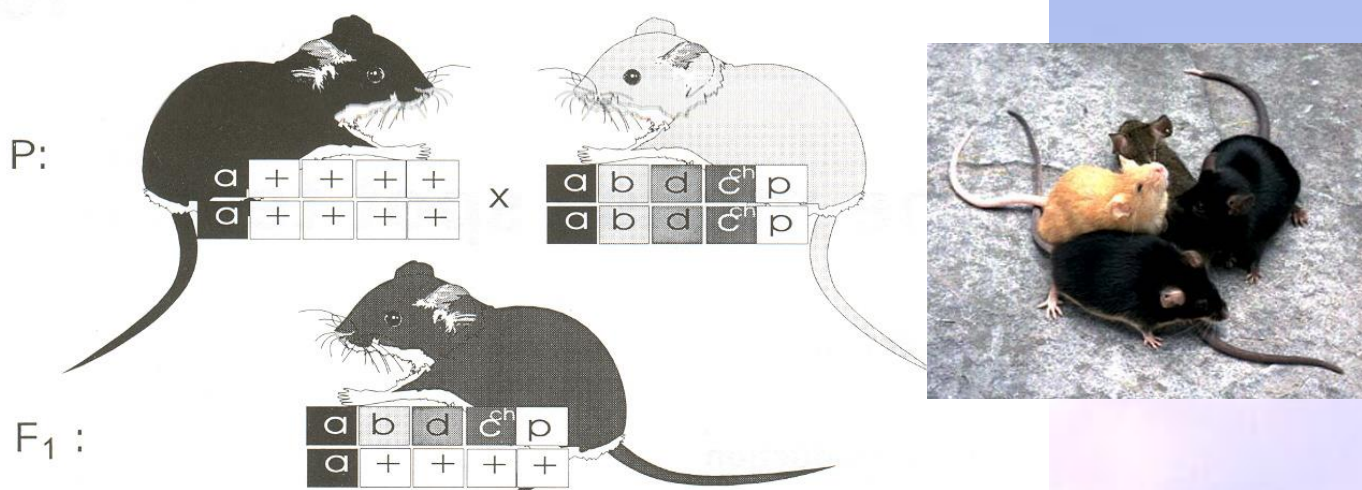
samičky $\widehat{X^yX^yY} \times XY$

Výsledky – už v generaci F1 !!!



Spot test u myši (somatické mutace)

Působení mutagenu na embrya heterozygotní pro geny barvy srsti !



P:

a	+	+	+	+
a	+	+	+	+

 x

a	b	d	c ^h	p
a	b	d	c ^h	p

F₁:

a	b	d	c ^h	p
a	+	+	+	+

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

10.3 Test principle

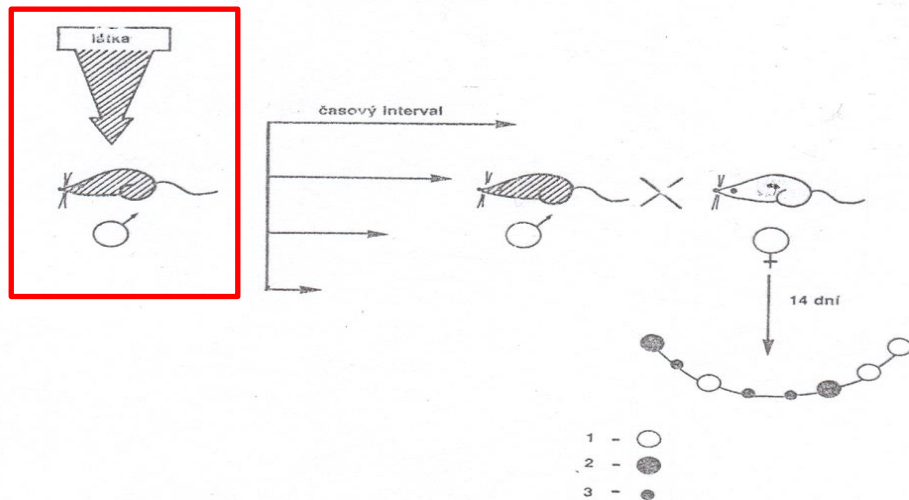
Embryos heterozygous for different recessive coat colour mutations are treated *in utero* with a mutagen, preferably between the 9th and the 11th day of fetal development. This is normally performed by intraperitoneal (i.p.) injection or treatment *per os* of the mother. If this treatment leads to the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

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 vaječnících, v děloze počet živých (1) a resorbovaných (2, 3) zárodků. Ze získaných hodnot jsou určovány charakteristiky dominantní letality.



