

6. TESTY GENOTOXICITY

- *In vivo* studium biologických pochodů (testování genotoxicity) za života organismu
- *In vitro* studium biologických pochodů (testování genotoxicity) mimo živý organizmus
- Používané organizmy
 - bakterie (*S. typhimurium*, *E. coli*, *B. subtilis*, *Proteus mirabilis*)
 - kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*)
 - rostliny (*Vicia faba*, *Tradescantia*, *Arabidopsis thaliana*)
 - bezobratlí (*D. melanogaster*)
 - savci (myši, krysy, potkani, králíci)
 - buněčné kultury (savčí a lidské)
 - epidemiologické studie u lidí
- Volba organismů pro testy genotoxicity a řazení do baterií je koncipováno v souladu s direktivami EU (COM, 1993/638), protokoly OECD (1993) a s doporučenými postupy používanými v zemích Evropské Unie (Carere a kol., 1995) v oblasti genetické toxikologie. Některé postupy a navržené testy vycházejí z doporučení US EPA, popřípadě NCI a NTP.
- Povinné testování genotoxicity je u všech nových chemických látek a jejich směsí, které se mohou vyskytnout v prostředí a přijít do kontaktu s lidmi a dále substance, které nebyly testovány a na základě epidemiologických údajů či výsledků z počítačového modelování jsou podezřelé. Mezi tyto substance řadíme:
 - Nové chemické látky a jejich směsi nebo látky, které nebyly na genotoxicitu testovány
 - Potravinové aditiva
 - Farmaceutické přípravky
 - Kosmetické výrobky
 - Aditiva v krmivech
 - Pesticidy
 - Sledování lokalit *in situ*
 - Vzorky prostředí
 - Pracovní místa a provozovny s toxickými chemickými látkami
 - Záření.

➤ Strategie testování genotoxicity

- Počet a typ požadovaných testů genotoxicity pro nové chemické látky závisí na rozsahu a povaze očekávané expozice u lidí. Při obecném rozhodování o výběru testovacího systému je třeba brát zřetel na některé další faktory, zejména na množství produkované substance, druh a množství informací o dané substanci, výsledky počítačového modelování (SAR) s ohledem na analýzu potenciální mutageneze či karcinogeneze.
- V podmínkách České republiky je třeba zohledňovat ekonomické hlediska použití některých testů, existující, případně chystané legislativní omezení o využití zvířat k těmto účelům, etické aspekty podobných experimentů a v souladu s celosvětovým trendem nahrazovat existující metody metodami moderními, které sledují změny přímo na DNA.
- Z těchto důvodů byl v návrhu omezen na minimum počet testů, při kterých musejí být usmrcována zvířata, testů na savcích, které jsou ekonomicky vysoce nákladné a jsou legislativně či eticky nevyhovující. Součástí návrhu jsou moderní testy, sledující specifické změny na molekulární úrovni s dobrou predikcí vzhledem ke karcinogenitě.

Prokaryotní organismy: A. Testy na bakteriích

A-1A. Test na reverzní mutace na *Salmonella typhimurium* (Amesův test)

Specifikace: Test na genové mutace (reverzní mutace), krátkodobý, preskriningový, iniciační skriningový

Citační zdůvodnění: Commission Directive EU (93/638/B.14.), OECD (1993/471), doporučuje NTP (Ashby a kol., 1996; Elliot a Ashby, 1997), od roku 1995 více jak 250 citací.

Popis: Detekce potenciálních mutagenních a orientačně i karcinogenních účinků zkoumaných látek.

Princip: Amesův test je založen na detekci indukovaných reverzních mutací v histidinovém lokuse u *Salmonella typhimurium*. Deteguje tedy mutace, které obnovují schopnost organismu syntetizovat histidin, t.j. mutaci z *his*⁻ na *his*⁺. Jedná se o detekci pravých reverzí (vznikajících na původním místě) nebo supresorových mutací (vznikajících na jiném místě chromozomu). Revertované buňky jsou zviditelněny tím, že rostou na půdě bez aminokyseliny histidinu, na které nerostly původní organismy (frekvence reverzních kolonií se hodnotí po 48-72 hodinách). Test chemických látek se provádí v podmínkách metabolické aktivace (ve spojení s jaterním extraktem krysy S-9) nebo bez metabolizace. OECD doporučuje pro používat pro účely testování minimálně 4 kmeny, t.j. TA1535, TA1537, TA98 a TA100 (Elliott a kol., 1994).

Využití: Pomocí Amesova testu bylo testováno již obrovské množství chemických látek (Srb a Červinka, 1992; Zeiger a kol., 1992; McGregor, 1994a; Dearfield, 1994; Marhan, 1995; Giller a kol., 1996; Reifferscheid a Heil, 1996), bývá používán v kosmetickém průmyslu (Emig a kol., 1996) a při sledování záření (Kozubek a kol., 1994). Jeho využití je také doporučeno v případě sledování vzorků prostředí (Agurell a Stensman, 1992; Blakey a kol., 1994; Vargas a kol., 1995; Tates a kol., 1996; Černá a kol., 1996; Giller a kol., 1997) nebo derivátů cigaretového kouře (Chen a Lee, 1996).

Výhody: Rychlý screeningový test, ekonomicky nenáročný, vysoká citlivost k mutagenům a karcinogenům.

Nevýhody: Nedostatečná srovnatelnost s vyššími organismy

Interpretace výsledků: Pozitivní výsledky testu na *Salmonella typhimurium* ve srovnání s kontrolou naznačují, že látka vyvolává mutace v genomu tohoto organismu. Negativní výsledky testu naznačují, že testovaná substance není mutagenní u tohoto organismu. Ve spojení s jinými krátkodobými testy lze odhadovat i karcinogenní potenciál testovaných substancí (Quillardet a Hofnung, 1993; LeBoeuf a kol., 1996).

A-1B. Muta-ChomoPlate fluktuační verze Amesova testu

Specifikace: Mikrodestičková verze testu na genové mutace (reverzní mutace), krátkodobý, skrínigový, pro použití *in situ*.

Citační zdůvodnění: doporučeno NTP (Legault a kol., 1994), od roku 1995 více jak 50 citací.

Popis: Detekce potenciálních mutagenních a orientačně i karcinogenních účinků zkoumaných látek.

Princip: viz. A-1. Fluktuační test se provádí na mikrotitračních destičkách v tekutém médiu s barevným vyhodnocením (Rao a Lifshitz, 1995). Testovaná koncentrační řada s S9 směsí (nebo bez ní) se smíchají ve zkumavkách se základním růstovým médiem. Dodají se bakterie a obsah zkumavek se pipetuje na destičku, která se inkubuje 5 dní při 37°C. Pokud zde není přítomna toxicita, rostou mutované buňky v jamkách a mění pH, což je indikováno změnou zabarvení média.

