

HANNA CZECZOT, IWONNA RAHDEN-STAROŃ

WYBRANE KRÓTKOTERMINOWE TESTY BAKTERYJNE I NA ORGANIZMACH EUKARIOTYCZNYCH, STOSOWANE DO OCENY GENOTOKSYCZNOŚCI ŚRODOWISKOWYCH ZANIECZYSZCZEŃ CHEMICZNYCH

CERTAIN SHORT-TERM BACTERIAL AND EUKARYOTIC TESTS FOR DETECTION OF GENOTOXICITY OF ENVIRONMENTAL CHEMICAL CONTAMINANTS

Katedra i Zakład Biochemii,  
Akademia Medyczna,  
02-097 Warszawa, ul. Banacha 1  
Kierownik: prof. dr hab. T. Szymczyk-Wasiluk

*W opracowaniu przedstawiono możliwości wykorzystania różnych testów bakteryjnych i eukariotycznych do oceny genotoksyczności środowiskowych substancji chemicznych.*

Wraz z obserwowanym w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat dynamicznym rozwojem przemysłu i chemizacją rolnictwa znacznie wzrosło skażenie środowiska związkami chemicznymi, z których wiele stanowi potencjalne źródło występowania niepożądanych, a nawet groźnych skutków zdrowotnych, między innymi choroby nowotworowej. Przyjmuje się, że u podłoża choroby nowotworowej leżą dwa rodzaje czynników kancerogennych, wśród których jedną kategorię stanowią te, które uszkadzają geny związane z kontrolą podziałów i migracji komórek. Do drugiej kategorii czynników kancerogennych należą takie związki, które nie uszkadzają genów, lecz selektywnie przyspieszają rozwój komórek guza. Obecnie przyjmuje się, że rak rozwija się wówczas, gdy w jednej komórce kumuluje się pewna krytyczna liczba mutacji. Wiadomo, że szereg chemicznych zanieczyszczeń środowiska wywołuje różnego typu uszkodzenia cząsteczki DNA (Tab. I). Istnieje zatem pilna potrzeba wskazania środowiskowych mutagenów, których oddziaływania stanowią dla ludzi potencjalne ryzyko związane z chorobą nowotworową.

Najbardziej przydatne w ocenie rakotwórczego działania związków chemicznych są długotrwałe badania na zwierzętach laboratoryjnych. Czynnikiem poważnie ograniczającym zakres tych badań są wysokie koszty oraz czas trwania eksperymentu. Możliwości testowania nie nadążają za potrzebami, jakie pojawiły się w momencie wprowadzenia do stosowania w środowisku człowieka wielu nowych substancji chemicznych oraz tych stosowanych już od wielu lat. Wszystkie te związki muszą bowiem być dokładnie zbadane w aspekcie działania rakotwórczego. Dlatego też do wstępnej oceny genotoksyczności związków chemicznych polecane są metody tańsze i szybsze.

Tabela I Uszkodzenia w cząsteczce DNA identyfikowane w testach bakteryjnych i eukariotycznych  
DNA damages identified in bacterial and eucaryotic tests

TESTY BAKTERYJNE	TESTY EUKARIOTYCZNE
RODZAJ USZKODZEŃ DNA	
Mutacje punktowe	Mutacje punktowe
Jedno- i dwuniciowe pęknięcia DNA	Jedno- i dwuniciowe pęknięcia DNA
Modyfikacje zasad azotowych:	Aberracje chromosomowe
alkilacje	Wymiany chromatyd siostrzanych
utlenianie	Mikrojądra
otwarcie pierścienia imidazolowego puryn	Rekombinacje mitotyczne i mejotyczne
Rekombinacje	Addukty
Addukty	Zaberrowane krypty w nabłonku jelita
	Anomalie plemnikowe

Postęp badań stworzył bowiem przesłanki do opracowania krótkoterminowych testów umożliwiających wstępną ocenę i wykrywanie potencjalnych kancerogenów, które posiadają właściwości mutagenne.

Znamy obecnie kilkadziesiąt testów pozwalających praktycznie na oznaczenie wszystkich typów uszkodzeń materiału genetycznego. Wykonywane są one na różnym materiale biologicznym, począwszy od komórki bakteryjnej po komórki ssaków, a także bezpośrednio na ssakach, roślinach i owadach, jak również w płynach ustrojowych ludzi narażonych np. w związku z pracą zawodową. Żadna, niestety, z obecnie znanych metod oceny genotoksyczności związków chemicznych nie spełnia warunków idealnego systemu badawczego i dlatego też jedynie wyniki uzyskane w doświadczeniach wielotestowych pozwalają na identyfikację większości mutagenów/kancerogenów. Pomimo wysokiej korelacji pomiędzy właściwościami mutagennymi i kancerogennymi badanych związków, jakie wykazują niektóre testy, powinny one służyć jedynie do wstępnej selekcji związków chemicznych do dalszych badań i nie mogą zastąpić długookresowych badań rakotwórczości na zwierzętach. Najpełniejszy obraz wpływu czynników środowiskowych na rozwój nowotworów u ludzi daje oczywiście analiza epidemiologiczna. Powodzenie tej metody zależy jednak od trafnego sformułowania hipotezy i dobrania odpowiedniej grupy kontrolnej.

W opracowaniu przedstawiono wybrane krótkoterminowe testy bakteryjne i na organizmach eukariotycznych, służące do określania właściwości genotoksycznych związków chemicznych, obecnych w środowisku człowieka. Testy powszechnie stosowane w laboratoriach (np. test *Amesa* i in.) zostały opisane bardziej skrótowo.

#### TESTY BAKTERYJNE

Dzięki temu, że bakterie charakteryzuje szybki wzrost, krótkoterminowe testy bakteryjne są proste, szybkie i względnie niedrogie w stosowaniu. Na szczególne podkreślenie zasługuje wysoka korelacja między związkami, które są genotoksyczne dla komórki

bakteryjnej, a ich mutagennością oraz zdolnością do inicjowania nowotworów u ssaków [40, 41, 59]. Wszystkie testy bakteryjne składają się z dwóch elementów: docelowej komórki bakteryjnej oraz układu metabolizującego. Układ metabolizujący (frakcja S9) składa się z enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z wątroby szczura zaindukowanego mieszaniną węglowodorów aromatycznych. Frakcja S9 używana jest w celu stworzenia warunków zbliżonych do tych, jakie istnieją w komórkach ssaków. Testowany związek chemiczny po inkubacji z komórkami bakteryjnymi w obecności lub nie enzymów frakcji S9 daje odpowiedź w postaci: pojawienia się bakteryjnych mutantów, ekspresji określonych genów indukowanych przez czynniki genotoksyczne, zwiększonej śmiertelności komórek pozbawionych określonych systemów reparacji DNA itd.

Do badań stosuje się szczepy bakteryjne mające zwiększoną wrażliwość na badane związki chemiczne. Otrzymano je dzięki odpowiednim manipulacjom genetycznym, polegającym m.in. na wprowadzeniu DNA plazmidu zawierającego nowe geny. Skonstruowano w ten sposób wiele nowych szczepów bakteryjnych o zwiększonej przepuszczalności błon komórkowych dla cząsteczek związków o dużej masie cząsteczkowej, czy też obniżonej zdolności naprawy uszkodzonego DNA.

#### Test *Amesa*

Test *Amesa* jest najczęściej stosowanym krótkoterminowym testem bakteryjnym, który określa poziom mutacji powrotnych z histydynowej auktrofii do protrofii w wielu specjalnie skonstruowanych mutantach szczepów *Salmonella typhimurium* LT2 [2, 40, 41]. Do badań stosuje się szczepy *S. typhimurium*: TA97, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535 i TA1538. Wszystkie są mutantami pokarmowymi wymagającymi do wzrostu obecności histydyny i biotyny. Szczepy te pozwalają dokładnie określić zmiany indukowane w DNA w wyniku działania badanego związku chemicznego [2, 43]. Trzy pierwsze szczepy posiadają mutację w genie kodującym jeden z enzymów systemu naprawczego przez wycinanie (*uvrB*). Pozwalają więc na stwierdzenie indukcji uszkodzeń usuwanych przez system naprawy przez wycinanie. Szczepy TA97 i TA98 są wrażliwe na działanie mutagenów wywołujących mutacje typu zmiany ramki odczytu, zaś szczep TA100 pozwala wykryć mutageny wywołujące mutacje typu zmiany zasady lub par zasad G-C lub A-T. W dwóch pozostałych szczepach: TA102 i TA104 w miejscu rewersji znajduje się mutacja *ochre* (kodon stop) [38]. Szczepy te, w porównaniu do innych szczepów testowych *Amesa*, są bardziej wrażliwe na działanie związków utleniających (aldehydy, ketony). Szczep TA102 pozwala dodatkowo wykryć związki chemiczne wprowadzające wiązania krzyżowe w DNA [38]. Przez porównanie odpowiedzi w testowych szczepach *Amesa* można stwierdzić jakie uszkodzenie DNA i w jakim natężeniu indukuje badany związek chemiczny.

