

TESTY GENOTOXICITY NA BAKTERIÍCH

Bakteriální testy genotoxicity jsou poměrně levným a rychlým nástrojem určeným k detekci genotoxického potenciálu látek a faktorů vyskytujících se v životním prostředí. Testy jsou založeny na využití geneticky modifikovaných mikroorganismů, které jsou schopny reagovat na různé skupiny genotoxických látek. Ty indukují u bakterií charakteristickou odpověď, kterou jsme schopni detektovat, například ve formě barevných změn nebo optických signálů.

Mikrobiální testy jsou zpravidla prvním krokem při studiu mutagenních účinků neznámých látek, a to zejména pro relativně nízkou cenu samotných testů a poměrně rychlé získání výsledků. I když výsledky zjištěné bakteriálním testem nelze přímo extrapolovat na vyšší organismy, protože metabolismus mikroorganismů a živočichů je odlišný, mají tyto testy velmi dobrou výpovědní hodnotu a mohou poukazovat na možná rizika pro člověka. Uvádí se, že až z 90 % se vyskytuje shoda mezi výsledky zjištěnými Amesovým testem a výsledky testů prováděných na savcích. Proto, pokud studovaná látka nebo směs látek vykazuje pozitivní výsledek v bakteriálním testu genotoxicity, je brána jako potencionální genotoxikant rovněž pro člověka.

Bakteriální testy genotoxicity

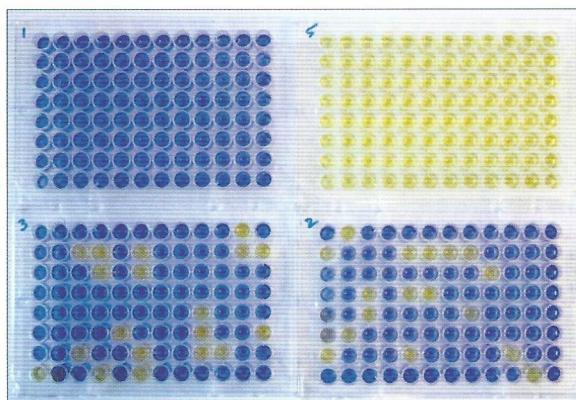
K rozvoji bakteriálních testů genotoxicity došlo v sedmdesátých letech, kdy byl vyvinut první test využívající mikroorganismy kmenne *Salmonella typhimurium*. Šlo o Amesův test. Test je založen na indukci reverzních mutací u salmonel a patří mezi nejznámější a nejpoužívanější testy určené ke screeningu genotoxicity látek. Využívá mutantrních indikátorových kmenů, které v důsledku mutace nerostou v prostředí bez histidinu. Tato amikokyselina je pro bakteriální růst nezbytná, proto je nutné histidin v minimálním množství do Amesova testu externě přidávat. Pokud dojde ke styku indikátorového kmene v testu s mutagenní látkou, dojde k odblokování oblasti kódující biosyntézu histidinu (zpětná mutace), bakterie začnou růst a vytvářet kolonie na půdě bez histidinu. Jestliže se kolonie kmene *Salmonella* na půdě s absencí (minimálním množstvím) histidinu nevytvářejí, znamená to, že testovaná látka není mutagenní.

Genetické úpravy genomu indikátorových kmenů a vnesení plazmidů do jejich buněk umožňují zvyšovat citlivost bakterií k řadě látek, které by nebylo jinak možno detektovat buď vůbec, nebo pouze jako slabé mutageny. Odlišné mutace umožňují zvyšovat citlivost bakterií k testovaným chemickým mutagenům, například delecí *uvrB* oblasti dojde k eliminaci reparačních systémů, přídatné mutace *rfa* a *gal* zase vedou k potlačení syntézy polysacharidového postrannního řetěz-

ce lipopolysacharidové membrány. Zvýšená permeabilita povrchu bakteriální buňky poté usnadňuje průchod testovaných látek do buňky.

Od sedmdesátých let minulého století byla vytvořena řada dalších bakteriálních testů, přesto jen malá část z nich je do dnešní doby normalizována. Jedním z nich je právě Amesův test. Kromě klasické plotnové metody se připravuje i norma pro jeho fluktuační variantu na mikrotitračních destičkách, která je využívána i na našem pracovišti.

V současné době se ustupuje od klasického provedení testů na agarových plotnách a testování látek probíhá v tekutém médiu, které umožňuje lepší kontakt mezi testovanou látkou, buňkami a popřípadě extrakty enzymů (např. S9 mikrosomálních frakcí). Provedení ve zkumavkách a mikrotitračních destičkách umožnilo miniaturizaci testů, a tím i snížení



Obr. 1. Fluktuační varianta Amesova testu

nároků na množství vzorků, médií a enzymů. Další výhoda fluktuačního testu spočívá ve vyhodnocení výsledků. Nedochází k odečítání počtu kolonie tvořících jednotek jako u plotnové metody, ale pouze se opticky hodnotí barevná změna v jednotlivých jamkách titrační destičky, kterou způsobí změna pH roztoků, v jejímž důsledku dojde k zabarvení chromogenu z fialové na žlutou (obr. 1).