Využití: Je používán ke sledování genotoxické aktivity různých chemických látek (Mamber a kol., 1993; Glatt a kol., 1993; LeCurieux a kol., 1995; Mersch-Sudermann a kol., 1996a), v kosmetickém průmyslu (Emig a kol., 1996) a u environmentálních vzorků (Mersch-Sudermann a kol., 1989; Dutka a kol., 1995; White a Rasmussen, 1996). Test se dále používá pro detekci mutagenní aktivity a mutagenního materiálu ve vodě, sedimentu, vzduchu, chemikáliích, potravních přísadách a dalších biologických tekutinách.

Výhody: Malá technická náročnost, adaptabilní k různým podmínkám testování, použití k testování *in situ*.

Nevýhody: Nízká srovnatelnost s eukaryotami.

Interpretace výsledků: viz. A-1A.

A-2. SOS chromotest na *Escherichia coli*

Specifikace: Test na genové mutace, krátkodobý, skriningový, mikrodestičková standardizovaná verze pro testy *in situ*.

Citační zdůvodnění: doporučuje NTP (Legault a kol., 1994), NCI (Ramos a kol., 1998), od roku 1995 více jak 150 citací.

Popis: Detekce potenciálních mutagenních a orientačně i karcinogenních účinků zkoumaných látek. Existuje standardizovaná mikrodestičková verze.

Princip: Test je založen na citlivém systému pro detekci poškození genetického materiálu, v jehož důsledku se stává aktivní SOS enzymatický komplex a je schopen opravit genetické poškození (Quillardet a kol., 1982). Tento efekt se navenek projevuje zvýšením produkce β -galaktozidázy, kterou je možno stanovit kolorimetricky. V určitých koncentracích může sledovaná látka působit toxicky a způsobit pokles počtu buněk a snížení hladiny β -galaktozidázy. Vedle sledování β -galaktozidázy se proto sleduje i konstitutivně produkovaná alkalická fosfatáza. Poměry naměřených hodnot obou substancí pak kvantitativně charakterizují genotoxicitu sledované látky. Test je vysoce standardizován zavedením SOS-chromotestových kitů *E. coli* PQ37 .

Využití: Je používán ke sledování genotoxické aktivity různých chemických látek (Mamber a kol., 1993; Glatt a kol., 1993; LeCurieux a kol., 1995; Mersch-Sudermann a kol., 1996a; Solomon a kol., 1996; Gebel a kol., 1997; Lantschogebel, 1997; Odunola, 1997; Picada a kol., 1997), v kosmetickém průmyslu (Emig a kol., 1996), při testování léčiv (Marczewska a Koziorowska, 1997; Ramos a kol., 1998) a u environmenntálních vzorků (Mersch-Sudermann a kol., 1989; Mersch-Sudermann a kol., 1996; Dutka a kol., 1995; White a Rasmussen, 1996; Knasmuleer a kol., 1997; Ptitsin a kol., 1997), ke sledování hladin PCB tukových tkáních lidí (Mersch-Sudermann a kol., 1996b), derivátů cigaretového kouře (Chen a Lee, 1996), k testování pesticidů (Ruiz a Marzin, 1997; Saxena a kol., 1997) a k testování vzorků prostředí *in situ* (Giller a kol., 1997; White a kol., 1997) a elektromagnetického pole (Jacobson-Kram a kol., 1997).

Výhody: Rychlý screeningový test genotoxicity (4-6 hodin), malá technická náročnost, možnost využití pro kvantitativní analýzu, adaptabilní k různým podmínkám. Mikrodestičková verze k použití testování vzorků přímo *in situ*.

Nevýhody: Citlivost na toxické účinky některých sloučenin, nízká srovnatelnost s eukaryotami.

Interpretace výsledků: Pozitivní výsledky naznačují, že testovaná látka má na *E. coli* genotoxický účinek. Negativní znamená, že látka nemá genotoxický účinek na *E. coli*. Ve spojení s jinými krátkodobými testy lze odhadovat i karcinogenní potenciál testovaných substancí (White a Rasmussen, 1996).

***Eukaryotní organismy:* B. Testy na živočiších**

B-1. In vitro savčí cytogenetický test na chromozomální aberace

Specifikace: Test *in vitro* na chromozomální aberace (numerické nebo strukturální), krátkodobý, skriningový, savčí

Citační zdůvodnění: Commission Directive EU (93/638/B.10.), OECD (1993/473), doporučuje NCI (Wu a kol., 1997), od roku 1995 více jak 160 citací.

Popis: Detekce potenciálních mutagenních a karcinogenních účinků zkoumaných látek u savců a v kulturách savčích somatických buněk. Používá se také k analýze lidských periferních lymfocytů jako biologický skupinový expoziční test k odhalení skutečného genetického rizika prostředí na lidi (Preston, 1994).

Princip: Test na strukturální aberace, které mohou být dvou typů, chromozomální nebo chromatidové (Galloway a kol., 1994). Expozice testovanou substancí se provádí s a bez metabolické aktivační preparace. Po expoziční je zastaveno buněčné dělení a chromozómy jsou barveny. Metafázní buňky pak jsou analyzovány na chromozomální aberace. Stejně se postupuje při detekci strukturálních aberací z periferních lidských lymfocytů.

Využití: Test byl použit pro identifikaci mutagenní aktivity chemických sloučenin (Flessel a kol., 1993; Warr a kol., 1993; Kligerman a kol., 1995; Choi a kol., 1996; Matsui a kol., 1996; Montero a Ostrovsky, 1997; Wever a kol., 1997; Zamada a kol., 1997), pro testování mutagenity záření (Puck a Harvey, 1995; Jacobson-Kram a kol., 1997), ve farmaceutickém průmyslu (Purves a kol., 1995; Miller a kol., 1997) a jako skupinový expoziční test u lidí ze zatížených oblastí (Medková, 1990; Kučerová a kol., 1992; Motykiewicz a kol., 1992; Padovani a kol., 1993; Vodička a kol., 1995; Tates a kol., 1996; Bogadi-Sare a kol., 1997) a ke sledování vzorků prostředí (Kaina a kol., 1997; Nadeenko a kol., 1997).

Výhody: Pomocí testu lze analyzovat četnost aberací přímo z periferních lymfocytů exponovaných lidí.

Nevýhody: Ačkoliv mnoho sloučenin jsou pozitivní karcinogeny, korelace mezi karcinogenitou a výsledky testů jsou nízké. Existuje mnoho karcinogenů, které nejsou tímto testem detegovatelné (Ashby a kol., 1996).

Interpretace výsledků: Pozitivní výsledek *in vitro* cytogenetického testu napovídá, že substance indukují chromozomální aberace v kulturách savčích somatických buněk. Negativní výsledek indikuje, že substance neindukují chromozomální aberace. Ve spojení s testem na mikrojádra lze částečně odlišit genotoxicitu, nekarcinogenitu a klastogenitu (Hrelia a kol., 1996; Henderson a kol., 1997). Test bývá použit také při sledování aberací u koní, prasat a skotu ze zatížených oblastí (Rubeš a kol., 1992).

