

Ryszard Rolecki, Bogusław Barański

ZASTOSOWANIE TESTU NIEPLANOWEJ SYNTEZY DNA (UDS) W OCENIE GENOTOKSYCZNOŚCI SUBSTANCJI CHEMICZNYCH

Z Zakładu Kancerogenezy Zawodowej IMP Łódź

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. B. Barański

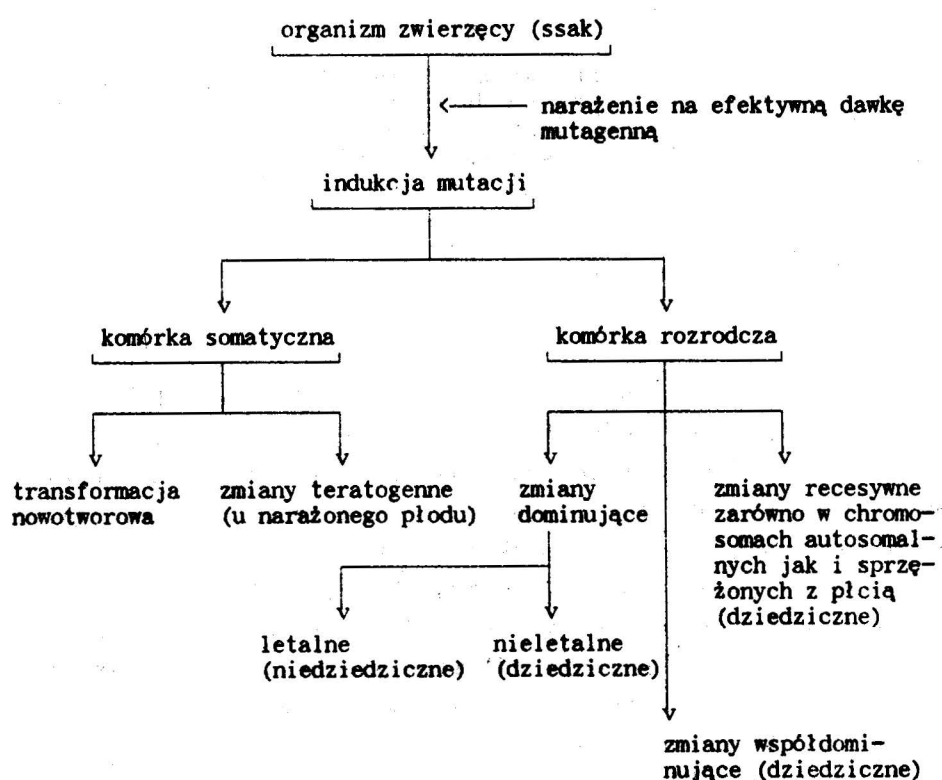
W pracy omówiono ogólnie systemy naprawy DNA i metody oceny efektów genotoksycznych. Spośród metod stosowanych do oceny pierwotnych uszkodzeń DNA szerzej opisano techniki pozwalające oszacować wielkość syntezy nieplanowej DNA (UDS). Podano interpretację wyników otrzymanych przy użyciu testu UDS oraz opisano przykłady praktycznych zastosowań testu UDS.

1. WSTĘP

Wierność i integralność informacji genetycznej (jej nośnikiem jest DNA) jest jednym z podstawowych warunków, od których spełnienia zależy przeżywalność danego organizmu. Trzeba dodać, że zachodzące w toku ewolucji zmiany materiału genetycznego mogą w końcowym rozrachunku okazać się korzystne dla gatunku, umożliwiając mu przetrwanie mimo zmieniających się warunków bytowania. Zachowanie niezmienności informacji genetycznej wymaga nie tylko wyjątkowej dokładności procesu syntezy DNA (replikacji), ale także wydajnych i precyzyjnych mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA. Należy wspomnieć, że uszkodzenia DNA mogą wystąpić zarówno spontanicznie, jak i pod wpływem czynników zewnętrznych, w tym i niektórych związków chemicznych określanych mianem związków genotoksycznych. Jeśli uszkodzenie DNA powstałe w następstwie działania genotoksycznego związku chemicznego nie zostaje usunięte, gdyż mechanizm naprawy (reparacji) DNA jest mało wydajny lub nieprecyzyjny, wówczas zmiana materiału genetycznego może zostać przekazana komórkom potomnym. Taką trwałą zmianę materiału genetycznego określa się mianem mutacji. Uszkodzenie DNA może również przejawiać się śmiercią komórki (organizmu) zwłaszcza wtedy, gdy nastąpiło w sekwencji DNA istotnej dla czynności życiowej komórki. W przypadku nieletalnych uszkodzeń DNA, które zostają przekazane komórkom potomnym, efekt takiej mutacji może mieć charakter transformacji nowotworowej lub zmian teratogennych, jeśli mutacja nastąpiła w komórkach somatycznych płodu [10].