Charakter mutacji pierwotnych oraz drogi, które prowadzą do ich powstania, zostały szeroko opisane w piśmiennictwie polskim przez *Jenka* [27] i *Koziorowską* [33].

Obecnie wprowadzono do badań nowe szczepy YG1012, YG1021, YG1024 *S. typhimurium* oraz NM2009 *S. typhimurium* o podwyższonej aktywności O-acetylotransferazy. Są one czulsze na działanie heterocyklicznych amin aromatycznych oraz ich pochodnych w porównaniu do innych szczepów *S. typhimurium*. Drugą grupą nowych szczepów są szczepy TA98NR, TA98/1-DNP6 o podwyższonej aktywności nitroreduktazy. Pozwalają wykazać aktywność mutageną nitrowych i amino-pochodnych węglowodorów aromatycznych [50, 63].

### Testy na badanie właściwości mutagennych związków chemicznych z użyciem szczepów *Escherichia coli*

Stosując tryptofano-zależne szczepy *E. coli* (WP2; WP2*uvrA*; WP2 (pKM101); WP2 *uvrA* (pKM101) i technikę testu *Amesa* można określić aktywność mutagenną związków chemicznych indukujących mutacje typu zmiany zasady oraz charakter tych zmian. Obecność w szczepach *E. coli* mutacji *uvrA* zmniejsza zdolność bezbłędnej naprawy uszkodzeń DNA. Mutacja *rfa* zwiększa przepuszczalność ściany komórkowej dla substancji chemicznych, zaś obecność w komórkach plazmidu pKM101 nasila procesy bezbłędnej reparaacji DNA, co prowadzi do zwiększenia częstości występujących mutacji [6, 62].

Szczepy *E. coli* CC101-CC111 – pochodne szczepu *E. coli* P90C {(*ara(lacproB)*) *F'lacI Z proB*, posiadają określone mutacje w kodonie Glu461 genu *lacZ* operonu laktozowego. Pozwala to dokładnie określić typ indukowanej mutacji. Szczepy te pozwalają określić czy związek chemiczny wywołuje mutacje typu zmiany zasady (AT→CG; GC→AT; GC→CG; GC→TA; AT→TA; AT→GC), czy też typu zmiany ramki odczytu, polegające na dodaniu lub wypadnięciu jednego lub dwóch nukleotydów [8, 9].

Z kolei szczepy *E. coli* B (SC30-RP2[*Ion11 sulA1 trpE6 uvrA155 rfa*+pKM101]; IC2468 [*Ion11sulA1 trpE65 uvrA155 rfa* PKM101] pozwalają określić aktywność mutagenną związków chemicznych o dużej masie cząsteczkowej [24]. Ma to szczególnie znaczenie przy badaniu genotoksyczności wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.

### Testy reparaacji DNA w komórkach bakteryjnych

Testy reparaacji DNA służą do wykrywania uszkodzeń zaburzających drugorzędową strukturę cząsteczki DNA, a rozpoznawanych przez endonukleazy, np. korrendonukleazę II. Oparte są na odmiennej wrażliwości komórek bakteryjnych *S. typhimurium* (*uvrB*+/*uvr*-), *E. coli* (*polA*+/*polA*-) czy *B. subtilis* (*recA*+/*recA*-) na zdolność naprawy uszkodzeń DNA. Stosuje się parę szczepów bakteryjnych, z których jeden ma sprawny system naprawy przez wycinanie (szczep dziki), drugi zaś go nie posiada (mutant). Mutanty są bardziej wrażliwe na działanie związków chemicznych w porównaniu do szczepu dzikiego [36].

### SOS-Chromatest

Technika SOS-Chromotestu [53, 54] opiera się na istniejącej w komórce *E. coli* odpowiedzi SOS. Uruchomienie tego systemu naprawy DNA wskazuje na uszkodzenie DNA. W systemie naprawy SOS kluczową rolę odgrywają dwa geny: *lexA* kodujący represor dla wszystkich genów tego systemu (ponad 15 znanych) i *recA* kodujący białko zdolne do przecięcia represora *lexA*. Następuje to w momencie pojawienia się sygnału indukującego odpowiedź SOS, tzn. gdy określony rodzaj uszkodzenia w DNA utrudnia lub zatrzymuje replikację. Tym samym związki, które indukują zmiany w DNA nie uszkadzające procesu replikacji, nie będą indukować odpowiedzi SOS. Równocześnie mogą wykazywać właściwości mutagenne, wykazywane np. w teście *Amesa*.

Zasada SOS-Chromotestu polega na pomiarze ekspresji genów wchodzących w skład systemu SOS indukowanych przez czynniki genotoksyczne. Miarą tej indukcji jest aktywność β-galaktozydazy, której gen strukturalny połączony jest z genem *sfiA* (*sfiA*; *lacZ*). Aktywność β-galaktozydazy jest ściśle zależna od ekspresji genu *sfiA*.

Dodatkowo szczep służący do badań (PQ37) pozbawiony jest systemu naprawy uszkodzeń przez wycinanie (*uvrA*) oraz posiada mutację *rfa*. Konstitutywna synteza fosfatazy alkalicznej (enzymu niezależnego od kontroli SOS), pozwala na ocenę toksyczności związku.

Ponieważ częstość mutacji jest zależna od indukcji systemu SOS, a w szczególności od genu *umuDC*, odpowiedzialnego za mutagenezę SOS, każdy związek chemiczny zdolny do indukowania odpowiedzi SOS może mieć aktywność mutagenną. Zdolność hamowania syntezy SOS jest rozpatrywana jako czynnik indukujący system naprawy SOS. Odpowiedź SOS będzie indukowana również przez związki chemiczne hamujące syntezę DNA poprzez działanie na enzymy biorące udział w syntezie DNA.

SOS-Chromotest jest metodą prostą, szybką i nie wymagającą specjalnych nakładów finansowych. Dodatkowo, jego znaczącą rangę pośród innych testów podnosi fakt wysokiej korelacji istniejącej pomiędzy jego wynikami, a wynikami otrzymanymi w teście *Amesa*.

#### Test indukcji profaga

Test indukcji profaga jest testem wskazującym na indukcję odpowiedzi SOS. Konsekwencją działania związku chemicznego w komórce *E. coli* jest zniszczenie represora profaga i w konsekwencji jego namnażanie, co prowadzi do powstania lysinek na murawie Nielizogennego szczepu wskaźnikowego. Miarą stopnia indukcji profaga  $\lambda$  jest aktywność  $\beta$ -galaktozydazy [48].

#### Test umu

Testem opartym na indukcji systemu naprawy SOS jest rzadziej stosowany **test umu (umu-test)** [49].

W ostatnich latach szczególnym zainteresowaniem cieszą się szczepy *E. coli* PQ300 i OG100 posiadające delecję genu regulatorowego regulonu *OxyR* odpowiedzialnego za syntezę takich enzymów jak: katalaza, reduktaza glutationowa czy reduktaza nadtlenków alkilowych. Enzymy te obniżają ilość reaktywnych form tlenu, co zapobiega oksydacyjnym uszkodzeniom DNA. Indukcja systemu SOS (technika SOS-Chromotestu) jest wskaźnikiem genotoksyczności badanego związku chemicznego w ww. szczepach [12, 16, 31].

Testy pozwalające stwierdzić alkilację DNA bakteryjnego w pozycji N-3 adeniny oraz O-6 guaniny

Wśród wielu uszkodzeń DNA, alkilowana N-3 adenina i O-6 guanina proponowane są jako te uszkodzenia, które indukują odpowiedź SOS. Test oparty jest na metodzie SOS-Chromotest (patrz wyżej) i polega na porównaniu indukcji genu *lacZ* połączonego z genem *sfIA* w szczepach *E. coli*. Szczepy PQ37 i PQ243 mają uszkodzone i nieuszkodzone geny: *tagA* i *alkA* kodujące odpowiednio 3-metyloadenina-DNA glikozylazę I (Tag I) i 3- metyloadenina-DNA-glikozylazę II (Tag II) [7].

Z kolei test na wykrywanie alkilacji DNA w pozycji O-6 guaniny oparty jest na porównaniu aktywności mutagennej badanego związku chemicznego w szczepie AB1157 i AB1157*ada3*. Mutacja w genie *ada3* uniemożliwia syntezę O-6-alkiloguaniny-DNA-alkilotransferazy, co powoduje, że nie są usuwane grupy alkilowe z guaniny, a to w konsekwencji prowadzi do nieprawidłowego parowania zasad w czasie replikacji i powstania mutacji [26].