B-2. Mikrojaderný test *in vivo* na savcích

Specifikace: Test *in vivo* na chromozomální aberace (ztráty), krátkodobý, skriningový, savčí

Citační zdůvodnění: Commission Directive EU (93/638/B.12.), OECD (1993/474), doporučuje NTP (Ashby a Tinwell, 1996), od roku 1995 více jak 110 citací.

Popis: Detekce potenciálních mutagenních a karcinogenních účinků zkoumaných látek u savců, nejčastěji hlodavců. Je možné také analyzovat u lidských periferních lymfocytů.

Princip: Na pozorování jsou nejvhodnější polychromatické erythrocyty kostní dřeně hlodavců a/nebo lymfocyty periferní krve. Při vývoji erythrocytu z erythroblastu dochází k enukleaci, vzniklá mikrojadra však zůstávají v cytoplazmě a jsou dobře pozorovatelná. Mikrojadro je malá částice, vznikající v důsledku chromozomových zlomů (je pak tvořeno acentrickým fragmentem) nebo poruchou funkce dělicího vřeténka a pak je tvořeno celým chromozómem, které není začleněn v novém jádře. Pomocí testu lze detegovat *in vivo* cytogenetické poškození chromozómů nebo mitotického aparátu způsobeného chemickými látkami. Testem lze identifikovat takové substance, které způsobují celkové nebo částečné chromozomové ztráty.

Využití: Test je vhodný pro odhad mutagenního rizika chemických látek (Waters a kol., 1994; Heidemann a kol., 1996; Matsui a kol., 1996; Shimada a Itoh, 1996; Agarwall a Olivero, 1997; Dillon a ko., 1997; Gebel a kol., 1997; Knasmuller a kol., 1997; Ong a kol., 1997; Stocker a kol., 1997; Tsutsui a Barrett, 1997), farmaceutik (Kulling a Metzler, 1997; Miller a kol., 1997). Používá se také pro potvrzení negativních výsledků testů *in vitro* (Kirkland a Dean, 1994), ke sledování indukce mutací radiací (McKay a kol., 1994; Winegar a kol., 1994) a při sledování mutagenní aktivity environmentálních vzorků (Blakey a kol., 1994; Perez-Alzola a Santos, 1997).

Výhody: Umožňuje na savcích buňkách *in vivo* detegovat jak poškození chromozómů, tak i mitotického aparátu zkoumanou látkou. Je možné odhadovat poškození či ztráty chromozómů přímo u exponovaných lidí.

Nevýhody: Po aplikaci testované látky je třeba hlodavce usmrctvat. Celkově vysoké ekonomické náklady na chov hlodavců.

Interpretace výsledků: Pozitivní výsledky mikrojaderného testu naznačují, že testovaná látka způsobuje u polychromatických erythrocytů laboratorních živočichů zvýšený výskyt mikrojader. Negativní výsledek naznačuje, že daná látka nezpůsobuje tvorbu mikrojader u daného druhu. Spolu s testem na neprogramovanou syntézu DNA je doporučen pro *in vivo* protokol (Mullet-Tegethoff a kol., 1997).

B-3. Test na genové mutace *in vitro* na savčích buněčných kulturách

Specifikace: Test *in vitro* na genové mutace, krátkodobý, skriningový, savčí buněčné kultury CHO, lokusy HPRT nebo TK.

Citací zdůvodnění: Commission Directive EU (93/638/B.17.), OECD (1993/476), doporučuje NCI (Finette a kol., 1996; Wu a kol., 1997), od roku 1990 více jak 200 citací.

Popis: Detekce potenciálních mutagenních účinků zkoumaných látek u savčích kultur CHO, stabilizované linie fibroblastů čínského křečka V79 nebo lymfatických buněk L5178Y v jejich HPRT nebo TK lokusech (Elliott a kol., 1994), popřípadě embryonálních buněk syrského křečka.

Princip: Test je používán ke zjištění schopnosti studované sloučeniny indukovat v savčích buňkách genetickou změnu. Pomocí testu lze na buněčných liniích detegovat mutace v lokuse TK (ztráta schopnosti syntetizovat tymidin kinázu) nebo HPRT lokuse (ztráta schopnosti buněk syntetizovat hypoxantinfosforibozyltransferázu). Tyto změny mohou být způsobeny bodovou mutací nebo malou delecí. Test je prováděn v podmínkách metabolické aktivace nebo bez metabolizace.

Využití: Test je používán v odhadu genotoxických účinků chemických látek (Chiewchanwit a Au, 1994; Kirkland a Dean, 1994; Callander a kol., 1995; Heiedmann a kol., 1996; Matsui a kol., 1996; Keshava a kol., 1997; Knasmuleer a kol., 1997; Nakagawa a kol., 1997; Oliveira a kol., 1997; Trosic a kol., 1997; Tsutui a kol., 1997; Tsutsui a kol., 1998), záření (Kataoka a kol., 1993; Jacobson-Kram a kol., 1997) a ve farmaceutickém průmyslu (Purves a kol., 1995; Miller a kol., 1997)

Výhody: Poměrně rychlá metoda na stanovení genových mutací na savčích kulturách.

Nevýhody: Extrapolace výsledků na hlodavčích kulturách vzhledem k člověku je nejistá.

Interpretace výsledků: Pozitivní výsledky při sledování mutagenity na savčích buňkách naznačují, že látka je potenciálně mutagenní. Negativní výsledky naznačují, že v daných podmínkách není pro savčí buňky látka mutagenní. V experimentech se určuje hodnota mutagenity (nemutagenní, velmi slabý mutagen, slabě mutagenní, středně silný mutagen, silný a velmi silný mutagen). Sledování HPRT mutací se provádí také u lidí (Robinson a kol., 1993). Pro identifikaci genových mutací se jeví spolehlivější lokus TK než HPRT (Moore a kol., 1989).

B-4. Test na pohlavní recesivně letální mutace *D. melanogaster* (SLRL)

Specifikace: Test na genové mutace v pohlavních buňkách, krátkodobý, skriningový

Citační zdůvodnění: Commission Directive EU (93/638/B.20.), OECD (1993/477), od roku 1990 více jak 90 citací.

Popis: Test na detekci indukovaných genových mutací (bodové mutace a malé delece).

