

URČENÍ GENOTOXICITY EXTRAKTŮ OXIDOVANÉ CELULOSY METODIKOU PRO VYSOKOKAPACITNÍ SCREENING

JÁN BOROŇ a PETR KAČER

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5,
166 28 Praha 6 – Dejvice
Petr.Kacer@vscht.cz

Došlo 16.8.16, přijato 18.10.16.

Klíčová slova: genotoxicita, Amesův test, vysokokapacitní screening, High Throughput Screening, HTS

Úvod

Mnohé přírodní a syntetické sloučeniny, obsažené ve farmaceutických a kosmetických přípravcích, nutraceuticích, agrochemikáliích, zdravotnických prostředcích a dalších kompozicích látek, které se v různých formách každodenně dostávají na trh a vstupují do životního prostředí, vyžadují efektivní nástroje pro screening jejich genotoxicity, která je potenciálně spojena s karcinogenitou, případně mutagenitou nebo teratogenitou. Chemické látky, jejichž účinek má bezprostřední poškozující dopad na život buněk, jsou označovány jako cytotoxické, přičemž pokud jsou schopny uvnitř buňky interagovat a poškozovat genom, jsou označovány jako genotoxické. Genotoxicitu je tedy možné vyjádřit jako schopnost látky (přírozené se vyskytující nebo syntetické) způsobovat poškození genetické informace uvnitř buňky. Tento zásah do DNA může vést k mutacím, které následně podporují karcinogenezi, případně mohou dát základ vývoji vrozených vývojových vad. Poškození způsobené genotoxickými látkami mohou zahrnovat přímou interakci s DNA a následně způsobit substituci nukleotidů, posun čtecího rámce (tzv. frameshift mutace), nebo dokonce dvouvláknové zlomy¹. V jiných případech mohou genotoxické látky interagovat s různými proteiny, které se účastní buněčného dělení (mitózy) nebo jsou zodpovědné za stabilizaci chromosomů.

Problematika genotoxicity zasahuje všechna odvětví průmyslu a výzkumu, která nakládají s novými látkami, jako průmysl chemický, farmaceutický, kosmetický, potravinářský, či nové a velmi se rozšiřující odvětví přípravy nových materiálů, zvláště pak z oblasti nanomateriálů². U celé řady existujících, ale i nových průmyslových produktů, byly prokázány genotoxické účinky, které při současné neustále rychle rostoucí incidenci rakovinných onemocnění představují aktuální a kritický problém současné globální společnosti^{3–5}. Navíc celkový screening toxicity a genotoxicity všech komerčně dostupných látek klasickými *in vivo* metodami je ekonomicky velmi náročný⁶.

Vzhledem k obrovskému počtu syntetických látek a výrobků, které jsou generovány jak průmyslem, tak výzkumnými organizacemi, a u nichž nejsou známy informace o genotoxicitě, se globální pozornost vědeckých pracovníků a regulačních orgánů orientuje k vytvoření efektivního nástroje, tj. k vysokokapacitnímu screeningu látek a kompozic. V současné době je nejrozšířenějším testem pro screening genotoxicity Amesův test. Jedná se o relativně známou, rychlou a citlivou *in vitro* metodu vyvinutou pro zjištění, zda studovaná látka má potenciál působit poškození DNA⁷. Tento test je inkorporován do legislativy jako test první volby a často vyžadován regulačními orgány při registraci chemických látek (směrnice REACH). Od doby jeho objevení je známo několik variant, které jsou využívány v průmyslu, ve vědeckých institucích a rovněž i laboratořemi zabývajícími se výše uvedenou registrací po celém světě.

Stěžejním účelem předkládané studie bylo u vybraných látek vznikajících při přípravě buničiny pro medicínské účely porovnat klasické provedení Amesova testu s jeho alternativou, tj. mikrofluktuální metodou jako vhodného nástroje pro HTS a na základě této komparace zjistit genotoxický potenciál předložených vzorků a oba přístupy mezi sebou porovnat.

Experimentální část

Materiál a metody

Kity pro mikrofluktuální metodu (Ames MPFTM 100) byly zakoupeny od výrobce Xenometrix (Švýcarsko). Testovací vzorky poskytla společnost Bioster (ČR), přičemž se jednalo o blíže nespecifikované vzorky oxidované celulosy, určené jako obvazový materiál. Ostatní chemikálie byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (USA).