### Test na wykrywanie pęknięć nici DNA

Pęknięcia nici DNA mogą powstać w wyniku działania np. wolnych rodników. Szczep *E. coli* MD332 posiada dwa rodzaje mutacji, jedną w genie *dnaC*, która zatrzymuje replikację DNA oraz drugą w genie *uvrB*, która wpływa na system naprawy przez wycinanie. W szczepie tym odpowiedź SOS jest indukowana w temperaturze permissyjnej (30°C) przez różnego typu uszkodzenia DNA, podczas gdy w temperaturze niepermissyjnej (42°C) odpowiedź wywołwana jest jedynie przez pęknięcia nici, powstałe w wyniku działania wolnych rodników. W szczepie *E. coli* MD332 dzięki fuzji genów *sfiA* i *lacZ* można łatwo mierzyć odpowiedź SOS przez prosty pomiar aktywności  $\beta$ -galaktozydazy [55].

### Test na wykrywanie uszkodzeń prowadzących do otwarcia pierścienia imidazolowego puryn

Test ten pozwala określić, czy badany związek chemiczny może modyfikować puryny w DNA poprzez otwarcie pierścieni imidazolowych w pozycji C8 i N9. Powstają wówczas 4,6-diamino-5-formamidopirymidyny (Fapy-adenina), 2,6-diamino-hydroksy-5-formamidopirymidyny (Fapy-guanina) oraz 2,6-diamino-4-hydroksy-5N-metyl-formamidopirymidyny (Fapy-7-metyloguanina). Wszystkie te pochodne mogą powstawać *in vitro* i *in vivo* pod wpływem promieniowania jonizującego, związków alkilujących, utleniających np. mutagenów środowiskowych, leków przeciwnowotworowych. Pojawienie się w DNA Fapy-7-metyloguaniny powoduje zahamowanie replikacji i w rezultacie efekt letalny.

Wykrywanie czynników (fizycznych i chemicznych) uszkadzających bakteryjny DNA polega na ocenie stopnia hamowania wzrostu szczepu *E. coli* z prawidłowym i uszkodzonym systemem naprawy przez wycinanie. Wykorzystuje się parę szczepów izogenicznych – jeden z prawidłową naprawą uszkodzeń (AB1157), a drugi z uszkodzoną jedną lub kilkoma drogami naprawy np. BH20 lub BH190 [5].

### Test z zastosowaniem pośredniego gospodarza (Host-mediated assay)

Procedura łączy technikę testu bakteryjnego z aktywacją metaboliczną w ustroju (*in vivo*) [13]. Wprowadzane do organizmu zwierząt laboratoryjnych (myszy, szczury) bakterie *S. typhimurium* czy *E. coli* w iniekcji dootrzewnowej narażone są na działanie związku chemicznego podawanego zwierzętom podskórnie, domięśniowo lub dożołądkowo. Następnie bakterie (z ewentualnie powstałymi *in vivo* metabolitami) są pobierane z płynem otrzewnowym i badane pod kątem określonych efektów genetycznych – np. w teście *Ames* lub w hodowlach komórkowych. Dużą zaletą tej metody jest możliwość określenia zdolności aktywacji metabolicznej (biotransformacji) związku chemicznego w organizmie ssaków.

### Test CYPIA – Cytochrome P-450 Induction Assay

W procesach metabolicznej aktywacji związków chemicznych uczestniczy szereg enzymów, m.in. monooksygenazy zależne od cytochromu P-450, które łatwo reagują zmianą aktywności w odpowiedzi na pojawienie się odpowiedniego substratu. Szczegółne znaczenie w procesie biotransformacji mają ksenobiotyki indukujące syntezę różnych form molekularnych cytochromu P-450.

Ze względu na rodzaj indukowanej formy cytochromu P-450 substancje egzogenne zostały podzielone na induktory typu fenobarbitalu (Pb) (indukcja cytochromu P-4502B, wzrost procesów demetylacji), typu 3-metylocholanotrenu (3-MC) (indukcja cytochromu P-4502A (448), (wzrost szybkości procesów hydroksylacji) oraz typu 16 $\alpha$ -karbonitrylu (indukcja innych form cytochromu niż P-450). Określenie zdolności danego związku chemicznego do indukcji odpowiednich form molekularnych cytochromu P-450 ma duże znaczenie dla oceny jego genotoksyczności oraz jego szeroko pojmowanej toksyczności.

Wysocze specyficzny podwójny test CYPIA pozwala na określenie przynależności badanego związku do jednego z dwóch głównych typów induktorów systemu monooksygenaz zależnych od cytochromu P-450 (typu Pb lub typu 3-MC). Zasada testu CYPIA oparta jest na szeroko rozpowszechnionej technice *Amesa* [37]. Po kilku dniach od podania szczurom badanego związku chemicznego izoluje się jego wątrobę, która służyć będzie jako źródło enzymów mikrosomalnych (frakcja S9). Stosuje się ją w teście *Amesa* w celu metabolicznej aktywacji bromku etyldyny lub cyklofosfamidu (oba związki są promutagenami, tzn. wymagają do aktywacji obecności enzymów frakcji mikrosomalnej). Mutagenne metabolity obu promutagenów, powstające w wyniku działania monooksygenaz zależnych od cytochromu P-450 zaindukowanych wg typu Pb lub 3-MC wywołują rewersje *his* w badanych szczepach bakteryjnych.

Testy bakteryjne, często określane jako testy krótkoterminowe, służą jedynie do wstępnej selekcji związków chemicznych przed dalszymi badaniami w długookresowych badaniach na komórkach i zwierzętach.

Pozwalają oceniać efekty działania związków chemicznych na poziomie DNA. Zaletą tych testów jest to, że są tanie i łatwe w wykonaniu, a indukowane zmiany genetyczne można zaobserwować w ciągu kilku dni. Ujemną stroną jest brak w komórkach bakteryjnych enzymów biorących udział w metabolizmie ksenobiotyków, dlatego też w testach bakteryjnych konieczne jest stosowanie frakcji wątrobowych enzymów mikrosomalnych (frakcja S9).

## TESTY NA ORGANIZMACH EUKARIOTYCZNYCH

### Testy na grzybach

Szerokie zastosowanie w badaniach właściwości genotoksycznych związków chemicznych znajdują szczepy drożdży *Saccharomyces* oraz pleśni *Neurospora crassa* czy *Aspergillus nidulans*. Pozwalają określić, czy dany związek indukuje mutacje punktowe w DNA jądrowym i mitochondrialnym, czy też powoduje powstawanie aneuploidii chromosomowych, bądź rekombinacji w obrębie genów i pomiędzy genami w wyniku nieprawidłowej mitozy i mejozy.

W przypadku mutacji punktowych wykorzystuje się różne systemy indukcji w komórkach drożdży. Najczęściej używany jest system oparty na indukcji alleli genów regulujących syntezę adeniny. W systemach tych używane są szczepy *S. cerevisiae* posiadające mutację adenina-1 i adenina-2 lub szczepy *S. pombe* z mutacją adenina-6 i adenina-7. Obecność tych mutacji wyraża się wytworzeniem czerwonych kolonii *S. cerevisiae* i czerwonopurpurowych kolonii *Schizosaccharomyces pombe*, które mają zdolność ujawniania wewnątrzkomórkowego pigmentu w przypadku mutacji adenina-2 [70].

Proces rekombinacji w komórkach drożdży związany jest z podziałem mitotycznym i mejotycznym. Drożdże mogą być z dużym powodzeniem wykorzystane do badania zarówno spontanicznych, jak i indukowanych rekombinacji mitotycznych i mejotycznych. Zdecydowanie większe znaczenie w ocenie aktywności mutagennej związków chemicznych mają uszkodzenia mitotyczne. Mogą być wykrywane zarówno rekombinacje pomiędzy genami (mitotyczny crossing-over) jak i w obrębie genu (konwersja genu).

Testy z zastosowaniem muszki owocowej *Drosophila melanogaster*

Komórki somatyczne i płciowe muszki owocowej znalazły zastosowanie w testach wykrywających szeroki zakres mutacji: mutacje genowe (delecje), aberracje chromosomowe i rekombinacje w tej samej populacji komórek (somatycznych i płciowych) poddanych działaniu związku chemicznego w warunkach *in vivo*. Obecnie stanowią one testy uzupełniające testy bakteryjne. Należy podkreślić, że dużą ich zaletą jest fakt, iż mogą przyczynić się do istotnego ograniczenia stosowania ssaków do badań genotoksyczności. Zdolność metabolizowania ksenobiotyków przez organizm muszki owocowej (obecność oksygenazy zależnej od cytochromu P-450, hydroksylazy aryłowęgłowodorowej i innych) stwarza potencjalne możliwości ekstrapolacji uzyskanych danych doświadczalnych bezpośrednio na ludzi [46].

Badanie recesywnych mutacji letalnych związanych z płcią u *Drosophila melanogaster* – SLRL (sex-linked recessive lethals)

Test na obecność recesywnych mutacji letalnych służy do wykrywania indukcji zmian w dużej części genomu. Jest to jedna z czulszych metod wykrywających recesywne mutacje związane z chromosomem X u *Drosophila melanogaster*. Do stwierdzenia tego faktu wymagane są dwa pokolenia, które mają mutację w około 20% wyjściowego genomu. Badany związek chemiczny może być podawany drogą pokarmową lub drogą inhalacyjną (zastosowanie aerozoli). Do doświadczeń używa się dorosłych samców, ponieważ samice częściej ulegają sterylizacji pod wpływem działania badanych związków chemicznych, a ponadto są bardziej odporne na indukcję zmian genetycznych [67].