Princip: Princip testu spočívá v křížení samečků standardní linie (Oregon-K, Oregon-R, Canton-S, Berlin-K), kteří byly exponováni testované látce se samičkami, kde se využívá tzv. balancovaných chromozómů (OECD doporučuje linie samiček Müller-5 (Basc), použité mohou být také CIB). Po dvou generacích lze na redukci počtu samečků detegovat letální mutace a chromozomální aberace (bodové mutace a malé delece) na chromozomu X (Ashburner, 1989; Graf a kol., 1992). Odhaduje se, že asi 800 genů (z asi 1000) na chromozomu X může projevit letální efekt (Lee a kol., 1983). Aplikace testované látky se provádí potravně, injekčně nebo inhalačně, je možné provádět akutní i chronické testy. Umožňuje testovat přímé i nepřímé mutageny, neboť u drozofily dochází k metabolickým reakcím podobným reakcím jater u savců (Graf a kol., 1984). Umožňuje studovat mutagenitu látek v různých stádiích vývoje pohlavních buněk.

Využití: Test je používán ve spojení s testem toxicity, kdy se stanovuje nejvhodnější koncentrace pro LD₅₀. Test je využíván pro studie genetické aktivity chemických látek (Tripathy a Patnaik, 1992; Vogel a kol., 1993; Bentley a kol., 1994; Ramos-Morales, 1995; Ballering, 1996; Woodruff a kol., 1996; Pesheva a kol., 1997; Romero a kol., 1997), vzorků prostředí (Jansson a kol., 1991; Aslanian a kol., 1994) nebo záření (Barnett, 1992; Otaka a kol., 1992).

Výhody: Je velice citlivý, protože indukuje různé typy genových změn (bodové mutace, mikrodelece a mikroabrace), které mohou vznikat po celé délce chromozomu X. Drozofily mohou být použity pro odhad četnosti letálních mutací prostředí přímo *in situ*.

Nevýhody: Nevýhodou testu je poměrně velká pracnost (test probíhá po dobu 2 generací a samičky v F₁ musí být kříženy individuálně). U testu Müller-5 je požadováno potomstvo F₂ v u negativní kontroly v počtu asi 7 000 imág (Valencia a kol., 1989; Graf a kol., 1992).

Interpretace výsledků: Pozitivní výsledek testu indikuje, že studovaná substance indukuje mutace v pohlavních buňkách hmyzu. Negativní výsledek hovoří o opaku. V případě pozitivního výsledku následuje většinou test na dědičné mutace u myši (Bentley a kol., 1994). Korelace mezi mutagenní a karcinogenní aktivitou chemikálií je u Müller-5 testu 85% (Vogel a kol., 1993).

B-5. Test na sesterské chromatidové výměny *in vitro* (SCE)

Specifikace: Test na specifické změny na DNA (sesterské chromatidové výměny) u savčích nebo lidských buněk, krátkodobý, skrínigový

Citační zdůvodnění: Commission Directive EU (93/638/B.19.), OECD (1993/479), doporučuje NCI (Wu a kol., 1997), od roku 1995 více jak 120 citací.

Popis: Test na sesterské chromatidové výměny (SCE) je krátkodobý cytogenetický test mutagenity na detekci genetických změn savčích buněk a popřípadě lidských periferních lymfocytů. Deteguje reciproké výměny DNA mezi 2 sesterskými chromatidami replikujících se chromozomů, zahrnuje tedy zahrnuje zlomy a znovuspojení chromatid.

Princip: Savčí buňky (linie ovariálních buněk čínského křečka CHO, primární kultury lidských periferních lymfocytů) jsou *in vitro* exponovány testované testované chemikálii v přítomnosti a bez přítomnosti aktivačního systému za přítomnosti media obsahujícího inkorporující se BrdU. Metoda charakterizuje mutageny jako klastogeny.

Využití: Pomocí testu byla sledována genotoxicita chemických látek (Wiencke a kol., 1991; Motykiewicz a kol., 1992; Klemans a kol., 1995; Tahara, 1995; Landi a kol., 1996; Kligerman a kol., 1996; Labbauf a kol., 1997), cigaretového kouře (Chen a Lee, 1996), vzorků prostředí (Seemayer a kol., 1994; Hornberg a kol., 1996; Kaina a kol., 1997; Nadeenko a kol., 1997) a případné zdravotní riziko u lidí (Lanhanisky a kol., 1993; Bogadi-Sare a kol., 1997).

Výhody: Možnost sledování přímé zátěže lidské populace u exponovaných profesních nebo jiných skupin lidí.

Nevýhody: Extrapolace výsledků z buněčných hlodavčích kultur na lidi je nespolehlivá.

Interpretace výsledků: Hodnotí se statisticky významný nárůst počtu SCE na buňku ve srovnání s kontrolou. Látka, která nezpůsobí statisticky významnou reprodukovatelnou odpověď se považuje za neúčinnou v tomto testovacím systému. U lidí se bere spontánní výskyt SCE jako kontrola, nárůst SCE se hodnotí procentuelně.

B-6. Neprogramovaná syntéza DNA *in vitro* (USD)

Specifikace: Test na poškození a opravu DNA (specifické změny DNA) u kultur primárních hepatocytů hlodavců nebo u lidských lymfocytů, krátkodobý, skrínigový

Citační zdůvodnění: Commission Directive EU (93/638/B.18.), OECD (1993/476), od roku 1990 více jak 60 citací.

Popis: Detekce reparační syntézy DNA pod vlivem účinku chemické látky. Identifikace látek indukujících poškození DNA a opravy *in vitro*.

Princip: Princip testu spočívá v detekci reparační syntézy DNA pod vlivem účinku chemické látky. Základem testu je inkorporace tritiem označeného thymidinu ($^3\text{H-TdR}$) do DNA savčích buněk, které nejsou v S fázi buněčného cyklu. Vložení $^3\text{H-TdR}$ může být detegováno autoradiograficky (AR) nebo pomocí kapalinové scincilační metody (LSC). Pracovní skupina v EPA, OECD a EC doporučuje používat AR (Madle a kol., 1994). Buňky jsou ovlivňovány testovanou látkou v podmínkách metabolické aktivace nebo bez ní (S9 mikosomální frakce nebo Acrolor).

Využití: Test je využíván k detekci genotoxické aktivity chemických látek (Holme a kol., 1989; Kasper a kol., 1995; Anderson a kol., 1996; Stocker a kol., 1997), k detekci environmentálních genotoxinů (Šrám a kol., 1990; Braun a kol., 1993; Šrám a kol., 1993; Naji-Ali a kol., 1994), ke sledování žáření (Jacobson-Kram a kol., 1997).

Výhody: Ekonomicky velice výhodná a nenáročná metoda. Krysí hepatocyty jsou platným modelem pro predikce genotoxického potenciálu na lidi.

Interpretace výsledků: Za pozitivní se považují hladiny USD signifikantně vyšší, než pozadí. Úroveň USD se klasifikuje, ale její stupeň nerozhoduje při určování mutagenity, resp. karcinogenity. Negenotoxický efekt látek, indukujících tumory, nebyl pomocí USD prokázán (Api a kol., 1995).