S9 mikrosomální frakce

Protože bakterie mají odlišné metabolické dráhy a jiný typ enzymatických systémů, které se podílejí na přeměně xenobiotik (cizorodých látek), je pro lepší extrapolaci výsledků a přiblížení se metabolismu vyšších živočichů nutno do testu exogenně přidávat enzymy obratlovců. Fylogenetická odlišnost mikroorganismů, které jsou využívány v testech genotoxicity, a vyšších organismů, na které jsou výsledky extrapolovány, má tedy vliv na průběh i výsledek změn charakteru testované látky. Proto jsou metabolické změny na úrovni živočichů modelovány metabolickou aktivací látek pomocí tzv. S9 mikrosomální frakce, kde jsou velmi důležité enzymy tzv. cytochromů P450.

Prostřednictvím těchto enzymů dojde k přeměně látek a vzniku metabolitů s mutagenními účinky, které se u látky původní nemusely vyskytovat. Snahou je co nejvíce přiblížit bakteriální testy systémům probíhajícím u živočichů. Enzymy pro bakteriální testy jsou získávány od různých druhů živočichů: myši, krys, psů, prasat, opic atd. V některých studiích je nutné pracovat i s lidskými enzymy.

Většinou se v laboratorní praxi využívají enzymy krys, které patří mezi teplokrevné živočichy. Naším cílem ale bylo co nejvíce přiblížit dopad výskytu mutagenních látek na vodní organismy. Proto jsme se rozhodli využívat enzymů z jater ryb, a to konkrétně pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*).

U ryb jsou dominantní tzv. enzymy cytochromu P450 CYP1A1 a CYP1A3, které se podílejí na biotransformaci xenobiotik, tedy i látek s mutagenními a kancerogenními účinky. U savců včetně člověka se na biotransformaci uplatňují trochu odlišné skupiny, i když

CYP1A1 hraje důležitou roli i v savcích organismu. Enzymy těchto rodin se u ryb soustředují hlavně do buněk hepatopankreatu, ale vyskytují se i v dalších tkáních, kde jsou však v daleko menším množství.

Prostřednictvím enzymů S9 frakce můžeme v testovaném vzorku detektovat polycyklické aromatické uhlovodíky, aflatoxiny, nitrosaminy atd.

Induktory S9 frakce

Pro získání co největšího množství enzymů z jater je nutné organismům aplikovat vhodný induktor, tzn. známou koncentraci toxickej látky, která v těle aktivuje metabolické procesy, jež se snaží tuto látku odbourat. To je spojeno se zvýšenou tvorbou enzymů ze skupiny cytochromů.

V dřívějších letech se ke studiu cytochromů u zvířat často používaly polychlorované bifenylly (PCB), které jsou vysoce toxické, podílejí se na imunosupresi a patří mezi potencionální karcinogeny. Některé z těchto látek, používaných jako induktory, byly v předchozích letech zakázány. Proto bylo snahou nalézt chemické látky, které by měly obdobné účinky jako PCB.

Každý typ induktoru aktivuje jinou skupinu enzymů cytochromu P450. My jsme se zaměřili na nalezení vhodného induktoru pro pstruha duhového, aktivujícího enzymy skupiny CYP1A. Kromě otestování různých induktorů bylo zapotřebí nalézt jeho vhodnou koncentraci a optimální dobu expozice. Tyto faktory mohou výrazně ovlivnit tvorbu enzymů cytochromů P450.

Ověření účinnosti vybraných induktorů na rybách

Z informací získaných z literárních zdrojů se pro ryby jevil jako nevhodnější 2,3,7,8-teatrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) pro svou schopnost aktivovat enzymy CYP1A ve velkém množství. Kromě něj byl u ryb využíván také β -naftoflavon. Další látkou používanou u laboratorních zvířat ke studiu cytochromů byl albendazol. Jeho účinky byly studovány zejména na hlodavcích, několik studií bylo

zaměřeno na sledování jeho vlivu na rybí organismus.

V rámci řešení výzkumného záměru byly prováděny práce, které měly za cíl porovnat účinky výše uvedených induktorů na tvorbu enzymů cytochromů P450 u pstruhů. Vhodné koncentrace zvolených induktorů pro pstruhu duhového a délka jejich expozice byly částečně přejaty ze studií na krysách. Mysely však být upraveny pro vodní prostředí a organismus ryb. Přesto v případě β -naftoflavonu byla podána rybám příliš vysoká dávka látky, která způsobila uhynutí jedné ryby během pokusu, a také ostatní jedinci vykazovali sníženou aktivitu v porovnání s ostatními skupinami ryb injektovanými jinými induktory. Oproti krysám, kterým je induktor podán orálně stravou několikrát během trvání testů, byly ryby v našich pokusech injektovány jednorázově do peritoneální dutiny v oblasti mezi břišní a prsní ploutví (obr. 2). Využit potravu obsahující induktor není u ryb možné kvůli uvolnění látek do vody – ryby by přijaly jen malou část induktoru a zároveň by došlo ke kontaminaci vodního prostředí.