W przypadku zmian mutagennych w gametach lub ich komórkach macierzystych zmiany mogą wystąpić u potomstwa (rys.1). Mutacja w komórkach rozrodczych może ujawnić się natychmiast, gdy jest zmianą dominującą, lub może ulec ekspresji dopiero w następnych pokoleniach w przypadku zmiany recesywnej. Mutacje dominujące

letalne przejawiają się natychmiast efektem letalnym komórek rozrodczych lub obumieraniem zapłodnionego jaja, a więc nie są dziedziczne. Mutacje dominujące nieletalne, chociaż nie powodują śmierci płodu, są przyczyną ciężkich schorzeń rozwojowych potomstwa. Ponieważ ulegają bezpośredniej ekspresji, mogą być zatem wykryte fenotypowo w pierwszym pokoleniu, co umożliwia kontrolę częstości ich występowania. Zmiany o charakterze mutacji recesywnych mogą ujawnić się fenotypowo w dalszych pokoleniach, gdy w następstwie wzrostu liczby tych mutacji w puli genetycznej gatunku wzrasta prawdopodobieństwo powstania organizmu homozygotycznego. Mutacje tego typu stanowią istotny problem genetyczny, gdyż heterozygotyczni nosiciele są fenotypowo normalni i mogą być nie zidentyfikowani. Zmiany o charakterze mutacji współdominujących ujawniają się szybciej niż zmiany recesywne, ale zazwyczaj również nie w pierwszym pokoleniu. Ujawnienie się zmian recesywnych związanych z płcią zależy od płci potomstwa [10].



Rys.1. Możliwe następstwa działania genotoksycznego związków chemicznych na organizm ssaków [wg 10]

Podsumowując: działanie genotoksyczne substancji chemicznych jest powszechnie uznane za potencjalnie szkodliwe dla organizmu. Efekt fenotypowy mutacji może być różnie nasilony lub zamaskowany. Zależy od spełnianej funkcji białka strukturalnego, regulacyjnego lub enzymatycznego, kodowanego przez gen ulegający mutacji w całościowym procesie wzrostu i różnicowania się organizmu. Ze względów biologicznych najbardziej ważne są następstwa mutacji genowych oraz transformacji nowotworowej a znacznie mniejsze znaczenie mają uszkodzenia chromosomów i pierwotne DNA [10]. Podstawą tego rankingu są ich szkodliwe następstwa dla puli genetycznej



gatunku oraz stwierdzenie pozytywnej korelacji między zdolnością danego związku do indukowania mutacji genowych *in vivo* a procesem onkogenezy.

2. SYSTEMY NAPRAWY DNA

W toku ewolucji powstało kilka rodzajów enzymatycznej naprawy DNA, jedynej makrocząsteczki obecnej w organizmach prokariotycznych i eukariotycznych, która posiada zdolność samonaprawy [8, 34]. Ogólną cechą procesów naprawy (reperacji) uszkodzonego DNA jest zdolność do usuwania i odbudowy zmienionego odcinka DNA do postaci wyjściowej, tzn. stanu przed uszkodzeniem. Procesy naprawy DNA są dokonywane przez mniej lub bardziej złożone układy enzymatyczne, których efektywność jest ograniczona i zależy m.in. od liczby i rodzaju uszkodzeń DNA [39].

W organizmie ssaków zidentyfikowano cztery rodzaje mechanizmów naprawy DNA. Są to: naprawa przez wycinanie, naprawa pereplikacyjna, fotoreaktywacja i naprawa SOS. Dwa pierwsze rodzaje są zasadniczymi procesami eliminacji uszkodzonego DNA i jego resyntezy u ludzi i ssaków [10, 12, 34]. Od efektywności tych procesów zależy końcowy efekt działania genotoksycznego związków chemicznych [10].

2.1. Naprawa przez wycinanie

Ten mechanizm naprawy DNA występuje u ssaków i ludzi z wyjątkiem ostatecznie zróżnicowanych rodzajów komórek, np. plemników lub jądrzastych form erytrocytów [12]. Odpowiedzialny jest on za naprawę uszkodzeń dwuniciowego DNA o charakterze modyfikacji (np. alkilacji) zasad azotowych zarówno purynowych, jak i pirymidynowych, pęknięć nici DNA oraz wiązań w obrębie jednego łańcucha DNA, np. dimerów tyminowych [12, 15, 16, 20, 40]. W zależności od wielkości chemicznego uszkodzenia DNA wyróżnia się dwie drogi naprawy DNA [11, 35, 38]:

- 1) poprzez wycinanie zmodyfikowanych zasad (small patch),
- 2) poprzez wycinanie zmienionych nukleotydów (large patch).