Příprava vzorků

Vzorky celulosy se lišily způsobem přípravy pro testy genotoxicity a byly připraveny následovně:

Vzorek I: 10 ml voda, 1 g celulosy, 37 °C

Vzorek II: 10 ml propan-2-ol, 1 g celulosy, 37 °C

Vzorek III: 10 ml voda, 1 g celulosy, 50 °C

Vzorek IV: 10 ml propan-2-ol, 1 g celulosy, 50 °C

Amesův test

Amesův test, vyvinutý Brucem Amesem a spol.⁷ v roce 1970, jako relativně rychlá a vysoce citlivá metoda k určení schopnosti látky indukovat poškození DNA, byl původně validován na skupině 300 známých karcinogenů. Do dnešního dne bylo vyvinuto několik modifikací metody za účelem zvýšení její efektivity. Princip testu je postaven na schopnosti látky vyvolat zpětnou mutaci na divoký fenotyp. Test využívá histidin dependentní (His⁻) bakterie *Salmonella typhimurium* v médiu se zbytkovým množstvím histidinu a sledované látky. Histidinu je dostatek jen

na několik málo dělení buňky tak, aby sledovaná látka mohla způsobit zpětnou mutaci. Pokud je látka genotoxická, proběhne zpětná mutace a fenotyp bakterií se změní z dependentní His^- na autotrofní His^+ , což se projeví v nárůstu kolonií na Petriho misce. Metabolismus savčích buněk je imitován metabolickou aktivací zkoumané látky jaterním extraktem z hlodavců (S9)⁸. Testuje se několik koncentrací pro získání komplexní odezvy dávka-odpověď. Analýza závislosti může poskytnout spektrum informací jako: mutagenní potenciál látky, druh způsobené mutace (posun čtecího rámce nebo substituce), minimální cytotoxická koncentrace látky. Nicméně je důležité zohlednit, že míra mutagenity je ovlivňována absorpcí látky buňkami a odlišností v metabolismu látek⁹.

Pro testování většího počtu vzorků byla vyvinuta materiálově úspornější alternativa pod označením mikrofluktuální metoda¹⁰. Při tomto provedení je celý experiment uskutečněn v kapalném médiu a výsledek je vyhodnocován na základě barevné změny jamek v 96 nebo 384 jamkových mikrotitračních destičkách. Princip zůstává zachován, výhoda provedení je ve vyšší kapacitě testu s ohledem na počet testovaných vzorků, výrazně rychlejší provedení a odečítáním výsledků (klasický – inkorporační test vyžaduje několika-hodinové „ruční“ odečítání kolonií, případně za pomoci cenově náročných přístrojů, zatímco u mikrofluktuální metody je odečtení realizováno vizuálně na základě kolorimetrické změny v řádu několika minut na vzorek). K dalším výhodám patří možnost testování vyšších koncentrací látek a menší nároky na množství testované látky. Díky tomuto parametru je mikrofluktuální metoda vhodná pro screening kandidátních léčiv a jejich nečistot, podobně jako jiných látek zejména ve fázi vývoje, u kterých je k dispozici relativní nedostatek testované látky. Z tohoto důvodu je MPF doporučena směrnici ICH M7 pro nečistoty ve farmaceutikách¹¹.

Pro potřeby této studie byl použit kmen *S. typhimurium* TA100. Postup pro klasickou metodu byl zvolen dle OECD 471 (s rozdílem použití kmene TA100 namísto pěti různých kmenů)¹². Pro mikrofluktuální metodu se postup řídil standardním protokolem výrobce, který je ve shodě s OECD 471 (cit.¹²).

Výsledky

V našem pilotním projektu jsme se zabývali komparací Amesova a mikrofluktuálního testu při použití vybraných potenciálně genotoxických látek (antracen, karmínová kyselina, fenantren, furfural, paraldehyd, acetaldehyd a kaprolaktam). Antracen, karmínová kyselina a fenantren tvořili skupinu č. 1 s definovaným genotoxickým profilem (NTP¹³). Látky byly vybrány na základě informací z literatury o jejich aktivitě vzhledem ke kmeni TA100. V druhé skupině byly obsaženy látky (furfural, paraldehyd, acetaldehyd a kaprolaktam), jejichž přítomnost byla očekávána v extraktu vzorku oxidované celulosy.