Test SMART (Somatic Mutation And Recombination Test)

Testy wykorzystujące komórki somatyczne (SMART) pozwalają stwierdzić mitotyczną rekombinację, jak również konwersję genów [61, 93]. Tym samym uzupełniają wyniki testu SLRL, gdzie stwierdza się mutacje genowe, delecje i pewne rodzaje aberracji chromosomowych. W badaniach wykorzystuje się komórki imaginalnych dysków oczu lub skrzydeł. W tym ostatnim teście stosowany szczep *D. melanogaster* jest transheterozygotyczny dla mutacji wielokrotnionych włosków na skrzydłach (*mwh*) i włosków o kształcie pęcherzykowym (*flr*). Efekty rekombinacji somatycznych, zachodzących podczas przekształcania się larw w muszki, obserwuje się na skrzydłach muszki jako „plamki” o podwójnym fenotypie *mwh* i *flr* lub pojedynczym *mwh*, w zależności od miejsca, w którym miała miejsce rekombinacja [66].

#### BADANIA CYTOGENETYCZNE

Wśród szeregu metod służących do identyfikacji substancji mutagennych/kancerogennych ważną rolę odgrywają testy cytogenetyczne [52]. Wynikiem działania więk-



szości mutagenów/kancerogenów chemicznych są uszkodzenia DNA prowadzące do różnego rodzaju anomalii chromosomowych wykrywanych metodami cytogenetycznymi. Czułym wskaźnikiem uszkodzeń chromosomów jest wymiana chromatyd siostrzanych (SCE), test na wykrywanie aberracji strukturalnych chromosomów (CA) oraz test mikrojądrowy. Testy te są wykonywane na różnych rodzajach komórek izolowanych z organizmów (układy doświadczalne *in vitro*) lub bezpośrednio na ssakach (układ doświadczalny *in vivo*). Wykorzystuje się najczęściej komórki posiadające zdolność do proliferacji *in vivo* (np. szpik kostny, komórki nabłonkowe, komórki płciowe) lub komórki, które poza organizmem mogą się dzielić i namnażać (limfocyty krwi obwodowej, fibroblasty, komórki nabłonkowe zarodków chomika chińskiego – CHO, komórki nabłonkowe płuc chomika chińskiego – V79, komórki nowotworów mysich – L5178Y i inne).

W rutynowych badaniach osób narażonych zawodowo na działanie czynników genotoksycznych wykorzystuje się limfocyty krwi obwodowej. Są to komórki łatwe do pobrania i hodowli w warunkach *in vitro*.

#### Test aberracji chromosomowych (Chromosome Aberrations – CA)

Test aberracji chromosomowych jest testem cytogenetycznym *in vitro*, przeznaczonym do wykrywania aberracji chromosomowych (złamania, translokacje, delecje, powstanie fragmentów acentrycznych, chromosomów policentrycznych) i badania mechanizmów ich powstawania [52, 56]. Związki indukujące te zmiany nazywane są klastogenami. Procedura testu obejmuje zazwyczaj ocenę komórek w stadium metafazy, DNA występuje w postaci skondensowanej z wyraźnie widocznymi w mikroskopie świetlnym chromosomami ułożonymi w płaszczyźnie równikowej wrzeciona podziałowego. Wzrost liczby uszkodzeń w chromosomach świadczy o aktywności genotoksycznej związku chemicznego. Do najbardziej charakterystycznych aberracji zaliczane są złamania chromatydowe, przerwy oraz fragmenty acentryczne [52, 56].

Istnieje wiele technik wybarwiania chromosomów w badanych komórkach, np. technika wybiórczego barwienia chromosomów czy technika hybrydyzacji (fluorescence *in situ* hybridization) *in situ*, w których uzyskuje się wybarwienia całych chromosomów. Wybarwione chromosomy pozwalają na ocenę ilościową występowania aberracji. Dokładniejszą analizę aberracji chromosomów można uzyskać stosując techniki prążkowego barwienia chromosomów (technika prążków G). Tego typu barwienie daje charakterystyczny dla każdej pary chromosomów wzór naprzemiennie ułożonych prążków jasnych i ciemnych, co pozwala na bardzo dokładne określenie lokalizacji aberracji. Należy jednak podkreślić, że jest to technika, która wymaga dużego nakładu pracy i obecnie jest zastępowana metodą hybrydyzacji *in situ*. Ta ostatnia jest bowiem szybka i dokładniej ocenia wybrane do analizy chromosomy.

#### Wymiana siostrzanych chromatyd (Sister Chromatid Exchange – SCE)

Test wymiany siostrzanych chromatyd (SCE) pozwala określić czy badany związek chemiczny powoduje zmiany w strukturze chromosomów, polegające na wzajemnym przemieszczaniu homologicznych odcinków DNA pomiędzy siostrzanymi chromatydami. Wymiany chromatyd siostrzanych zachodzą w miejscach rozpoczęcia replikacji DNA lub w ich pobliżu. Mogą być zatem indukowane przez związki mutagenne, wiążące się kowalencyjnie z DNA i zaburzające proces replikacji [35].

Test SCE w rutynowym monitorowaniu *in vitro* wykonywany jest najczęściej na limfocytach krwi żyłnej człowieka lub komórkach jajnika chomika chińskiego (linia CHO). Obok innych wymienionych wcześniej komórek stosuje się również komórki niższych organizmów eukariotycznych np. robaków morskich *Platynereis dumerilii* [28].

W teście SCE wykorzystuje się zdolność wbudowywania do nici DNA w procesie replikacji analogu tymidyny – 5-bromodezoksyurydyny (BrdU). Inkorporacja BrdU prowadzi do powstania (po dwóch rundach replikacyjnych) chromosomów posiadających różniące się między sobą chromatydy siostrzane. Zastosowanie odpowiednich technik różnicowego wybarwienia umożliwia obserwację wymiany chromatyd siostrzanych (jasne i ciemne fragmenty) indukowanych przez badany związek. Całkowicie podstawione chromatydy barwią się Giemśa słabiej niż niekompletnie podstawione. W przypadku, gdy ma miejsce wymiana chromatyd siostrzanych, widoczna jest różnica w natężeniu zabarwienia obu chromatyd [51].

Schemat postępowania przy metodzie SCE *in vitro* z użyciem limfocytów krwi obwodowej obejmuje: etap namnażania komórek w odpowiednim podłożu w obecności BrdU, inkubację z badanym związkiem (z dodatkiem i bez enzymów mikrosomalnych frakcji S9), uzyskanie komórek w stadium metafazy (po zastosowaniu inhibitora wrzeciona podziałowego – kolchicyny lub kolcemidu). Po utrwaleniu komórek wykonuje się preparaty mikroskopowe, odpowiednio barwione [69].

W porównaniu z metodą określenia aberracji chromosomowych metoda SCE jest stosunkowo łatwa, szybka i czuła. Koszt wykonania badań jest umiarkowany. Warunkiem poprawnie przeprowadzonego testu SCE jest dobrze prowadzona hodowla i obróbka cytologiczna limfocytów, komórek szpiku kostnego, dokładne barwienie chromatyd siostrzanych i prawidłowa analiza mikroskopowa SCE.

#### Test mikrojądrowy (Micronucleus Test)

Test mikrojądrowy jest metodą cytogenetyczną stosowaną w warunkach *in vitro* i *in vivo* do wykrywania pęknięć chromosomów i uszkodzeń wrzeciona podziałowego. W tym celu może być wykorzystana każda populacja dzielących się komórek (np. erythrocyty szpiku kostnego lub śledziony, erythrocyty krwi obwodowej larw *Pleurodeles waltii*, *Xenopus levis* [21, 22, 25, 58]. Mikrojądra tworzą się z acentrycznych chromatyd lub fragmentów chromosomów, albo też z całych chromosomów, które w czasie anafazy pozostają w tyle i po zakończeniu telofazy nie są włączane do jąder potomnych. Zmiany te powstają pod wpływem działania różnych związków chemicznych i czynników fizycznych.

Najczęściej test mikrojądrowy przeprowadzany był na erythrocytach polichromatycznych szpiku kostnego. Badany związek chemiczny rozpuszczony w odpowiednim dla niego nośniku podaje się zwierzętom (dojrzałym płciowo samcom, rzadziej samicom) drogą doustną, dootrzewną lub inhalacyjną. Procedura testu mikrojądrowego obejmuje: podanie zwierzętom badanego związku, pobranie komórek szpiku po 24, 48 i 72 godzinach od momentu podania związku; wykonanie rozmazów komórkowych i ich barwienie Giemśa; analizę mikroskopową erythrocytów polichromatycznych pod względem obecności mikrojąder (500–1000 erythrocytów/zwierzę).