W pierwszym etapie – przy współudziale specjalnych białkowych kofaktorów – następuje rozpoznanie uszkodzonego odcinka DNA i udostępnienie go enzymom reperującym. W przypadku naprawy uszkodzenia DNA o charakterze modyfikacji pojedynczej zasady azotowej, np. alkilacji, następuje jej odszczepienie przez właściwą N-glikozylazę. Następnie odpowiednia endonukleaza nacina nić DNA w pobliżu powstałego apurynowego lub apirymidynowego miejsca. Odszczepiony mały odcinek DNA zostaje degradowany od końca 5'P przez swoistą egzonukleazę. Do powstałego końca 3'OH nici DNA w obecności DNA polimerazy i zostają dołączone nukleotydy komplementarne względem drugiej nie zmienionej nici, a połączenie nowo zsyntetyzowanego odcinka DNA z nie zmienionym pozostałym odcinkiem tej samej nici dokonuje się w obecności właściwej ligazy [11, 35]. Podczas naprawy DNA o charakterze modyfikacji kilku kolejnych zasad lub kowalentnych adduktów między zasadami azotowymi a związkiem chemicznym wycięciu przez endonukleazę i następnej degradacji przez egzonukleazę ulega zmieniony fragment nukleotydowy. Powstała luka zostaje, podobnie jak

uprzednio, wypełniona przy współudziale polimerazy i ligazy, a jako matryca służy nie zmieniony odcinek drugiej nici DNA [12]. Naprawa przez wycinanie jest uważana za proces o wysokim stopniu dokładności i zwykle odtwarza w sposób bezbłędny pierwotną sekwencję DNA [12].

2.2. Naprawa poreplikacyjna

W następstwie działania niektórych związków chemicznych, np. dwufunkcyjnych związków alkilujących (np. 8-metoksypsoralenu), powstają trwałe połączenia poprzeczne między komplementarnymi łańcuchami DNA uniemożliwiające normalną replikację DNA, której przebieg wymaga uprzedniego rozdzielenia obu nici DNA [12, 29]. Procesy związane z odblokowaniem syntezy DNA i naprawą uszkodzeń, które powodują jej zahamowanie zachodzą tylko w czasie syntezy DNA i określone są mianem naprawy poreplikacyjnej [10, 12]. Uszkodzenia tego typu nie mogą być usuwane bezpośrednio na drodze naprawy przez wycinanie, gdyż żaden z obu łańcuchów nie może być bezbłędną matrycą dla resyntezy komplementarnego łańcucha. W czasie replikacji DNA polimeraza dochodząc do miejsca z poprzecznym wiązaniem, przestaje polimeryzować i rozpoczyna dalszą polimeryzację w następnym miejscu inicjacji, znajdującym się za poprzecznym wiązaniem. W ten sposób zostaje zsyntetyzowany DNA z lukami [20, 29, 35]. Powstałe luki w DNA zostają wypełnione w procesie rekombinacji zachodzącej między siostrzanymi łańcuchami DNA o tej samej polarności, pochodzącymi z drugiego homologicznego chromosomu. Naprawa poreplikacyjna jest słabo poznana, aczkolwiek wiadomo, że jest złożonym procesem enzymatycznym, który nie zawsze przebiega bezbłędnie, czyli nie zawsze usuwa wszystkie powstałe uszkodzenia DNA, co może przejawiać się zwiększeniem liczby zmian mutacyjnych w komórkach potomnych. Przyjmuje się, że za pomocą tego mechanizmu naprawczego ulegają reperacji także pęknięcia podwójnej nici DNA. Jeśli jednak pęknięcia obu łańcuchów znajdują się blisko siebie, to następuje fragmentacja DNA.

Pozostałe dwa mechanizmy mają mniejsze znaczenie w procesie naprawy DNA u ssaków i ludzi [10]. Najwięcej danych zebrano na temat fotoreaktywacji zwłaszcza zachodzącej u *Escherichia coli* [10, 34].