Tabulka I přehledně shrnuje a porovnává preinkubační metodu (solidní médium na Petriho miskách) a mikrofluktuální test (MPF, Xenometrix, CH) pro jednotlivé látky včetně vzorků oxidované celulosy.

Diskuse

V posledních 2 dekádách významně vzrostla geneze nových chemických látek produkovaných jak průmyslem, tak výzkumnými institucemi, čímž narůstá společenský i regulační požadavek na testování jejich bezpečnosti. V Evropské unii je tento požadavek zastřešen zejména legislativou s akronymem REACH a Agenturou pro chemické látky, v USA v červnu 2016 vešel v platnost tzv. zákon Frank R. Lautenberga o chemické bezpečnosti pro 21. století, který prostřednictvím Agentury pro ochranu životního prostředí (EPA) zásadně zpřísňuje kontrolu toxických látek v USA¹⁴. Vzniká tak požadavek na testování poměrně velkého množství látek, u nichž jsou informace o bezpečnosti buď nedostačující, nebo zejména u nových látek, zcela absentují. Toto množství přirozeně klade i nároky na analytické metodiky, které stávající přístupy nemohou naplnit, resp. je zapotřebí vyvinout nové diagnostické nástroje nebo provést vhodné modifikace umožňující vysokokapacitní screening (HTS, High Throughput Screening).

Pro HTS genotoxicitu se nabízí několik relativně dostupných *in vitro* testů. Amesův test, včetně jeho novějších derivátů, byl podrobněji popsán v kapitole Materiál a metody, části věnující se zvolené metodice. Dalším relativně často používaným systémem, zejména u vzorků z životního prostředí, je tzv. SOS-response, který využívá mechanismu detekce spuštění tzv. SOS-mechanismu buněk, který se spouští při poškození DNA u *Escherichia coli*. Tento test byl taktéž uveden na trh i ve formě mikrofluktuálního testu např.: UmuCTM (Xenometrix, Švýcarsko) a SOS-chromo testTM (EBPI, Kanada), a tudíž je technicky použitelný pro HTS. Jedná se o uživatelsky poměrně jednoduchý a rychlý test, nicméně není legislativně podporován (REACH, OECD), což může být považováno za významnou překážku při širším zavádění pro rutinní testy a akceptaci genotoxických výsledků pro regulační orgány (ECHA, EPA). Podobná situace se nabízí u dvou nově vyvinutých produktů, založených na lidských buněčných liniích, s detekcí GFP nebo luciferasy jako indikace metabolických drah spojovaných s odpovědí buněk na poškození DNA. Tyto testy byly v posledních letech nabídnuty na trh pod označení BlueScreenTM a GreenScreenTM (Gentronix, Velká Británie), nicméně doposud jim chybí stěžejní legislativní zázemí podobně jako v případě systému SOS-response, přičemž je nutné vzít v potaz manipulaci s eukaryotickými buňkami, která může být náročnější než je tomu v případě prokaryotických buněk, což dohromady tvoří kritický nedostatek pro jejich širší použití.

Kromě čistých *in vitro* testů existuje celá řada testů genotoxicity, které lze považovat dle provedení za *in vivo* nebo *in vitro*, jako je např. kometový nebo mikronukleový test. Tyto testy byly taktéž začleněny do právních předpisů, tzv. baterie testů, které se využívají jako doplňkové

Tabulka I

Porovnání preinkubační metody a mikroflukтуаčního testu pro jednotlivé látky včetně vzorků oxidované celulosy

Látka/Vzorek	Preinkubační metodika				Mikroflukтуаční metodika				NTP DB			
	–	–	30 %	10 %	–	–	30 %	10 %	–	–	30 %	10 %
Antracen	-	-	-	w+	-	-	-	w+	-	-	-	eq
Kys. karminová	-	neg	-	-	-	neg	-	-	-	w+	-	-
Fenanthren	-		w+	-	-	-	pos	-	-	-	pos	-
Furfural	eq	neg	eq	eq	eq	neg	eq	eq	eq	neg	eq	eq
Paraldehyd	p	w	neg		p	w	neg	-	p	w	neg	
Acetaldehyd	neg	neg		neg	neg	neg	-	neg	neg	neg		neg
Kaprolaktam	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	-	-	-	-
Vzorek I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	-	-	-	-
Vzorek II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	-	-	-	-
Vzorek III	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	-	-	-	-
Vzorek IV	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	-	-	-	-

neg: negativní, eq: z ang. equivocal tj. nejednoznačné, w+: mírně pozitivní, p: pozitivní, –: bez metabolické aktivace, 10 % a 30 %: koncentrace S9 frakce

k Amesovu testu. Z nejběžnějších *in vivo* testů genotoxicity je možné zmínit „Mouse Lymphoma Assay“ a jedno- nebo více-generační studie, které ovšem nejsou předmětem této publikace, jelikož *in vivo* testy obecně nelze považovat za testy vhodné pro HTS.

