

TESTY GENOTOXICITY

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. Jedná se následující přístup:

- *in vivo* studium biologických pochodů (testování genotoxicity) za života organismu
- *in vitro* studium biologických pochodů (testování genotoxicity) mimo živý organismus

KATEGORIE CHEMICKÝCH LÁTEK

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.

- **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 mutagenese či karcinogeneze.

V podmínkách České republiky je třeba zohledňovat ekonomické hlediska použití některých testů, existujících, 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.

TESTY GENOTOXICITY

Používané organizmy:

- bakterie (*S. typhimurium*, *E. coli*, *B. subtilis*, *Proteus miriabilis*)
- kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*)
- rostliny (*Vicia faba*, *Tradescantia*, *Arabidopsis thaliana*)
- bezobratlí (*D. melanogaster*)
- savci (myši, krysy, potkani, králici)
- buněčné kultury (savčí a lidské)
- epidemiologické studie u lidí

Prokaryontní organizmy

Testy na baktériích:

Test na reverzní mutace na *Salmonella typhimurium* (Amesův test)

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

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

Princip: Detekce indukovaných reverzních mutací v histidinovém lokuse u *Salmonella typhimurium*. Deteguje 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 krys S-9) nebo bez metabolizace. OECD doporučuje pro používat pro účely testování minimálně 4 kmeny, t.j. TA1535, TA1537, TA98 a TA100.

Využití: Chemické látky, farmaceutické produkty, kosmetický průmysl, sledování záření, sledování vzorků prostředí 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.

Prokaryontní organizmy

Testy na baktériích:

Muta-ChomoPlate fluktuální verze Amesova testu

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

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

Princip: Fluktuální test se provádí na mikrotitračních destičkách v tekutém médiu s barevným vyhodnocením. 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: Chemické látky, farmaceutické produkty, kosmetický průmysl, sledování záření, sledování vzorků prostředí nebo derivátů cigaretového kouře. 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: 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.