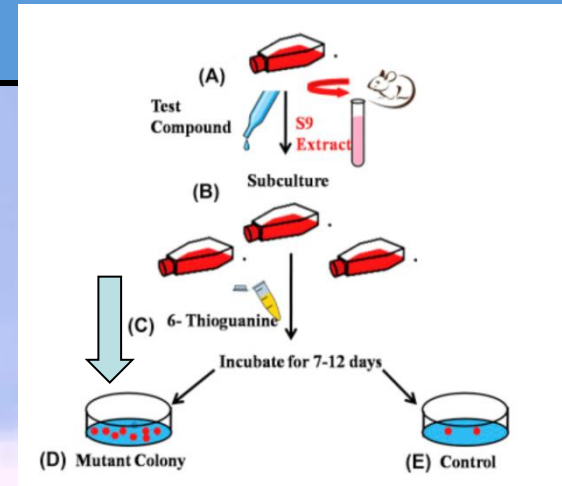
Obr. 59 Schéma testu na stanovení dominantních letálních mutací u myší (vysvětlení v textu).

Genetické změny ve spermiích - aberace, genové mutace

zánik zygot u samic

HPRT test – resistance to 6-thioguanine

- **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 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 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 ^{a,*}, S.A. Badayev ^b, S.I. Demchenko ^b, J. Relichová ^c, S.S. Sandhu ^d,
P.D. Usmanov ^e, O. Usmanova ^e, J. Velemínský ^a

^a *Institute of Experimental Botany, Na Karlovce 1a, 16000 Prague 6, Czech Republic*

^b *Institute of Chemical Physics, Moscow, Russia*

^c *Faculty of Science, Department of Genetics, Brno, Czech Republic*

^d *U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC, USA*

^e *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 (NaN₃) 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

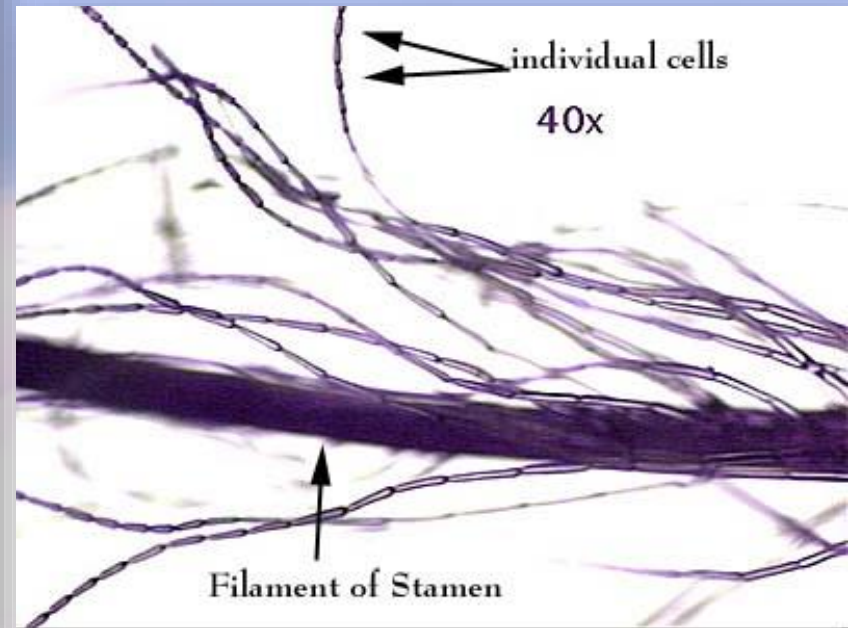
Tradescantia test – test na detekci somatických mutací