B-7. Test na somatické mutace a rekombinace u *Drosophila melanogaster* (SMART)

Specifikace: Test na specifické změny na DNA (somatické mutace a mitotické rekombinace) u hmyzu, krátkodobý, skriningový

Citační zdůvodnění: Od roku 1990 více jak 170 citací.

Popis: Detekce potenciálních mutagenů a orientačně i karcinogenů.

Princip: Využívá skutečnosti, že některé orgány těla drozofily (oči, křídla, genitálie aj.) se během stádia larvy a kukly vyvíjejí z imaginálních disků. Na těchto orgánech lze pak ve stadiu imága nalézt klony buněk, které pocházejí z mutovaných buněk imaginálního disku (Mollet a Würgler, 1974). Aplikace testované látky se provádí ve stadiu larvy, kde u trans-heterozygotních larev vede ztráta dominantní alely (bodové mutace, delece, rekombinace a ztráty chromozómu způsobené nondisjunkcí) k projevu mutace na sledovaném orgánu (Zordan, 1994).

Využití: Pomocí SMART mohou být testovány chemikálie v roztocích i v plynech. Běžně jsou prováděny testy chronické a akutní toxicity, kdy pro odhad genotoxických účinků se následně většinou používá LD₅₀ (Graf a kol., 1984). Existuje několik aplikací SMART. Aplikace na křídlech (wing spot test, alely *mwh* a *flr*) je v široké míře používána k detekci genotoxické aktivity chemických sloučenin (Graf a kol., 1989; Schaik a Graf, 1993; Dearfield, 1994; Marec a Gelbič, 1994; Inoue a kol., 1995; Frei a Würgler, 1996) a vzorků prostředí (Katz a Foley, 1993; Delgado-Rodriguez a kol., 1995; Chroust a kol., 1997). Aplikace na očích (eye spot test, alely *white(w)* a *white-coral (w^{co})*) je využívána při odhadech genotoxické aktivity chemikálií (Vogel a kol., 1993; Graf a Würgler, 1996; Ramel a kol., 1996) a vzorků prostředí (Green a kol., 1986). Aplikace na vajíčkách u systému samičí sterility (alely *fs(1)K10*) je využívána také při odhadech genotoxické aktivity chemikálií (Vogel a kol., 1993). Všechny jmenované aplikace mohou být součástí jediného genotypu (Jowett a kol., 1991).

Výhody: Hlavní výhodou SMART testů na *Drosophila melanogaster* je krátká generační doba, velké množství potomků, množství vhodných genetických markerů a specifických testovacích kmenů, schopnost larev i dospělých imág metabolizovat široké spektrum xenobiotik, tedy aktivovat a detoxikovat promutageny a prokancerogeny (Graf a kol., 1984) a nízká cena rozmnožovacích kultur. Nespornou výhodou *Drosophila melanogaster* je, že se jedná o modelový a tedy jeden z nejlépe geneticky prostudovaných organismů v říši eukaryot.

Nevýhody: Výsledky jsou obtížně srovnatelné s lidmi.

Interpretace výsledků: Pozitivní výsledek testu znamená, že látka způsobuje mutace u daného organismu. Z hlediska hodnocení mutagenu se většinou používá statistiky (Frei a Würgler, 1988, 1995), kde je látka hodnocena jako negativní, slabě pozitivní, pozitivní nebo bez závěru. Zvýšená výpovědní hodnota testu ke člověku byla prokázána u transgenních drozofil, nesoucí lidské geny pro metabolizační enzymy (Jowett a kol., 1991).

B-8. Test na mutace v pohlavních buňkách

Specifikace: Cytogenetický test *in vivo* používaný k detekci strukturálních aberací při mitóze ve spermatogoniálních buňkách. K analýze mutací a strukturálních aberací lze využít molekulárně-genetických metod nebo také testu na abnormální tvar spermií.

Citační zdůvodnění: Commission Directive EU (93/638/B.23.), OECD (1993/451), od roku 1990 více jak 150 citací.

Popis: Detekce látek způsobující dědičné mutace v určitém stadiu vývoje gamet.

Princip: Zvířata jsou exponována testované sloučenině, buněčné dělení zastaveno kolchicinem a poté preparováno testes. Analyzují se spermatocyty diakinese metafáze I dělení. Detekují se jednak chromozomové poškození a dále lze na generaci F₁ hodnotit dominantní mutace. V testech se používají myši a čínští křečci. V případě využití metod molekulární genetiky pro analýzu specifických lokusů na přítomnost mutací není nutné usmrcovat testované zvířata.

Využití: Test je používán k detekci mutagenity chemických látek (Dellarco, 1988; Rinchik a kol., 1993; Ashby a kol., 1996)

Nevýhody: Testované zvířata musejí být v případě klasického postupu usmrceny.

Interpretace výsledků: Pozitivní výsledek, tedy indikuje zvýšení frekvence chromozomálních aberací u testovaných živočichů hovoří o mutagenitě testované látky na pohlavní buňky. Negativní výsledek hovoří o nemutagenním účinku na spermatocyty testovaného živočicha.

Poznámka: Při využití metod molekulární genetiky nemusejí být zvířata usmrcována.

B-9. Test na karcinogenitu - dlouhodobá studie na hlodavcích

Specifikace: Test na karcinogenitu, dlouhodobý.

Citační zdůvodnění: Commission Directive EU (93/638/B.32.), OECD (1993/451), doporučuje US EPA (Mitchell a kol., 1997), NCI (Lewis a kol., 1996), NTP (Benigni, 1997), od roku 1990 více jak 40 citací.

Popis: Detekce karcinogenů u myši nebo krys.

Princip: Test se provádí v průběhu života, kdy jsou u organismu zachovány optimální životní funkce a zvířata se usmrcují po dožití průměrného věku (18-24 měsíců). Test se provádí minimálně na dvou živočišných druzích (někdy pes a primáti). Po nebo během expozice se sleduje vývoj nádorů. Aplikace se provádí většinou orálně. Po usmrcení se provádí detailní histologické vyšetření všech tkání a orgánů. V testech se nejčastěji používají Sprague-Dawleyovy nebo Wistarovy kmeny krys, Dlb-1 nebo BDF myši.

Využití: Některé chemické látky podezřelé na karcinogenitu byly testem na karcinogenitu potvrzeny (Goldsworthy a kol., 1991; Loprieni a kol., 1991; Hayashi, 1991; Ahotupa a kol., 1994; Brooks a kol., 1994; Dobiáš a kol., 1994; Carthew a kol., 1995; Templin a kol., 1996; Sampson a kol., 1997; Zeiger a kol., 1997; Whysner a kol., 1998). Byl také potvrzen klastogenní faktor hrající roli při karcinogenezi (Emerit, 1994).

Výhody: Studie kopíruje skutečný stav při expozici organismu ve vnějších podmínkách.

Nevýhody: Vysoce ekonomicky nákladný test. Extrapolace k člověku je na úrovni varování před možnými karcinogenními účinky sledované látky.