Mimo, że testy cytogenetyczne *in vivo* nie są tak czułe jak testy *in vitro*, to bardziej przybliżają nas do procesów mających miejsce w organizmie człowieka. Występująca w warunkach *in vivo* aktywacja metaboliczna i detoksykacja związków chemicznych

muszą być w warunkach *in vitro* stymulowane przez dodanie enzymów mikrosomalnych (frakcja S9). Dlatego też negatywne wyniki uzyskiwane w warunkach *in vivo* są pewniejsze od wyników pozytywnych w warunkach *in vitro*.

Test mikrojądrowy jest ciągle modyfikowany, dotyczy to najczęściej już samych technik barwienia powstałych mikrojąder. I tak barwienie kinetochorów czy centromerów techniką np. hybrydyzacji *in situ* pozwala określić, czy mikrojądro powstało z acentrycznego fragmentu, czy z całego chromosomu oraz który z chromosomów utworzył mikrojądro.

Test mikrojądrowy *in vivo* w szpiku myszy, obok testu *Amesa*, jest wymagany w Polsce do oceny potencjalnych właściwości genotoksycznych wszystkich nowo wprowadzanych do środowiska związków chemicznych. Wymóg ten do dnia dzisiejszego nie ma jednak regulacji prawnej. Do tej pory, dużym nakładem pracy Zakładu Kancerogenezy Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi i innych ośrodków naukowych, w tym Zakładu Toksykologii Środowiskowej Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie, ujednolicono metodyki: testu *Amesa*, testu mikrojądrowego *in vivo* i testu wymiany chromatyd siostrzanych *in vitro* i *in vivo*.

Testy na badanie częstości mutacji w hodowlach komórek *in vitro*

Testy te pozwalają na określenie częstości występowania mutacji punktowych w określonych genach w różnych komórkach ssaków. Powszechnie stosowane są linie komórek V79 i CHO pochodzące z chomika chińskiego lub L5178 chłoniaka myszy. Najczęściej w tych komórkach bada się częstość mutacji w loci kinazy tymidynowej (TK), transferazy hipoksantyno-guanino-fosforybozylowej (HPRT) i ATP-azy Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> [10, 29]. Systemy identyfikujące mutacje TK i HPRT pozwalają wykrywać mutacje typu zmiany zasady, zmiany ramki odczytu oraz małe delecje. Natomiast system ATP-azy Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pozwala identyfikować tylko mutacje typu zmiany zasady. W testach tych wykorzystuje się hodowle komórek rosnących na podłożach selekcyjnych mutanty. Podłoża te zawierają związek toksyczny lub antymetabolit (nazywany czynnikiem selekcyjnym), działający toksycznie na wszystkie komórki, poza mutantami. W końcowym efekcie nieliczne zmutowane komórki mogą kontynuować wzrost i tworzyć kolonie. Komórki z niedoborem HPRT selekcyjnie się dzięki oporności na 6-tioguaninę (TG), a komórki ze zmienioną ATP-azą Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> dzięki oporności na oubainę.

W testach tych istotną rolę odgrywają enzymy mikrosomalne, które mogą być dostarczone przez:

- a) zastosowanie preparatów z wątroby szczura – frakcji S9.
- b) wykorzystanie metabolizmu wewnątrzkomórkowego. W tym wypadku komórki wskaźnikowe np. L5178 czy V79 są hodowane z komórkami posiadającymi zdolność metabolizowania np. świeżo wyizolowanymi hepatocytami szczura lub komórkami chomika. Promutageny lub prokancerogeny ulegają przekształceniu w aktywne związki przy udziale enzymów mikrosomalnych, których źródłem są dodane komórki. Powstałe reaktywne metabolity wnikają do komórek wskaźnikowych, gdzie reagują z DNA.
- c) zastosowanie metody pośredniego gospodarza (Hosted-Mediated Assay).

### Testy na wykrywanie dominujących mutacji letalnych (Dominant Lethal Assay)

Dominujące mutacje letalne obejmują wszystkie zmiany genetyczne w gametach (jaju lub plemniku), jakie wpływają na ich żywotność i powodują, że stają się one niezdolne do zapłodnienia. Mechanizm powstawania tych mutacji związany jest z pękaniem chromosomów w czasie podziału mejyotycznego komórki, w wyniku czego następuje częściowa lub całkowita utrata chromosomów. Często zdarza się, że zapłodnione jajo ginie przed implantacją. Ostatecznie zmiany te prowadzą do śmierci embrionu lub płodu na różnych etapach ich rozwoju (wczesna lub późna śmierć płodu) [20].

Metoda polega na kolejnym kojarzeniu samców myszy, poddanych i nie poddanych działaniu związku chemicznego, z samicami nie narażonymi na działanie związku. Po 17 dniach od momentu połączenia z samcami, samice są zabijane i analizowana jest zawartość macic. Analiza dotyczy całkowitej liczby implantacji oraz liczby żywych i martwych płodów.

Indukcję dominujących mutacji letalnych określa się przez oznaczenia liczby (%) strat zygot przed- i poimplantacyjnych w grupie badanych zwierząt, w porównaniu z kontrolą (grupa zwierząt nie poddawanych działaniu tego związku).

### Test nieplanowanej syntezy DNA (Unscheduled DNA Synthesis - UDS)

Test nieplanowanej syntezy DNA pozwala wykazać, czy komórki ssaków są zdolne do usuwania uszkodzeń indukowanych w DNA. W teście UDS używane są najczęściej fibroblasty ludzkie, komórki CHO lub linie transformowanych komórek ludzkich (HeLa). Stosowane są również hodowle komórek śledziony, trzustki szczura, limfocytów szczurzych i ludzkich, nabłonka tchawicy czy jelita grubego. Wadą tej metody jest brak enzymów metabolizujących związku w warunkach *in vitro*, stąd niezbędne jest stosowanie enzymów mikrosomalnych (frakcja S9). Zdecydowanie najlepsze wyniki są uzyskiwane przy stosowaniu hodowli hepatocytów szczura [65].

Mechanizm usuwania uszkodzeń w UDS polega na tym, że w komórkach może być wycięty fragment DNA z jednej nici podwójnej helisy, a następnie zastąpiony nukleotydami nie uszkodzonego DNA, dzięki możliwości użycia przeciwległych nici jako matrycy i włączenia nowo utworzonego fragmentu do poprzednio istniejącej nici. Proces ten nazwano reperacją wyciętego miejsca i odbudową oryginalnych całych cząsteczek DNA. Nieplanowana synteza DNA różni się od semikonserwatywnej replikacji DNA w fazie S cyklu komórkowego *Eucaryota*. Jest to bowiem synteza DNA mająca miejsce jedynie podczas reperacji uszkodzonego odcinka i zachodzi w całym genomie niezależnie od syntezy DNA przed podziałem komórkowym. W procesie tym dochodzi do tworzenia adduktów DNA – badany związek lub ewentualny metabolit. Endonukleaza wycina uszkodzone fragmenty DNA, a polimerazy uzupełniają wycięte fragmenty. Poziom syntezy reperacyjnej jest różny dla różnych związków. Zależy od typu wprowadzonego uszkodzenia, czy też wielkości reperowanego odcinka.

UDS w wybranych komórkach ssaków można oznaczać metodą autoradiografii lub scyntylacyjną. Dokładnie znana i opisana jest naprawcza synteza DNA w hepatocytach szczura *in vitro* [57]. Metodyka testu UDS jest skomplikowana i dokładnie opisana w wielu pracach [47, 65].

### Test alkalicznej elucji DNA (Alkaline Elution Assay)

Test alkalicznej elucji służy do wykrywania pojedynczych pęknięć w nici DNA. Może być wykorzystany w badaniach *in vitro* (hodowle komórkowe) i *in vivo* (komórki pobrane z narządów zwierząt). Dobrym materiałem są hepatocyty, w których zachodzi aktywacja metaboliczna badanego związku chemicznego i jego ewentualne oddziaływanie z DNA. Test opiera się na obserwacji szybkości elucji pojedynczych łańcuchów DNA w odpowiednim środowisku. Szybkość, z jaką pojedyncze łańcuchy DNA przechodzą przez membranę filtru podczas alkalicznej elucji zależy od ich długości. Im bardziej uszkodzone jest DNA w komórkach przez badany związek, tym szybsze jest tempo elucji.

Procedura testu obejmuje lizę komórek w silnie alkalicznym roztworze i proces elucji. Stężenie DNA w wyluowanych frakcjach mierzone jest metodą fluorymetryczną lub scyntylicyjną. Uzyskane wyniki porównuje się z wynikami kontroli (komórki nie poddawane działaniu badanego związku chemicznego) [60].

### Test na wykrywanie adduktów w DNA

Test ten pozwala wykryć i ilościowo oznaczyć addukty powstające w szeregu związków chemicznych z DNA lub białkami (*in vitro* i *in vivo*) [64].

Oznaczenia powstałych adduktów przeprowadza się zazwyczaj po hydrolizie kwaśnej lub enzymatycznej zmodyfikowanego DNA (lub też kombinacji obu), a następnie rozdziela się powstałe produkty przy pomocy HPLC. Do detekcji wykorzystuje się UV, jak również fluorescencję powstałych adduktów.