- 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 delecí 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**

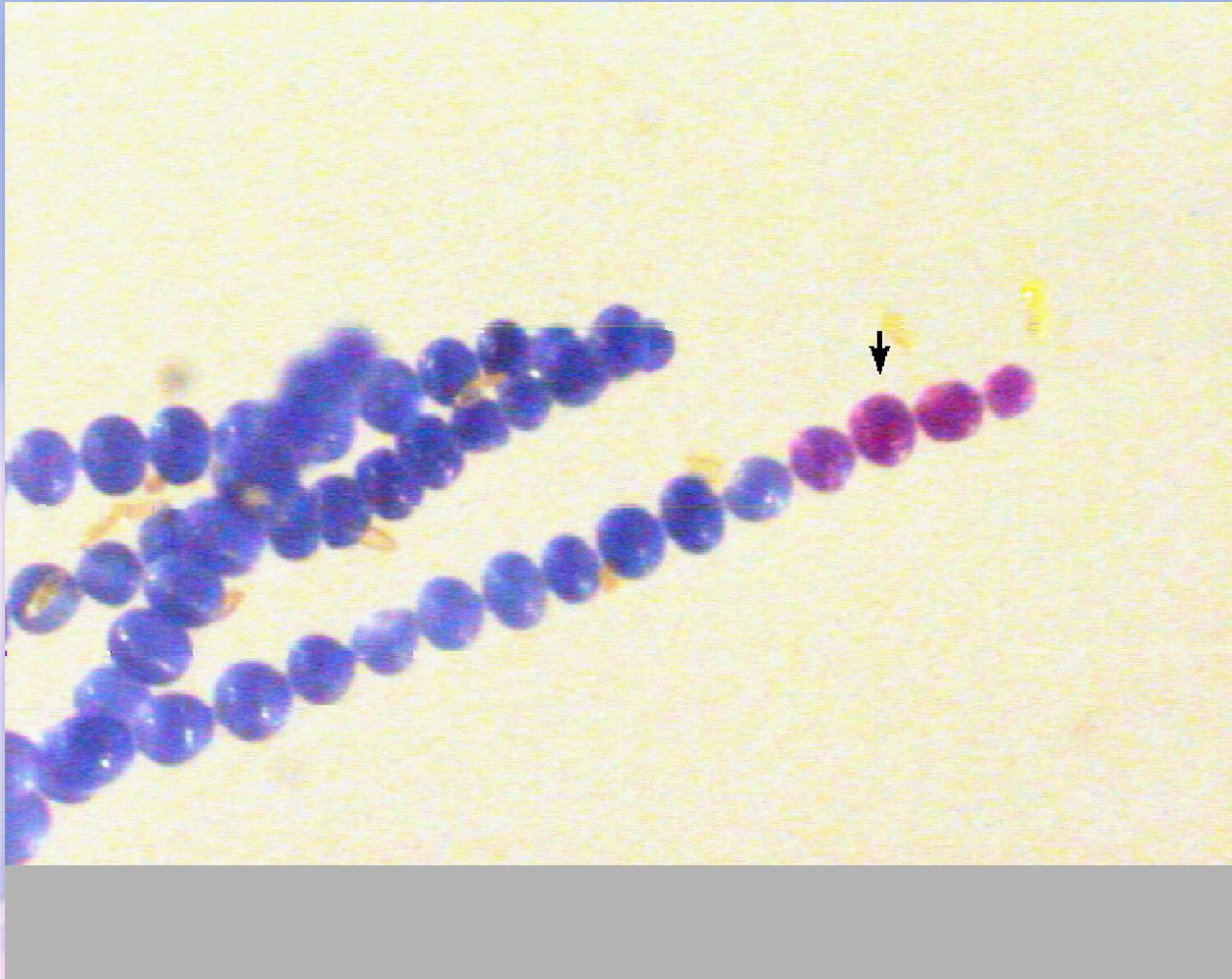


- **Vhodné pro testování herbicidů, fungicidů, insekticidů, exhaláty ovzduší, znečištění vody, půdy**