Jak již bylo zmíněno v předchozím textu, pro tuto pilotní studii byl vybrán Amesův test a to z několika důvodů. Prvním z nich byla potenciální přenositelnost výsledků při následné registraci zdravotního prostředku v souladu s REACH (test první volby) a metodickým doporučením (OECD 471), tj. v souladu s požadavky EPA a ECHA. Dalším důvodem byla budoucí použitelnost testu pro HTS kandidátních léčiv a jejich nečistot, kterým se naše pracoviště zabývá, přičemž Ames MPF je zahrnut do požadavků EMEA (ICH S2R1, M7 (cit.¹¹)) i Federální agentury pro léčiva (FDA). Dalším kritériem pro výběr tohoto testu bylo jeho relativně jednoduché provedení a rychlost (obzvláště v případě MPF varianty), zejména v porovnání s většinou eukaryotických systémů. V neposlední řadě Ames MPF metoda, jak v porovnání s klasickým – inkorporačním Amesovým testem, tak s ostatními výše jmenovanými testy, splňuje podmínky tzv. „Three Rs“ strategie¹⁵, zahrnuté v evropské směrnici 2010/63 / EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely. Tyto podmínky jsou splněny tím, že nahrazují genotoxické testy *in vivo* (*Replacement*), dle deklarace výrobce, která byla ověřena, snižují spotřebou živočišného materiálu (jaterního extraktu z hlodavců; *Reduction*) a jedná se o kvalitativně vylepšený test (*Refinement*).

Test se v plném rozsahu provádí s pěti kmeny (dle OECD 471), avšak pro účely prvotního skreeningu je možné použití kmenů TA98 a TA100. Pro pilotní studii jsme zvolili kmen TA100, schopný odhalení substitučních mu-

tací. Klasické preinkubační provedení Amesova testu bylo v tomto případě provedeno jen jako porovnávací metodika pro metodiku mikroflukтуаční, která je díky provedení na mikrotitračních destičkách vhodná pro zavedení do vysokokapacitního screeningu látek.

Komparace první skupiny látek tj. antracen, karmínová kyselina a fenanthren (tab. I) vyšla uspokojivě při porovnání výsledků mezi jednotlivými metodikami a NTP databází¹³. Mírné rozdíly se vyskytly mezi metodikami, což mohlo být způsobeno vyšší citlivostí mikroflukтуаční metody (deklarováno výrobcem kitu, Xenometrix, Švýcarsko). Ověření tohoto tvrzení by přirozeně vyžadovalo větší skupiny chemických látek a nebylo předmětem této studie.

Výsledky měření ve druhé skupině látek (furfural, paraldehyd, acetaldehyd a kaprolaktam), jejichž přítomnost byla očekávána v extraktu jednotlivých vzorků, byly podobné uvedeným v NTP databázi. Na základě těchto výsledků bylo možno přistoupit k měření vlastních vzorků oxidované celulosy pro určení jejich genotoxického potenciálu.

U všech vzorků byla očekávána přítomnost paraldehydu, který vykazuje genotoxické vlastnosti v testech bez metabolické aktivace. Veškeré měřené vzorky vykazaly negativní výsledky¹⁶, což bylo pravděpodobně způsobeno přítomností genotoxických látek včetně paraldehydu v koncentraci nižší, než odpovídá prahové koncentraci pro detekci genotoxicity použitými metodami, čímž lze konstatovat, že měřené vzorky extraktů neměly detekovatelný potenciál k substitučním mutacím DNA u TA100. Výsledky tedy prokázaly negativní výsledek u Amesova testu v obou metodikách (s i bez metabolické aktivace frakcí S9) u kmene TA100. Pro praktické vyloučení genotoxických vlastností by musel být test rozšířen o další kmeny

(min. 5 kmenů dle OECD 471), avšak ani negativní výsledky získané u všech kmenů nemusí zcela znamenat, že zkoumanou látku lze prohlásit za negenotoxickou. K tomu je potřeba dle legislativy baterie testů a u všech musí být získán negativní nález. Na druhou stranu, pozitivní nález u Amesova testu je dostatečný důkaz genotoxicity.