Interpretace výsledků: Pozitivní výsledek testu udává nebezpečí potenciálního karcinogenního působení na lidi, nelze však uzavřít, že látka je ve stejné míře karcinogenní i pro lidi. Negativní výsledek potvrzený nejméně u dvou testovacích druhů může zamítnout nebezpečí karcinogenního působení.

Poznámka: U 522 karcinogenních látek byl test na hlodavcích hodnocen jako velice dobrý k predikci karcinogenity u lidí (Ashby a Paton, 1993). K testům bývají používány i transgenní myši (Shephard a kol., 1994). *In vitro* modely, nahrazující dlouhodobé studie jsou např. heterozygotní myši v thymidin kinásovém lokuse, kdy projev mutace má vysokou korelaci se vznikem lidských tumorů (Hozier a kol., 1992). V poslední době jsou stále častěji používány predikční modely na počítačích (Klopman a Rosenkrantz, 1994; Rosenkrantz a kol., 1991, 1996).

C. Testy na rostlinách

C-1. Test na chromozomové aberace a sesterské chromatidové výměny u *Vicia faba*

Specifikace: Test na chromozomové aberace a specifické změny na DNA (sesterské chromatidové výměny), krátkodobý, skříninkový.

Citační zdůvodnění: Od roku 1990 více jak 80 citací.

Popis: Detekce mutagenních účinků chemických látek a vzorků prostředí.

Princip: Experimenty jsou prováděny na meristematických buňkách naklíčeného primárního kořene. Po aplikaci chemikálie (vodní roztok nebo slabý roztok DMSO) se zastavuje dělení kolchicinem a kořenové špičky jsou použity k hodnocení aberací či SCE. Test na aberace detekuje chromozomové změny. Test SCE deteguje reciproké výměny mezi 2 sesterskými chromatidami replikujících se chromozómů. Využívá se vlastností BtdU, které se inkorporuje do DNA namísto thymidinu a tím mění barvicí vlastnosti chromozomu.

Využití: Test je hojně využívá při detekci chemikálií (Kuglík a kol., 1990; Kanaya, 1990; Zhang a kol., 1991; De Marco a kol., 1992; Michaelis a Rieger, 1993; De Marco a kol., 1995; Gomez-Arroyo a kol., 1995; Miadokova a kol., 1992, 1994, 1996), záření (Vogel a Friebe, 1987) a vzorků prostředí (Grant a kol., 1992a, 1992b; Gill and Sandhu, 1992; Gowrishanker a Vivekanandan, 1994; Sandhu a kol., 1994a, 1994b; Grant, 1994; Ma a kol., 1995; Chroust a kol., 1997)

Výhody: Jednoduchost, rychlost a malé ekonomické náklady.

Nevýhody: Jedná se o rostlinný systém, kde extrapolace k živočichům je slabá.

Interpretace výsledků: Pozitivní výsledky hovoří o klastogenitě sledované látky v případě aberací chromozómů, nebo mitoklastické aktivity v případě poruch dělicího vřeténka. Srovnáním SCE u *Vicia faba* a SCE u lidských lymfocytů pořipadě V79 linie dává nadějný systém pro odhad karcinogenních vlastností chemických látek (Xing a Zhang, 1990; Tiedink a kol., 1991).

C-2. Test genové mutace u na Tradescantia

Specifikace: Test je založen na sledování somatických mutací v tyčinkách trichomů Tradescantia nebo sledování mikrojader, krátkodobý, skříninkový.

Citační zdůvodnění: Od roku 1990 více jak 70 citací.

Popis: Detekce mutagenních účinků chemických látek a hlavně vzorků prostředí *in situ*.

Princip: Testovaná látka se aplikuje na odřezky květních stonků, které se těsně před rozpuštěm květů ponoří do zkoumaného roztoku. K testům se používá diploidního klonu Tradescantia 4430.

Využití: Test je používán ke sledování genotoxicity chemikálií (Ma a kol., 1992a; Helma a kol., 1995; Rank a Nilsen, 1997), záření (Knasmuller a kol., 1992; Haider a kol., 1994; Helma a kol., 1994), vzorků prostředí (Gill a Sandhu, 1992; Baud-Grasset a kol., 1993; Grant, 1994; Sadowska a kol., 1994; Sandhu a kol., 1994a, 1994b; Ma a kol., 1996).

Výhody: Jednoduchost, malé ekonomické náklady, relativně rychlá a přesná detekce mutací, nasazení k testování *in situ*.

Nevýhody: Jedná se o rostlinný systém, kde extrapolace k živočichům slabá.

Interpretace výsledků: Pozitivní výsledky testu naznačují, že látka vyvolává mutace v genotypu tohoto organismu. Negativní výsledky naznačují, že látka mutagenní pro Tradescantia není.

C-3. Test na letální embryonální mutace u *Arabidopsis thaliana* (Müllerův test)

Specifikace: Test na genové mutace (letální embryonální mutace), krátkodobý, skříninkový.

Citační zdůvodnění: od roku 1990 více jak 70 citací.

Popis: Detekce mutagenních účinků chemických látek a vzorků prostředí.

Princip: Testem jsou sledovány recesivní embryonálně letálních a chlorofylově defektních mutací v nezralých semenech rodičovských rostlin budoucí generace. Ti se odlišují stupněm vývinu, barvou i velikostí od normálně se vyvíjejících semen.

Využití: Test je běžně využíván k detekci mutagenní aktivity chemikálií (Gichner a Velemínský, 1987; Gichner a kol., 1993) a hlavně pak k detekci environmentálních vzorků laboratorně i *in situ* (Grant a kol., 1992; Gill a Sandhu, 1992; Grant a Salamane, 1994; Grant, 1994; Gichner a kol., 1994; Sandhu a kol., 1994a; 1994b; Chroust a kol., 1997).

Výhody: Jednoduchost, malé ekonomické náklady, možnost sledovat znečištění prostředí přímo *in situ*.

Nevýhody: Jedná se o rostlinný systém, kde extrapolace k živočichům slabá.

Interpretace výsledků: Pozitivní výsledky testu hovoří o mutagenitě sledované látky na daný rostlinný druh. Negativní o opaku. V případě sledování *in situ* na základě pozitivních výsledků testu je třeba přistoupit k detailnějšímu sledování daných lokalit.

D. Molekulárně-genetické testy ve specifickém lokuse

Jednou z možných cest řešení současné situace vedoucí k celkovému zvýšení výpovědní hodnoty výsledků testů genotoxicity vůči člověku, kdy abundance biologických testů nedává konzistentní výsledky je využívat testy postavené na transgenních organismech. Jak stávající klasické *in vitro* testy, tak modernější *in vivo* testy nejsou dostatečně obecné, aby poskytovaly potřebnou možnost zobecnění z modelových experimentů na přírodní populace či člověka. Takovým způsobem lze pak modelovat funkci lidského organismu u nižších živočichů.