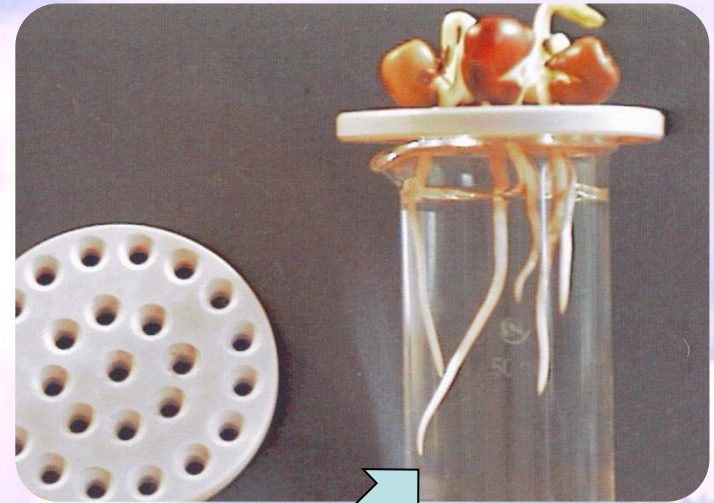
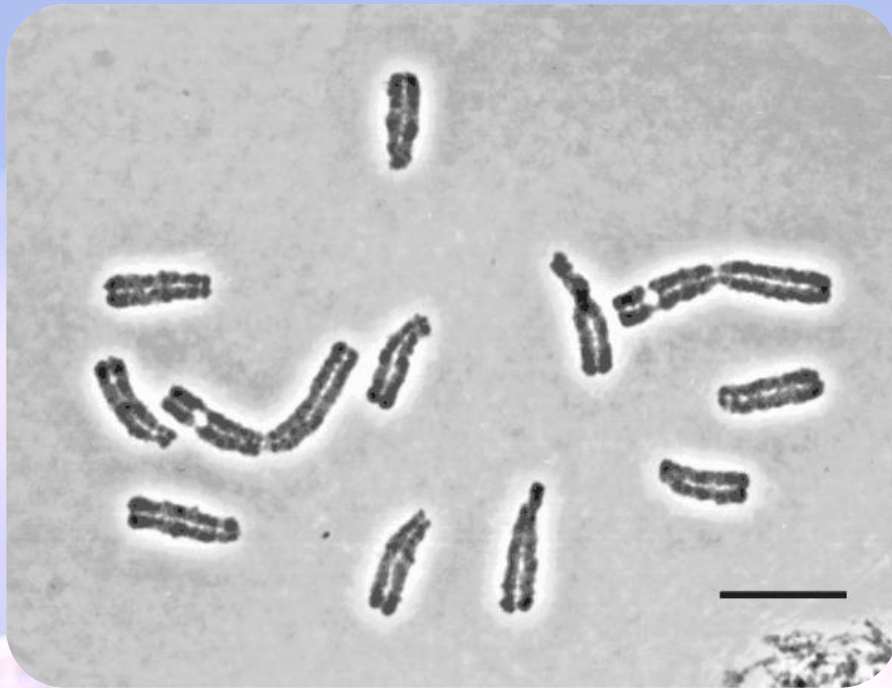
Tradescantia test



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 ^a, H.G. Lee ^b, D.M. Logan ^b and M.F. Salamone ^c

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

^b Department of Biology, York University, North York, Ontario M3J 1P3, Canada and ^c 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