Každý z induktorů byl injektován pokusné skupině, kterou tvořilo 20 jedinců obou polohlaví. Během pokusu byly ryby umístěny po dobu jednoho až dvou dnů v průtočných laminátových žlabech (obr. 3). S výjimkou skupiny injektované β -naftoflavonem nebyly u ostatních skupin ryb zaznamenány změny v chování v porovnání s kontrolní skupinou.

Po uplynutí požadované doby expozice u jednotlivých pokusných skupin ryb byly ryby



Obr. 2. Aplikace induktoru



Obr. 3. Chovné sádky pro ryby



Obr. 4. Odstranění hepatopankreatu pstruhu

usmrceny a jejich hepatopankreas byl použit k přípravě extraktů enzymů (obr. 4).

Kvůli stanovení optimální dávky byly provedeny zkoušky s různými objemy S9 frakce Amesovým fluktuačním testem na mikrotitračních destičkách. Jako výchozí byly zvoleny koncentrace 0,05, 0,1 a 0,5 ml S9 frakce. Kromě extraktů z hepatopankreatu pstruhů byla rovněž testována S9 frakce z jater potkanů, která je komerčně dodávána firmou MP Biomedicals, LLC. Komerčně získané extrakty byly indukovány Aroclorem 1254 ze skupiny PCB. V Amesově testu byly použity kmeny *Salmonella typhimurium* TA 98 a TA 100, které detekují genotoxické látky způsobující zpětné mutace v jejich DNA (tabulka 1).

Z dosavadních výsledků vyplývá, že v nejnižším testovaném objemu S9 frakce (0,05 ml) u kmene *S. typhimurium* TA 98 a TA 100 byla největší aktivita enzymů CYP1A zaznamenána u frakcí získaných komerčně, které byly indukovány PCB. U našich testovaných pokusných skupin ryb byly velmi dobré vý-

Tabulka 1. Testované dávky induktorů pro pstruha duhového

Induktor	Dávka na 250 g váhy ryby	Rozpouštědlo	Doba expozice
TCDD	1,56 ng	DMSO	48 h
alendazol	12,5 mg	slunečnicový olej	24 h
β -naftoflavon	20 mg	slunečnicový olej	24 h

sledky zaznamenány pro TCDD a albendazol. Protože dosavadní pokusy byly prováděny převážně s mutagenem 2-aminoantracenem, měly by následující práce pokračovat na otestování reálných vzorků. V přírodě se látky nevyskytují v čisté formě, ale jsou součástí složitých směsí, které mohou být z chemického hlediska těžko stanovitelné. Látky ve směsi mohou měnit svou povahu, může dojít k aditivním, potenciálním nebo antagonistickým účinkům látek v komplexní směsi. Z těchto důvodů budou další práce zaměřeny na zhodnocení citlivosti získaných frakcí v testech s enviromentálními vzorky.

Závěr

I když každý testovací systém má jinou citlivost k hodnoceným genotoxickým látkám a pozitivní výsledek v bakteriálních testech nelze přímo využít při hodnocení rizik pro vyšší živočichy, má nesmírný význam při získávání prvních představ o nových látkách nebo enviromentálních vzorcích. Tím poukazuje na možná zdravotní rizika některých látek a tvoří určitý předstupeň pro další studium jejich vlastností a potencionálních rizik. Pomáhá při vytvoření lepší představy o výskytu mutagenních látek s přímým i nepřímým účinkem ve vodním prostředí.

Literatura

- Holoubek, I. (2004) Využití testů genotoxicity pro kontrolu kontaminace zemědělských produktů, potravin a vzorků životního prostředí. Vědecký výbor fytopsanitární a životního prostředí, Praha.
- Sezimová, H. (2006) Hodnocení genotoxických účin-
ků kontaminant životního prostředí. VŠB-TU Ostrava.
ISBN 80-248-1041-7.
- Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P. a Frei, E. (1999) Význam lidských cytochromů P450 pro lidské zdraví.
Chem. Listy, 93, 229–237.

Kontakt:

RNDr. Přemysl Soldán, Ph.D., Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v.v.i.,
Macharova 5, 702 00 Ostrava, tel. 594 134 830, e-mail: premysl_soldan@vuv.cz
Jana Badurová, Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v.v.i.,
Macharova 5, 702 00 Ostrava, tel. 594 134 831, e-mail: jana_badurova@vuv.cz