Další nejperspektivnější alternativou je sledování změn DNA prostřednictvím metod molekulární detekce mutací.

D-1. Testy na transgenní organismech

Specifikace: Jedná se o sledování změn na úrovni DNA ve specifických lokusech. Nejčastěji u transgenních hlogavců a drozofil.

Citační zdůvodnění: Doporučeno k používání NTP (Tennant a kol., 1995), NCI (deVries a kol., 1997), od roku 1995 více jak 80.

Popis: Detekce mutagenních účinků chemických látek a vzorků prostředí.

Princip: Transgenní organismy, nesoucí cizorodé geny se sestavují buď na principu vnášení specifického signálního lokusu do testovacího organismu, jehož mutabilita se poté sleduje na přesně definovaném genetickém a fyziologickém pozadí modelu (Shepard a kol., 1995), nebo na způsobu vnášení specifických genů podílejících se na metabolismu xenobiotik do hostitelského organismu a sledování jejich vlivu na mutabilitu markerově vyjádřenou na přesně definovaném genetickém pozadí (Jowett, 1991; Phillips a Venitt, 1995).

Využití: Transgenní myši byly k použity k testování chemických látek (de Vries a kol., 1997; Saranko a Recio, 1998), k odhadu rizika karcinogenů (Taningher a kol., 1997; Schmezer a kol., 1998), k odhadu teratogenů (Wells a kol., 1997), k odhadu vzorků prostředí (Kyrtopoulos a kol., 1997). Psí gen *CYP 1A1* byl testován ve spojení reparačně defektním systémem (*mei-9a*, *mei-41D5*) u transgenní *D. melanogaster* (Komori, 1993). Další chemické látky byly testovány na systému s P450 1A1 (Jowett a kol., 1991), s lidským genem pro GST (Jowett a kol., 1997; Ryšková a kol., 1997; Chroust a kol., 1997).

Výhody: Sledování jak somatických tak i gametických mutací. Možnost tvorby reálného modelu funkce lidských metabolizačních enzymů *in vitro* za současného sledování úrovně reparací a při volbě vhodného promotoru tkáňově či orgánově specifických reakcí. Zvýšení výpovědní hodnoty výsledků testů k člověku.

Nevýhody: Konstrukce transgenních hlogavců a jejich chov je ekonomicky vysoce náročné. U drozofil je to relativně velká fylogenetická vzdálenost od člověka částečně však kompenzovaná transgenozí lidských genů.

Interpretace výsledků: Pozitivní výsledek testu signalizuje, že u transgenních organismů nesoucí určitý typ lidského genu pro metabolizační enzymy došlo k mutaci a že k podobné reakci může dojít i v lidském organismu. Negativní výsledek signalizuje, že transgenních organismů nedošlo k mutaci, ale vznik mutace u člověka vyloučit nelze.

Poznámka: Transgenní drozofily nesoucí lidské geny pro metabolizační enzymy jsou velice nadějným systémem na sledování skutečných interakcí enzym-xenobiotikum v lidském organismu a odhad jejich mutačního potenciálu. V současné době jsou testovány lidské transgeny *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP3A4*, *HADPH-CYP-reduktáza*, *Glutathin S-transferáza* (Chroust, a kol., 1997).

D-2. FISH (Hybridizace fluorescenční *in situ*)

Specifikace: Moderní molekulárně genetická metoda použitelná pro detekci genomových změn všech úrovní organismů.

Citační zdůvodnění: Od roku 1990 více jak 120 citací.

Popis: Detekce mutací indukovaných chemickými látkami nebo vnějším prostředím.

Princip: Při reakci se využívá specifických DNA prob a fluorescenční *in situ* hybridizace. Tato technika umožňuje kombinovat postupy molekulární biologie s klasickými cytogenetickými metodami a definuje genomové změny a jejich důsledky.

Využití: Metoda může být použita pro detekci mutací chromozomových abnormalit (Kirsch-Volders a kol., 1997; Olah a kol., 1997; Souslova a kol., 1997; Šrám, 1997, Xi a kol., 1997), ve specifickém lokuse (Heino a kol., 1995; Rasmuson-Lestander a Ekstrom, 1996), pro odhalení některých dědičných chorob (Nuorva a kol., 1995; Cooper a kol., 1997; Fryssira a kol., 1997; Mark a kol., 1997) a k odhadu poškození DNA způsobené environmentálními faktory (el-Zein a kol., 1997; Conforti-Froes a kol., 1997).

Výhody: Jednoduchost, rychlost, možnost použití u všech druhů organismů na úrovni somatických a gametických buněk.

Nevýhody: Možná nespecifita prob.

D-3. PCR (polymerase chain reaction)

Specifikace: Moderní molekulárně genetická metoda použitelná pro detekci mutací u všech úrovní organismů (Bell, 1991; Cariello, 1991).

Citační zdůvodnění: Doporučeno EU (Carere, 1995), od roku 1995 více jak 850 citací.

Popis: Detekce mutací indukovaných vnějším prostředím, nebo způsobujících různé dědičné choroby a rakovinu

Princip: Při reakci se využívá amplifikace úseku DNA, ohraničeného primery. DNA lze pro analýzu PCR získat z bakterií, živočichů i rostlin. Jedná se tedy o univerzální metodu.

Využití: Metoda může být použita pro detekci mutací ve specifickém lokuse (Fuscoe a kol., 1994; Albrecht a kol., 1997; Rockett a kol., 1997), k analýze mutací v zárodečných buňkách na úrovni jediné alely (Papadopoulus a kol., 1995), k detekci mutací s přesností na jednu bázi pomocí analýzy heteroduplexů (Poggi a kol., 1990; Peeters a kol., 1994; Mashal a kol., 1995), ke kvantitativnímu stanovení rozdílů v expresi mutovaných a standardních genů (Lu a kol., 1993; Gause a Adamovicz, 1994; Celi a kol., 1994; Chehadeh a kol., 1995; Riedy a kol., 1995), pro populační screening (Sakallah a kol., 1994) a detekci genetických defektů na genové i chromozomální úrovni (Pallen a kol., 1992; Patton a kol., 1997). Pomocí PCR, kvantitativního PCR a následných technik, jako je RFLP, pulsní gelová elektroforéza či hybridizace je pak možné získat velmi přesné informace o účinnosti zkoumané látky na DNA, RNA případně mechanismy transkripce a translace, stejně jako srovnat mutagenní či kancerogenní efekt zkoumané látky u různých druhů (Davis, 1991; DeMarini a Fuscoe, 1991; Nicklas a kol., 1991; Curry a kol., 1995; Valentine a Heflich, 1995; Taningher a kol., 1997; Wang a kol., 1997).

Výhody: Jednoduchost, spolehlivost, rychlost, absolutní přesnost, nízké finanční náklady, možnost kvalitativního i kvantitativního porovnání na úrovni somatických i gametických buněk.