Zastosowanie metody znakowania  $^{32}\text{P}$  w pozycji 5',3'-nukleotydów (ang.  $^{32}\text{P}$ - postlabeling) uzyskanych po enzymatycznej hydrolizie badanego DNA w połączeniu z rozdziałem metodą HPLC pozwala na wykrycie pojedynczych adduktów/ $10^7$ - $10^8$  nukleotydów w  $10\mu\text{g}$  próbce DNA.

Znacznym postępowaniem w określaniu i ilościowym oznaczaniu adduktów było zastosowanie przeciwciał monoklonalnych.

Elektrofilowe związki chemiczne wiążą się kowalencyjnie nie tylko z DNA, ale również z białkami. Podstawowym założeniem omawianej metody jest to, że kowalencyjne oddziaływanie związku chemicznego lub jednego z metabolitów z białkiem jest ilościowym odbiciem jego kowalencyjnego oddziaływania z DNA. Równocześnie z analizą adduktów z białkami powinna być wykonywana analiza chromosomów.

Jak dotąd testy te nie są zbyt powszechnie stosowane, dlatego też nie mogą być użyte jako źródło danych ilościowych przy określaniu ryzyka wywoływania nowotworów przez związki chemiczne.

### Elektroforeza pojedynczych komórek (Single Gel Electrophoresis - Comet Assay)

Elektroforeza pojedynczych komórek jest niezwykle czułą i szybką techniką ilościowej analizy uszkodzeń DNA jedno- i dwunici naprawy w komórkach eukariotycznych [11, 42]. Najczęściej do badań wykorzystywane są limfocyty krwi obwodowej.

Procedura testu polega na umieszczeniu badanych komórek w agarozie na szkiełkach mikroskopowych, lizie z użyciem soli sodowej siarczanu dodecyłu (SDS) lub lizie alkalicznej w obecności wysokich stężeń NaCl i Tritonu, elektroforezie i barwieniu żelu (bromek etydyny, oranż akrydyny).

Stopień uszkodzenia DNA, któremu towarzyszy jego fragmentacja, ocenia się w wybarwionych preparatach poprzez analizę obrazów w mikroskopie fluorescencyjnym. Są to charakterystyczne obrazy „komet” z wyodrębnionymi w nich „głowami” i „ogonami”. „Głowy komet” odpowiadają miejscom, w których przed liżą znajdowały się komórki. Komórki z nieuszkodzonym DNA nie mają widocznego po elektroferizie „ogona”. „Ogony” pojawiają się bowiem tylko wtedy, gdy w DNA komórkowym wystąpiły uszkodzenia w postaci pęknięć. Analiza wizualna polega na liczeniu „komet” podzielonych na odpowiednie kategorie. Klasyfikacja dokonywana jest na podstawie morfologii „komet” tj. długości „ogona”, wielkości „głowy”. Szybkość i łatwość wykonania testu, jego czułość i możliwość stosowania dowolnych komórek eukariotycznych oraz nieinwazyjność sprawiają, że może być wykorzystany do wstępnego badania właściwości genotoksycznych czynników fizycznych i chemicznych. Nie jest to jednak szeroko stosowany test, wymaga bowiem opracowania jednolitej procedury stosowanej we wszystkich laboratoriach na całym świecie, co pozwoli na porównywanie wyników według jednakowych parametrów.

Test na wykrywanie krypt aberracyjnych w jelicie grubym szczurów i myszy

Test wykrywający zaberrowane krypty pozwala ocenić zdolność badanego związku chemicznego do wywoływania zmian preneoplastycznych w nabłonku jelita grubego szczurów lub myszy [4]. Błona śluzowa jelita grubego pokryta jest nabłonkiem tworzącym zagłębienia zwane kryptami. Zaberrowane krypty są morfologicznie zmienionymi kryptami w nabłonku jelita grubego zwierząt i ludzi. Pojawiają się jako preneoplastyczne uszkodzenia w jelicie grubym w 2 tygodnie po podaniu zwierzętom (myszom i szczurom) chemicznych kancerogenów, niezależnie od drogi podania. Mogą powstawać jako pojedyncze zmienione (atypowe), nawet dysplastyczne krypty lub dwie, trzy, cztery krypty zebrane w grona. Zaberrowane krypty są indukowane tylko przez związki zaliczane do kancerogenów jelita grubego. Liczba powstających zmienionych krypt w jelicie grubym zależy od dawki podawanego związku i sposobu podania (*per os* lub *per rectum*). Analiza zaberrowanych krypt w jelicie po wybarwieniu błękitem metylenowym dokonywana jest w mikroskopie świetlnym. Istnieje ścisła korelacja pomiędzy właściwościami kancerogennymi związków chemicznych, a ich zdolnością do indukcji zaberrowanych krypt w jelicie grubym [44].

Metoda badania tych krypt, prosta i łatwa w wykonaniu, wydaje się być bardzo dobrym modelem doświadczalnym do badania procesów zachodzących w jelicie grubym pod wpływem wielu związków chemicznych. Może być z powodzeniem wykorzystywana w celach diagnostycznych do badania początkowych zmian nowotworowych w jelicie grubym.

Test plemnikowy

Test plemnikowy pozwala na oszacowanie uszkodzeń plemników w ejakulacie. Anomalie plemnikowe są wskaźnikiem indukcji efektu antyspermatogenicznego. Zdolność związków do uszkodzeń plemników u myszy jest związana z ich zdolnością do indukcji mutacji w komórkach rozrodczych, np. dominujących mutacji letalnych, dziedzicznych translokacji lub mutacji określonych loci [34, 61, 68]. Należy jednak pamiętać, że indukcja anomalii plemnikowych może być wynikiem nie tylko uszkodzeń DNA, ale także czynników epigenetycznych, takich jak zaburzenia hormonalne, dieta i inne.



Test przeprowadza się na samcach myszy, które po narażeniu przez 35 dni na badane związki są zabijane i z ich najądrzy preparuje się plemniki. Po utrwaleniu i wybarwieniu rozmazów przeprowadza się analizę 1000 plemników. Określa się odsetek plemników o zmienionej morfologii, tj. plemniki pozbawione haczyka, z bananokształtną główką, z podwiniętą główką, amorficzne oraz posiadające dwie wici.

Transgeniczne modele zwierzęce dla wykrywania mutacji *in vivo*

Transgeniczne modele wykrywania mutacji wprowadzono po raz pierwszy u myszy, ale mają zastosowanie w każdym gatunku, w którym można uzyskać transgeniczne zwierzęta. Model taki stanowi doskonałe narzędzie pozwalające wykryć mutacje tkanowo-specyficzne powstałe *in vivo* po potraktowaniu zwierzęcia testowanymi związkami chemicznymi [3, 17, 18, 23].

Model transgeniczny oparty jest na wprowadzeniu do genomu gryzonia, najczęściej myszy, genu *lacI* (kodującego represor Lac) – [Big Blue] lub genu *LacZ/GalE* (kodującego białko  $\beta$ -galaktozydazy) – [Muta Mouse] z komórek *Escherichia coli* [18]. Skonstruowano również model pozwalający na badanie mutacji w genie czynnika IX wprowadzonego do komórek płciowych myszy (jak dotychczas tylko w plemnikach). Wprowadzone geny są docelowymi genami, na które oddziałują w warunkach *in vivo* substancje chemiczne. Po wyizolowaniu genomowego DNA z konkretnych tkanek zwierzęcia uzyskuje się z niego gen docelowy. Preparat DNA zawierający dużą liczbę badanego transgeny analizuje się pod kątem liczby zaindukowanych w nim mutacji.

Zwierzęta transgeniczne ułatwiają równoczesne badanie indukcji uszkodzeń DNA oraz ich naprawy, tym samym aktywność mutagenną i działanie kancerogenne w jednym systemie badawczym. Używając transgenicznych myszy [Muta Mouse] można połączyć test mikrojądrowy (leukocyty krwi obwodowej zwierzęcia) z transgenicznym testem, umożliwiającym wykrycie mutacji punktowych i indukcji mikrojąder *in vivo*, równocześnie w tym samym zwierzęciu [17, 45].

Istniejące modele eksperymentalne pozwolą w przyszłości określić podstawowy obraz mutacji spontanicznych dla wielu ludzkich genów, jak również umożliwią poznanie podobieństw i różnic procesów mutacyjnych u ludzi i zwierząt.

Istotną cechą stosowania zwierząt transgenicznych jest ich jakościowa powtarzalność, jak również zdolność do przewidzenia dziedzicznych efektów niewyjaśnionych do chwili obecnej lub kancerogenności badanego związku chemicznego. Problemem w rozpowszechnieniu tej metody są jednak wysokie koszty i duży nakład pracy przy izolowaniu zmutowanych genów.