Závěr

V rámci pilotní studie jsme vyhodnotili mikroflukuační Ames test s kmenem TA100, který byl porovnán s klasickou inkorporační/preinkubační metodou a výsledky mezinárodní databáze. Tato metoda se ukázala jako vhodná nejen pro spolehlivé měření genotoxicity vzorků oxidované celulosy, ale i pro tzv. HTS, tj. vysokokapacitní screening zejména chemických látek, léčiv a jejich nečistot, který je plánovaný provést následně. Všechny vzorky byly na základě Amesova testu s kmenem TA100 určeny jako negativní a to při i bez použití enzymatické aktivace S9 frakcí.

Použité zkratky

HTS	High throughput screening (vysokokapacitní testování)
REACH	Registrace, Evaluace a Autorizace Chemických látek
EPA	US Environmental Protection Agency
ECHA	European Chemical Agency
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky
FDA	Food and Drug Administration (Federální agentura pro léčiva)
MPF TM	microplate format (mikro-destičkový formát)
GFP	Green fluorescent protein (zelený fluorescenční protein)
3R	Replacement, Reduction, Refinement (náhrada, redukce, zlepšení efektivity)
NTP	National Toxicology Program
DB	Databáze
TA100	Salmonella typhimurium kmen TA100

Tato práce se uskutečnila v rámci Národního programu udržitelnosti (NPU I LO1215) MŠMT – 34870/2013. Autoři by chtěli poděkovat projektu TAČR TA04010838.

LITERATURA

1. US Food and Drug Administration. International Conference on Harmonisation; guidance on S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use; availability. Notice. Fed Regist. 2012;77(110):33748–33749.
2. Bhuyan B. K., Zimmer D. M., Mazurek J. H., Trzos R. J., Harbach P. R., Shu V. S., Johnson M. A.: Cancer Res. 43, 5293 (1983).

3. Brambilla G., Martelli A.: Pharmacol. Res. 600, 1 (2009).
4. Brambilla G., Mattioli F., Robbiano L., Martelli A.: Mutagenesis 27, 387 (2012).
5. Dohnalová L., Dohnal V.: Chem. Listy 109, 444 (2015).
6. Kubincová P., Novák J., Sovadinová I.: Chem. Listy 110, 118 (2016).
7. Ames B. N., Lee F. D., Durston W. E.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 782 (1973).
8. Ames B. N., Durston W. E., Yamasaki E., Lee F. D.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2281 (1973).
9. McMahon R. E., Cline J. C., Thompson C. Z.: Cancer Res. 39, 682 (1979).
10. Bridges B. A.: Arch. Toxicol. 46, 41 (1980).
11. ICH M7 Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk.
12. OECD Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD (Paris) 1997.
13. <https://ntp.niehs.nih.gov/>, staženo 21.7.2016.
14. <https://www.epa.gov/assessing-and-managing-chemicals-under-tsca/frank-r-lautenberg-chemical-safety-21st-century-act> 25.7.2016, staženo 21.7.2016.
15. European parliament and Council of european union: On the protection of animals used for scientific purposes, 2010/63/EU (EU 2010).
16. Januščák J., Václavík J., Šot P., Pecháček J., Vilhanová B., Kuzma M., Kačer P.: Chem. Listy 109, 492 (2015).

J. Boroň and P. Kačer (*University of Chemistry and Technology in Prague, Prague*): **Determining the Genotoxicity of Extracts of Oxidized Cellulose by Methodology for High Throughput Screening**

Countless natural as well as synthetic compounds contained in pharmaceutical and cosmetic products, nutraceuticals, pesticides, medical substances and other compositions are introduced to the market and the environment in various forms every day. This trend requires new effective tools to screen the genotoxicity. Given the vast number of synthetic substances and products generated by industry and research centers, with missing information on their genotoxicity, global attention of the scientific, industrial and regulatory institutions is focused to finding an efficient tool for HTS (High Throughput Screening) of their potentially toxic properties. The main purpose of this study was to compare, for selected substances, the application of the original form of the Ames test with its microplate modification and, using this comparison, to determine the genotoxic potential of the samples applying a newer microfluctuation method as a suitable tool for HTS.