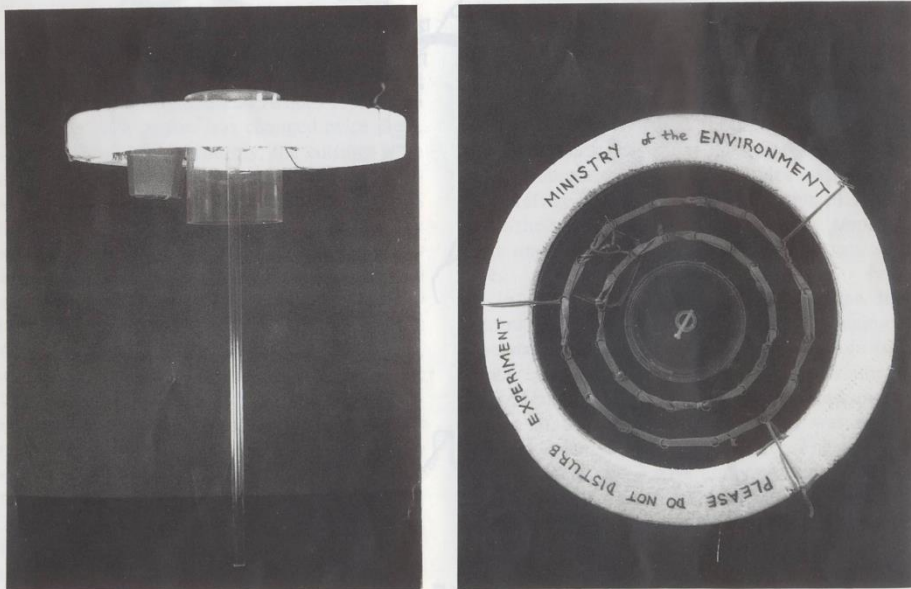


Fig. 1. Photograph of the float which held both the *Tradescantia* cuttings and the *Vicia faba* seedlings showing side and top views. For details see text.