Zastosowanie roślin wyższych w testowaniu aktywności mutagennej związków chemicznych

Rośliny stanowią doskonały materiał do badania aktywności mutagennej związków. Najczęściej wykorzystuje się do oceny końcowych efektów działania związków chemicznych obecnych w glebie, wodzie i powietrzu atmosferycznym gatunki roślin wyższych. Pozwalają one na obserwację strukturalnych uszkodzeń chromosomów, wymianę siostrzanych chromatyd, oddziaływanie na segregację chromosomów i ogólne funkcje mitotyczne [19].

Testy na roślinach pozwalają ocenić:

- 1) mitotyczne uszkodzenia chromosomów i wymianę siostrzanych chromatyd (wykorzystuje się komórki stożków wzrostu korzeni fasoli, cebuli, trzykrotnie

- i jęczmienia). Powszechnie stosowany jest test cytogenetyczny z *Vicia faba*, *Vicia minor*, *Arabidopsis thaliana*, *Allium cepa*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays* [15, 19, 30].
- 2) aberracje w chromosomach mejotycznych (wykorzystuje się pyłek kwiatowy fasoli, jęczmienia);
  - 3) mutacje genowe w specyficznych lub w wielu specyficznych loci:
    - mutacja w ziarnach pyłku kwiatowego kukurydzy;
    - mutacja objawiająca się brakiem chlorofilu w komórkach jęczmienia;
    - indukcja plamek o kontrastowej barwie na liściach sadzonek soi (mozaicyzm somatyczny i mejotyczny);
    - somatyczne mutacje genowe w *Tradescantia*. Test polega na obserwacji zmiany barwy kwiatków z niebieskiej na różową. Jest szczególnie przydatny do badania substancji mutagennych znajdujących się w powietrzu atmosferycznym [39]. *Tradescantia* może być również używana do badania *in vitro* i *in vivo* indukcji aberracji chromosomowych czy mikrojąder przez zanieczyszczenia chemiczne obecne w środowisku człowieka [19, 39].

Testy te są proste w wykonaniu, nie wymagają dużych nakładów finansowych. Wyniki są uzyskiwane w bardzo krótkim czasie (już po 48 godzinach). Trudno jednak porównywać wyniki badań prowadzonych równoległe na roślinach i ssakach, istnieją bowiem istotne różnice w budowie komórek roślinnych i zwierzęcych. Obecność ściany komórkowej u roślin ma wpływ na przenikanie związków chemicznych, nie znany jest również wpływ substancji badanych na metabolizm komórkowy.

#### UWAGI KOŃCOWE

Związki chemiczne rzadko kiedy wywołują jeden rodzaj uszkodzeń w cząsteczce DNA. Zwykle wykazują szeroki zakres działania, będący wynikiem różnego rodzaju oddziaływań (modyfikacja zasad, fosforylacja reszt cukrowych, pęknięcia nici DNA, jak również wtórne efekty wywoływane nieprawidłową naprawą DNA oraz replikacją). Jeśli w komórce mają miejsce ww. zmiany to należy się liczyć, że badany związek może być potencjalnym czynnikiem kancerogennym.

Ten sam mutagen może indukować różnego typu mutacje i w różnym stopniu może być zaangażowany w procesie powstawania nowotworów. Dlatego też do monitorowania różnorodnych zmian genotypowych i fenotypowych konieczne jest równoległe stosowanie wielu metod badawczych i prawidłowej analizy uzyskanych wyników.

Uzyskiwane w laboratoriach całego świata wyniki badań związków chemicznych różnymi testami bakteryjnymi i na organizmach eukariotycznych są zbierane, opracowywane i publikowane przez Gene-Tox Program of the US Environmental Protection Agency. Jednym z wielu założeń Gene-Tox Program jest to, że wyniki uzyskane w określonym teście dla różnych związków chemicznych powinny być porównywalne na podstawie 3 parametrów: czułości, specyficzności i dokładności. Z danych zebranych przez Environmental Protection Agency wynika, że nie istnieje jedyna, idealna metoda testowania właściwości mutagennych/kancerogennych związków chemicznych obecnych w środowisku człowieka [14, 32]. Konieczne jest więc stosowanie wielu czułych technik monitorowania narażenia ludzi na związki genotoksyczne. Dobór tych technik musi być

dobrze przemyślany i uzgodniony z wieloma ośrodkami zajmującymi się badaniami odległych skutków oddziaływania substancji chemicznych na zdrowie człowieka.

H. Czeczot, I. Rahden-Staroń

## CERTAIN SHORT-TERM BACTERIAL AND EUKARYOTIC TESTS FOR DETECTION OF GENOTOXICITY OF ENVIRONMENTAL CHEMICAL CONTAMINANTS

### Summary

During the last years human exposure to environmental chemical contaminants (mutagenic/carcinogenic agents) has greatly increased. Evaluation of the biological effect of human exposure to mutagenic/carcinogenic agents in short-term tests is very important. In present paper the bacterial and eukaryotic tests for detection of genotoxic effect of environmental chemical contaminants have been described.

### PIŚMIENNICTWO

1. Allen J.W., Shuler C., Mendes R.W., Latt S.A.: A simplified technique for *in vivo* analysis of sister chromatid exchanges using 5-bromodeoxyuridine tablets. *Cytogenet. Cell. Genet.* 1977, 18, 231. – 2. Ames B.N., McCann J., Yamasaki E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 1975, 31, 347. – 3. Ashby J., Tinwell H.: Use of transgenic mouse *lacI/Z* mutation assays in genetic toxicology. *Mutagenesis* 1994, 9 (3), 179. – 4. Bird R.P.: Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* 1987, 37, 147. – 5. Boiteux S., O'Connor T.R., Lederer F., Gouyette A., Laval J.: Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein: a DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic sites. *J. Bio. Chem.* 1990, 265, 3916. – 6. Brusick D.J., Simmon V.F., Rosenkranz H.S., Ray V.A., Stafford R.S.: An evaluation of the *Escherichia coli* WP2 and WP2 *uvrA* reverse mutation assays. *Mutat. Res.* 1980, 76, 169. – 7. Costa de Oliviera R., Laval J., Boiteux S.: Induction of SOS and adaptative responses by alkylating agents in *Escherichia coli* mutants deficient in 3-methyladenine – DNA glycosylase activities. *Mutat. Res.* 1986, 183, 11. – 8. Cupples C.G., Miller J.H.: A set of *LacZ* mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base substitutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 19, 27. – 9. Cupples C.G., Cabrera M., Cruz C., Miller J.H.: A set of *LacZ* mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of specific frameshift mutations. *Genetics* 1990, 125, 275. – 10. Davies M.J., Phillips B.J., Anderson D., Rumsby P.C.: Molecular analysis of mutation at the *hprt* locus in Chinese Hamster V79 cells induced by ethyl methanesulphonate and mitomycin C. *Mutat. Res.* 1993, 291, 2, 117. – 11. Fairbairn D.W., Olive P.L., O'Neill K.L.: The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 1995, 339 (1), 37. – 12. Farr S.B., Kogoma T.: Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* 1991, 55, 561. – 13. Gabridge M.G., Legator M.S.: A hosted-mediated microbial assay for the detection of the mutagenic compounds. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1969, 130, 831. – 14. Galloway S.M.: International workshop on standardisation of genotoxic test procedures. *Commentary. Mutat. Res.* 1994, 312, 2, 201. – 15. Gichner T., Badayev S.A., Dremchenko S.I., Relichova J., Sandhu S.S., Usmanov P.D., Usmanova O., Velminsky J.: Arabidopsis assay for mutagenicity. *Mutat. Res.* 1994, 310 (2), 249. – 16. Georlich O., Quillardet P., Hofnung M.: Induction of the SOS response by hydrogen peroxide in various *Escherichia coli* mutants with altered protection against oxidative DNA damage. *J. Bacter.* 1989, 171, 11, 6141. – 17. Gorelick N.J.: Overview of mutation assays in transgenic mice for routine testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 1995, 25, 3, 218. – 18. Gossen J.A., de Leeuw W.J.,

Vijg J.: *LacZ* transgenic mouse models: their application in genetic toxicology. *Mutat. Res.* 1994, 307, 2, 451. – 19. Grant W.F.: The presents status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 1994, 310 (2), 175. – 20. Green S., Lavappa K.S., Manandhar M., Sheu Ch., Whorton A., Springer J.A.: A guide of mutagenicity testing using the dominant lethal assay. *Mutat. Res.* 1987, 189, 167.