Nevýhody: Obtížné získávání materiálu v případě analýzy mutací *de novo* ze somatických buněk.

Interpretace výsledků: Je-li nalezena jakákoliv mutace, znamená to absolutní důkaz o poškození DNA při expozici daného organismu.

Poznámka: PCR byla při detekci mutací použita u Amesovy metody (Shyamala a Ames, 1991), drozofil (Nivard a kol., 1996) a mnoha jiných organismů.

D-4. SSCP (single strand conformation polymorfism)

Specifikace: Rychlá skriningová metoda pro detekci změn v DNA.

Citační zdůvodnění: od roku 1995 více jak 400 citací.

Popis: Detekce mutací indukovaných vnějším prostředím, nebo mutací způsobujících různé dědičné choroby a rakovinu

Princip: Metoda SSCP je založená na principu rozdílné mobility jednořetězcové DNA v případě, že nese různé typy mutací (bodové mutace, substituce, delece). Testovaná DNA nejprve denaturuje, renaturuje a je zviditelněna na polyakrylamidovém gelu.

Využití: SSCP je využívána k detekci mutací vzniklých působením environmentálních faktorů (Wang a kol., 1997;) u lidských chorob jako cystická fibróza (Marigo a kol., 1995), k detekci chorob po mutaci genu p53 u různých typů karcinomů (Navone a kol., 1993; Kusser a kol., 1994; Sarkar a kol., 1995; Carder a kol., 1995; Kawamura a kol., 1995; Preudhomme a kol., 1995; Chakravarty a kol., 1996; Kuczyk a kol., 1996; Johannsson a kol., 1996; Matsushita a kol., 1996; Huang a kol., 1996; Gumerlock a kol., 1997; Hong a kol., 1997) k detekci chorob po mutaci onkogenu K-ras u karcinom slinivky (Rall a kol., 1996) a epiteliárního karcinomu (Rathcke a kol., 1996). SSCP je také používána k analýze mitochondriálního genomu (Jaksch a kol., 1995).

Výhody: Jednoduchost, rychlost, nízké finanční náklady, možnost použití pro všechny organismy na úrovni somatických i gametických buněk.

Nevýhody: Ke sledování je třeba větší množství restričních fragmentů. Bez podrobných předpokusů nelze přesně stanovit typ mutace, ke které došlo.

Interpretace výsledků: Rozdílná mobilita DNA v gelu signalizuje vznik mutace.

Poznámka: Metoda je používána pro detekci dědičných mutací u člověka nebo k detekci indukovaných mutací u *Drosophila melanogaster* (Clark a kol., 1995) a mnoha dalších organismů.

D-5. DGGE (denaturing gradient gel electroforesis)

Specifikace: Rychlá skriningová metoda pro detekci změn v DNA.

Citací zdůvodnění: od roku 1995 více jak 250 citací.

Popis: Detekce mutací indukovaných vnějším prostředím, nebo způsobujících různé dědičné choroby a rakovinu

Princip: DGGE je metoda používaná pro rychlý screening jednoduchých změn (bodových mutací, substitucí, posunu čtecího rámce a delecí do 10 pb) na molekulární úrovni. Základem je rozdílná elektroforetická mobilita dvojřetězcové DNA polyakrylamidovým gelem obsahujícím lineárně se zvyšující koncentraci denaturačních agents (formamid a močovina) (Fodde a Losekoot, 1994). Při migraci DNA fragmentu polyakrylamidovým gelem dosáhnou fragmenty pozice, kde koncentrace denaturačních agents odpovídá teplotě tání (T_m). Teplota tání je definována jako teplota, při které řetězce DNA duplexu jsou polovičně disociovány nebo denaturovány.

Využití: Metoda je využitelná jak při analýze mutací vzniklých jako důsledek environmentálních faktorů (Roth a kol., 1997; Aldudo a kol., 1998; Honda a kol., 1998), tak k analýze jaderného i mitochondriálního genomu (Yoon a kol., 1991) a také při detekci polymorfismu v expresi určitých lidských genů (Nakao, 1996). K detekci bodových mutací u lidských chorob jako PKU (Kozak a kol., 1997), hemofilie (Higuchi a kol., 1991; Tartary a kol., 1993; Chan a kol., 1996), cystická fibróza (Costes a kol., 1993; Messaoud, 1996; Audrezet, 1993; Mercier, 1993;), hypercholesteremie (Lombardi a kol., 1995; Nissen a kol., 1995; Nissen a kol., 1994), beta-thalasemie (Higuchi a kol., 1991; Rosatelli a kol., 1992). Dále k detekci chorob po mutaci genu p53 žaludku (Top a kol., 1995), tlustého střeva (Hamelin a kol., 1993; Renolt a kol., 1993; van den Broek a kol., 1993), u akutní leukemie (Pignon a kol., 1994), adenokarcinomu (Tenti a kol., 1995; Isobe a kol., 1994), karcinomu pancreasu (Pellegata a kol., 1992) a testikulárního karcinomu (Ridanpaa a kol., 1993), K-ras a N-ras u karcinomu žaludku (Husgafvel-Pursiainen a kol., 1995).

Výhody: Rychlost, jednoduchost, universální použitelnost na úrovni somatických i gametických buněk (Clark a kol., 1995).

Nevýhody: Výsledek je pouze orientační vzhledem k přesnému určení typu mutace.

Interpretace výsledků: Rozdílná mobilita signalizuje, že ve sledovaném úseku DNA došlo k mutační změně.

D-6. RFLP (polymorfismus délky restričních fragmetů)

Specifikace: Moderní molekulárně genetická metoda použitelná pro detekci genomových změn všech úrovní organismů.

Citační zdůvodnění: Od roku 1995 více jak 180 citací.

Popis: Detekce mutací indukovaných chemickými látkami nebo vnějším prostředím.

Princip: Při reakci se využívá restričních enzymů ke získání elektroforetického spektra. Odlišnosti elektroforetogramů se vyhodnocují a statisticky se stanovují významnosti rozdílů.

Využití: Metoda bývá využita pro detekci mutací vzniklých působením environmentálních faktorů (Vrieling a kol., 1991; Shields a kol., 1992; Kennerley a Parry, 1994; Yokoi a kol., 1995; Cristaudo a kol., 1997; Grant, 1997; Taningher a kol., 1997; Song a kol., 1997), při odhadu rizika vzniku karcinomů (el-Zein a kol., 1997; Parsons a Heflich, 1997)

Výhody: Jednoduchost, rychlost, univerzálnost použití u všech druhů organismů na úrovni somatických i gametických buněk.

Nevýhody: Jedná se o metodu odhadu, neurčuje specificky typ změny DNA.

Interpretace výsledků: Rozdílnost v elektroforetickém spektru kvantitativně vyjadřuje úroveň expozice organismu a riziko vzniku karcinomu.