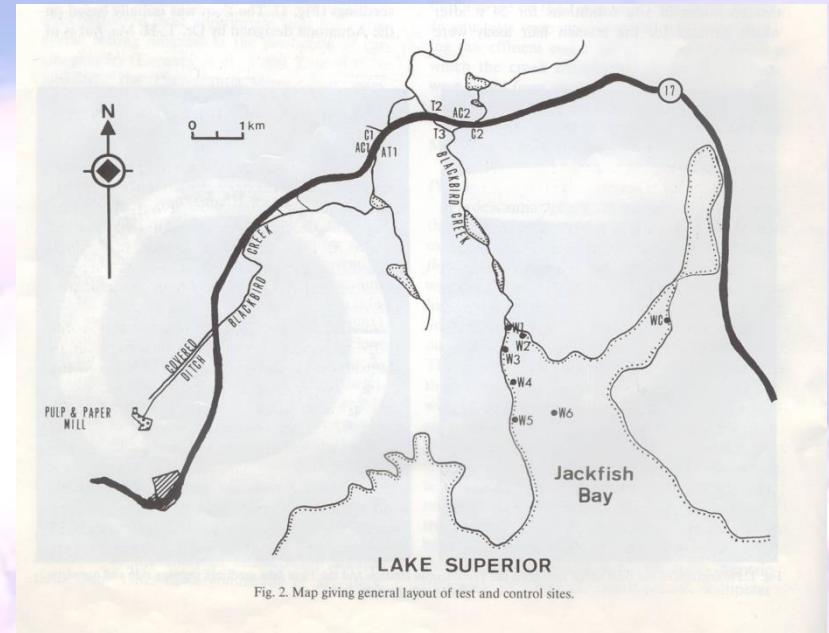


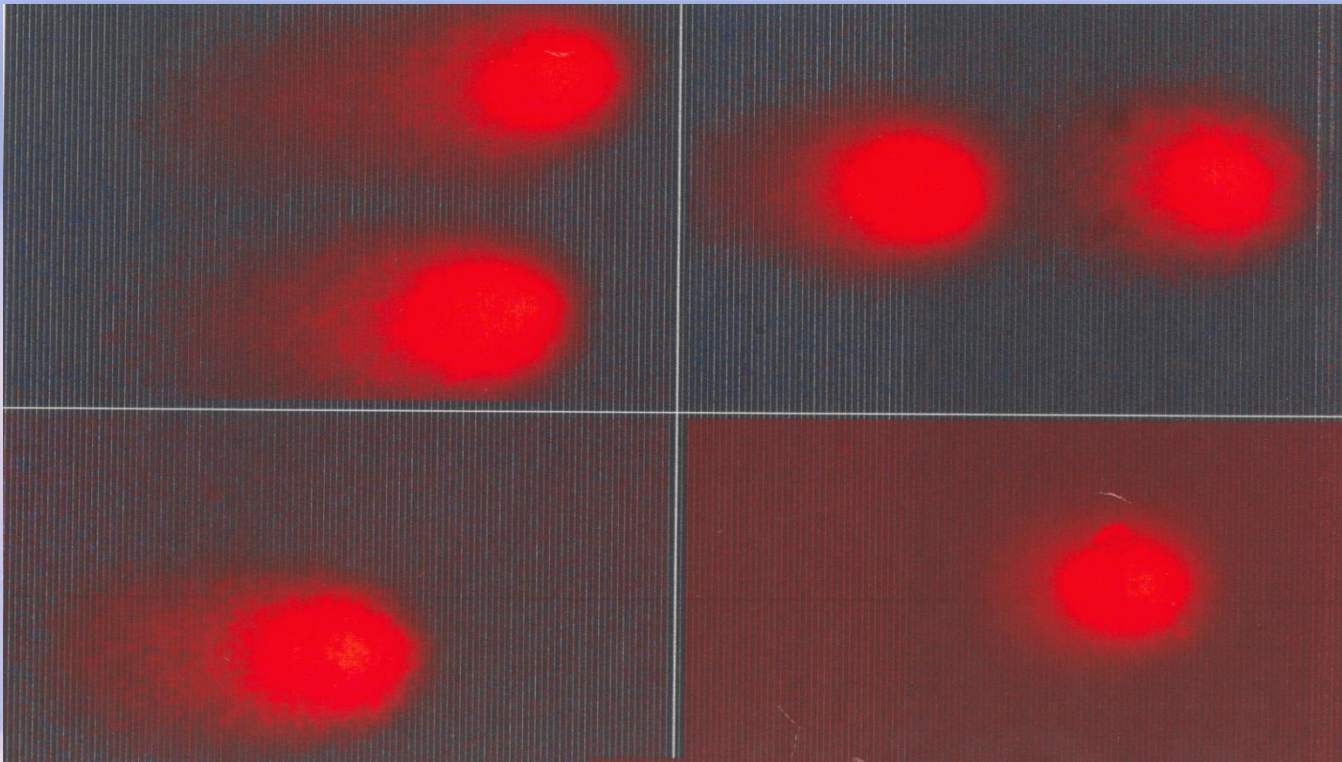
Fig. 2. Map giving general layout of test and control sites.

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

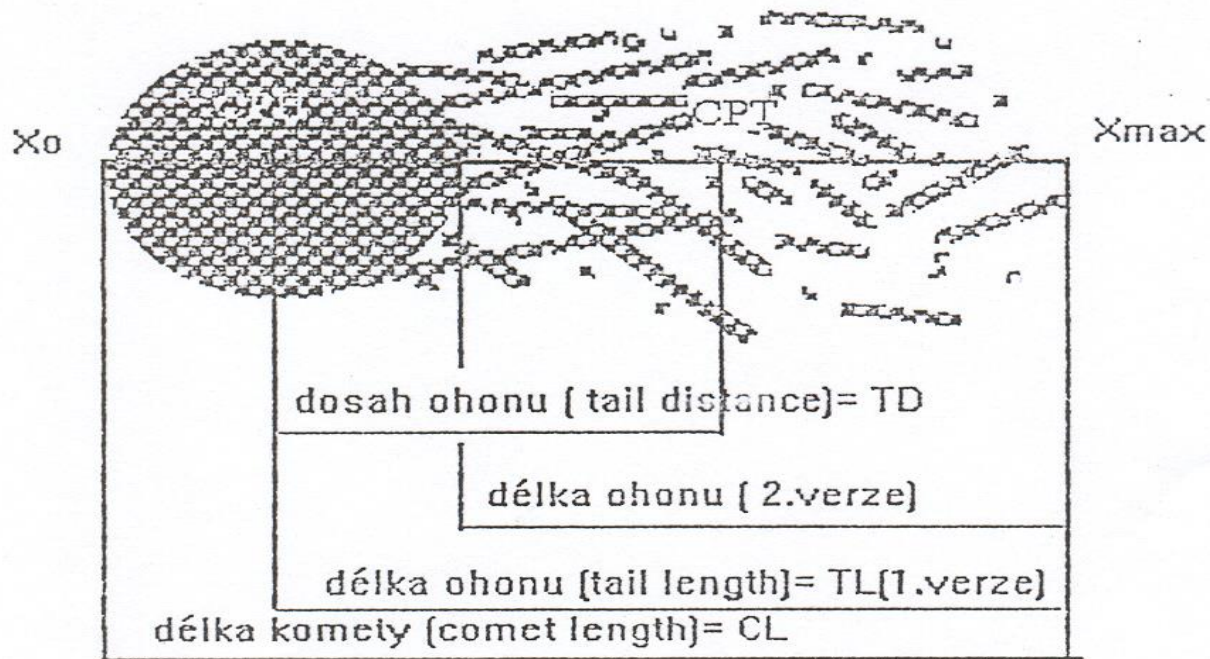
(SCGE – gelová elektroforéza jednotlivých buněk)