21. Heddle J.A., Hite M., Kirkhart B., Mavourin K., MacGregor J.T., Newel G.W., Salamone M.F.: The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the USA Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 1983, 123, 61. – 22. Heddle J.A., Cimino M.C., Hayashi M., Romagna F., Shelby M.D., Tucker J.D., Vanparys Ph., Mac Gregor J.T.: Micronuclei as an index of xytogenetic damage: past, present and future. *Environ. Mol. Mutagen.* 1991, 18, 227–291. – 23. Heddle J.A., Shaver-Walker P., Tao K.S., Zhang X.B.: Treatment protocols for transgenic mutation assays *in vivo*. *Mutagenesis* 1995, 10 (6), 467. – 24. Herrera G., Urios A., Alexandre V., Blanco M.: Mutability by polycyclic hydrocarbons is improved in derivatives of *Escherichia coli* WP2 *uvrA* with increased permeability. *Mutat. Res.* 1993, 301, 1. – 25. Jaylet A., Deparis P., Ferrier V., Grinfeld S., Siboulet R.A.: New micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltii* to detect mutagens in fresh water pollution. *Mutat. Res.* 1986, 164, 245. – 26. Jeggo P.: Isolation and characterisation of *E. coli* mutants unable to induce the adaptative response to simple alkylating agents. *J. Bacteriol.* 1979, 139, 786. – 27. Jenek J.: Wybrane testy bakteryjne wykorzystywane do wykrywania genotoksycznych właściwości związków chemicznych. *Roczn. PZH* 1988, 6, 475. – 28. Jha A.N., Hutchinson T.H., Mackay J.M., Elliott B.M., Dixon D.R.: Development of an *in vivo* genotoxicity assay using the marine worm *Platynereis dumerli* (Polychaeta: Nereidae). *Mutat. Res.* 1996, 359 (2), 141. – 29. Johannisson A., Eriksson B., Amneus H., Zetterberg G.: Attempts to use the HPRT-assays an automated short-term monitor for an acute exposure to mutagens. *Cell. Biol. Toxicol.* 1992, 8 (4), 233. – 30. Kanaya N., Gill B.S., Grover I.S., Murin A., Osiecka R., Sandhu S.S., Andresson H.C.: *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutat. Res.* 1994, 310 (2), 231.

31. Kazuyuki T., Makino K., Yonei S., Nakata A., Shinagawa H.: Molecular cloning and nucleotide sequencing of *oxyR*, the positive regulatory gene of a regulon for an adaptative response to oxidative stress in *Escherichia coli*: Homologies between *OxyR* protein and a family of bacterial activator proteins. *Mol. Gen. Genet.* 1989, 218, 371. – 32. Kirkland D.J., Galloway S.M., Sofuri T.: International workshop on standardisation of genotoxic test procedures. Summary of major conclusions. *Mutat. Res.* 1994, 312, 2, 205. – 33. Kozirowska J.: Możliwości oceny właściwości rakotwórczych na podstawie testów na mikroorganizmach. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1981, 35, 429. – 34. Krzanowska H.: Types of sperm-head abnormalities in mice. *Acta Bio. Crac. Zoo.* 1976, 9, 67. – 35. Latt S.A., Allen J., Bloom S.E., Carrano A., Falke E., Kram D., Schneider E., Schrek R., Tice R., Whitfield B., Wolff S.: Sister chromatid exchange. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 1981, 87, 1. – 36. Leifer Z., Kada T., Mandel M., Zeiger E., Staffoed R., Rosenkranz H.S.: An evaluation of test using DNA repair-deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity. *Mutat. Res.* 1981, 87, 211. – 37. Lesca P., Fournier A., Lecoite P., Cresteil T.: A dual assay the specific screening of 3-methylcholantrene and phenobarbital – like chemical inducers of cytochrome P-450 monooxygenase. *Mutat. Res.* 1984, 129, 299. – 38. Levin D.E., Hollstein M., Christman M.F., Schwiens E.A., Ames B.N.: A new *Salmonella* tester strain TA102 with AVT base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982, 79, 7445. – 39. Ma T.H., Cabrera G.L., Cebulka-Wasilewska A., Chen R., Loarca F., Vandenberg A.L., Salamone M.F.: Tradescantia stamen hair mutation bioassay. *Mutat. Res.* 1994, 310, 2, 211. – 40. McCann J., Choi E., Yamasaki E., Ames B.N.: Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test. Part I. Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. USA* 1975, 72, 5135.

41. McCann J., Ames B.N.: Detection of carcinogens in *Salmonella*/microsome test. Part II. Assay of 300 chemicals. Discussion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1976, 73, 950. – 42. McKelvey-Martin

V.J., Green M.H., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Meo M.P., Collins A.: The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat. Res.* 1993, 288 (1), 47. – 43. Maron D.M., Ames B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 1983, 113, 173. – 44. McLellan E.A., Bird R.P.: Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the colon. *Cancer Res.* 1988, 48, 6187. – 45. Mirsalis J.C., Monforte J.A., Winegar R.A.: Transgenic animals models for detection of *in vivo* mutations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1995, 35, 145. – 46. Michell G., Combes R.D.: Mutation tests with the fruit fly *Drosophila melanogaster* in: S. Venitt and J.M. Parry (eds), *Mutagenicity testing. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford 1984, 149. – 47. McQueen C.A., Williams G.M.: Characterization of DNA repair elicited by carcinogens and drugs in the hepatocyte primary culture/DNA repair test. *J. Toxicol. Environ. Health* 1981, 8, 463. – 48. Moreau P., Bailone P., Devorat R.: Prophage induction in *Escherichia coli* K12 *envA uvrA*: A highly sensitive test for potential carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1976, 73, 3700. – 49. Oda Y., Nakamura S., Oki O., Kato T., Shinagawa H.: Evaluation of the new system (umu test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* 1985, 147, 219. – 50. Oda Y., Yamazaki H., Watanabe M., Nohmi T., Shimada T.: Development of high sensitive umu test system: rapid detection of genotoxicity of promutagenic aromatic amines by *Salmonella typhimurium* strain NM2009 possessing high O-acetyltransferase activity. *Mutat. Res.* 1983, 123, 61.

51. Perry P.E., Evans H.J.: Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 1975, 258, 121. – 52. – Preston R.J., Au W., Bender M.A., Brewen J.G., Carrano A.V., Heddle J.A., McFee A.F., Wolff S., Wassom R.J.: Mammalian *in vitro* and *in vivo* cytogenic assays: a report of the US Environmental Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 1981, 87, 143. – 53. Quillardet P., Hofnung M.: The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat. Res.* 1985, 147, 65. – 54. Quillardet P., Hofnung M.: The SOS Chromotest: a review. *Mutat. Res.* 1993, 297 (3), 235. – 55. Salles B., Germanier M., Defais M.: A bacterial strain for detecting agents that produce free radical – mediated DNA strand breaks. *Mutat. Res.* 1987, 183, 213. – 56. Savage J.R.K.: Annotation: Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.* 1976, 13, 103. – 57. Seglen P.O.: Preparation of isolated rat liver cell. In: *Methods in Cell Biology*, Academic Press, New York 1976, 13, 29. – 58. Schmid W.: The micronucleus test. Methodological aspects. *Mutat. Res.* 1973, 19, 197. – Slater E.E., Anderson M.D., Rosenkrantz H.S.: Rapid detection of mutagens and carcinogens. *Cancer Res.* 1971, 31, 970. – 60. Swenberg J.A., Petzold G.L., Harbach P.R.: *In vitro* DNA damage/alkaline elution assay for predicting carcinogenic potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976, 72, 732.

61. Topham J.C.: The detection of carcinogen – induced sperm head abnormalities in mice. *Mutat. Res.* 1980, 69, 149. – 62. Vennitt S., Crofton-Sleigh C., Foster R.: Bacterial mutation assays using reverse mutation. In: Vennitt S., Parry J.M.: (Eds) *Mutagenicity Testing. A practical Approach*. IRL, Press, Oxford 1984, 45. – 63. Watanabe M., Sofuni T., Nohmi T.: Comparison of the sensitivity of *Salmonella typhimurium* strains YG1024 and YG1012 for detecting the mutagenicity of aromatic amines and nitroarenes. *Mutat. Res.* 1993, 301, 7. – 64. Watson W.P.: Post-radiolabeling for detecting DNA damage. *Mutagenesis* 1987, 2, 319. – 65. Williams G.M.: Carcinogen induced DNA repair in primary rat liver cell cultures: a possible screen for chemical carcinogens. *Cancer Lett.* 1976, 1, 231. – 66. Wurgler F.E., Graf U., Frei H.: Somatic mutation and recombination test in wings of *Drosophila melanogaster*. In: Ashby J. et al. (Eds) *Progress in Mutation Research*, Elsevier, Amsterdam 1985, vol. 5, 325. – 67. Wurgler F.E., Vogel E.W.: *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells *Drosophila melanogaster*. In: de Serris F.J. (Ed) *Chemical Mutagen Principles and Methods for their Detection*, Plenum, Press, New York 1986, vol. 10, 1. – 68. Wyrobek A.J., Bruce W.R.: Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975, 72, 4425. – 69. Wyszowska K., Bajerska A.: Ujednolicona metodyka oceny właściwości mutagennych substancji chemicznych testem wymiany chromatyd

siostrzanych (SCE) *in vitro* na limfocytach ludzkich. W: Zakres metody badań toksyczności substancji chemicznych w przemyśle. IMP, Łódź 1990. – 70. Zimmermann F.K: Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mutat. Res. 1975, 31, 71.

Otrzymano: 1997.05.97.