- **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)
 - lýze buněk (lyzační pufr, detergenty a soli o vysoké koncentraci)
 - dentaurace v alkalickém prostředí
 - **elektroforéza (DNA negativní náboj....k anodě)**
 - **fragmenty DNA vzniklé působením mutagenů(zlomy) vycestují z jader...kometa**
 - 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.

Délka kometry

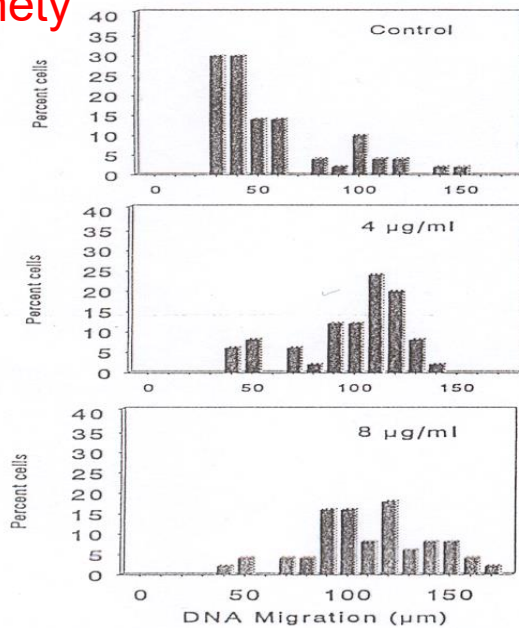


Fig. 1. Distribution of DNA migration in V79 cells treated with CP. Control treated with vehicle (water) at a final concentration of 1%.

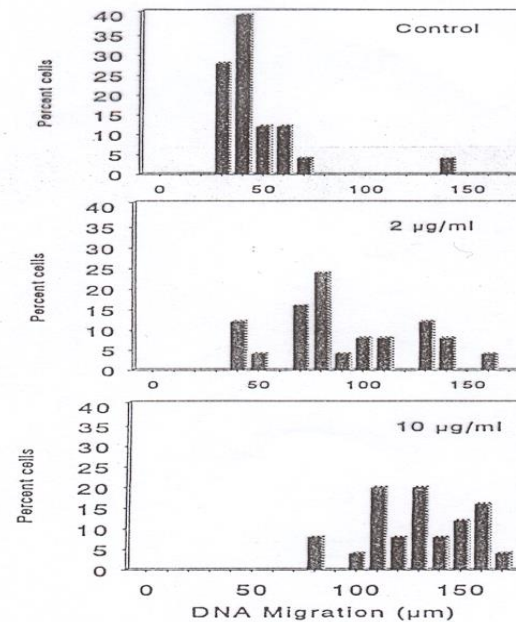


Fig. 2. Distribution of DNA migration in V79 cells treated with BP. Control treated with vehicle (DMSO) at a final concentration of 1%.

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

Děkuji za pozornost

Konec kurzu :-)