2.3. Fotoreaktywacja

Pod wpływem UV w DNA bakterii *Escherichia coli* powstają dimery pirymidynowe, których obecność blokuje replikację DNA i może być przyczyną śmierci komórki. W obecności światła widzialnego przy udziale swoistego enzymu fotoliazy następuje zerwanie wiązań kowalencyjnych między połączonymi zasadami pirymidynowymi, wycięcie zmodyfikowanego odcinka łańcucha DNA i odtworzenie pierwotnej struktury DNA [9, 11, 12, 33]. Obecność fotoliazy wykazano w hodowlach limfocytów i fibroblastów ludzi [41, 42]. Panuje pogląd, że znaczenie fotoreaktywacji w procesie reperacji uszkodzeń DNA powstałych w następstwie narażenia na czynniki chemiczne jest niewielkie [10]. Istnieje jednak grupa ludzi, u których stwierdzono wrodzony de-



efekt naprawy DNA o charakterze autosomalnego recesywnego schorzenia tzw. Xeroderma pigmentosum [10, 34, 36, 38]. W fibroblastach lub limfocytach tych ludzi stwierdzono - zróżnicowane pod względem nasilenia - upośledzenie wycinania dimerów pirymidynowych powstałych w łańcuchu DNA pod wpływem promieniowania UV [11, 23, 28, 29, 36]. W następstwie przedłużonego i powtarzalnego narażenia na światło słoneczne u ludzi tych rozwijają się różne schorzenia skóry aż do zmian nowotworowych zdolnych do przerzutów i kończących się śmiercią chorego [10, 34].

2.4. Naprawa SOS

Opisane uprzednio trzy mechanizmy naprawy DNA zachodzą dzięki obecności głównie enzymów konstytutywnych. Natomiast czwarty system naprawy trwałych uszkodzeń DNA zagrażających życiu komórki, stąd nazwa system naprawy lub reperacji SOS, jest indukowany zahamowaniem replikacji DNA i być może obecnością inhibitorów i produktów rozpadu DNA [10]. System ten występuje prawdopodobnie jedynie u organizmów prokariotycznych, np. bakterii, a u ludzi ma niewielkie znaczenie lub praktycznie nie odgrywa znaczącej roli w procesie naprawy DNA [10]. Mechanizm naprawy SOS został najlepiej poznany u *Escherichia coli* [10]. Bierze udział w naprawie uszkodzeń DNA, które nie mogą być szybko reperowane w drodze naprawy przez wycinanie lub naprawy poreplikacyjnej. Sytuacja taka zdarza się, gdy - w następstwie naświetlenia komórek *Escherichia coli* promieniowaniem nadfioletowym - w DNA bakteryjnym powstają liczne dimery pirymidynowe, blokujące replikację DNA. Stan ten indukuje syntezę zmodyfikowanej polimerazy DNA, która replikuje DNA w sposób ciągły, włączając naprzeciw dimerów pirymidynowych dowolne zasady azotowe. W ten sposób replikacja DNA zostaje odblokowana, zwiększa się ilość komórek przeżywających naświetlenie UV, aczkolwiek ten system naprawy DNA sprzyja powstaniu licznych mutacji [10].

3. METODY OCENY EFEKTÓW GENOTOKSYCZNYCH

3.1. Ogólny podział

Ze względu na rodzaj mierzonego efektu genotoksycznego metody te można podzielić na cztery grupy [10]. Metody z pierwszych dwóch grup umożliwiają pomiar uszkodzeń DNA, wywołanych przez związki chemiczne, które przejawiają się w postaci swoistej mutacji genowej, zwanej także punktową (specific locus gene mutation) lub aberracji chromosomowych. Kolejna grupa metod umożliwia pośrednią ocenę działania genotoksycznego poprzez badanie możliwości danej substancji chemicznej do wywołania zmian nowotworowych w komórkach ssaków w warunkach *in vitro*. Badania transformacji nowotworowej zachodzącej pod wpływem związków chemicznych w warunkach *in vitro* są powszechnie uznane za aproksymację zdarzeń, które mogą wystąpić *in vivo* w procesie onkogenezy.

Do czwartej grupy metod należą techniki umożliwiające ocenę pierwotnych uszkodzeń DNA. Są to badania stymulacji naprawy DNA, rekombinacji mitotycznej lub konwersji genowej między homologicznymi albo siostrzanymi chromatydami oraz pomiar pęknięć nici DNA (fragmentacji) [10, 12]. W dalszym ciągu niniejszego opracowania omówiono część metod z tej grupy, a mianowicie metody umożliwiające ocenę włączenia zasad azotowych podczas naprawy DNA przez wycinanie.

3.2. Badanie włączania nowych zasad azotowych

Jak już uprzednio wspomniano, wskutek uszkodzenia DNA przez czynniki chemiczne następuje inicjacja naprawy DNA i resynteza uszkodzonych odcinków łańcucha polinukleotydowego. Proces ten można wykazać w komórkach narażonych na czynnik genotoksyczny, badając włączanie znakowanych nukleotydów, np. trytowanej tymidyny [10, 12, 33, 45]. Synteza naprawcza DNA może wystąpić w każdym okresie cyklu komórkowego. W odróżnieniu od semikonserwatywnej replikacji DNA – syntezy planowej, zachodzącej w fazie S cyklu komórkowego, nazywana jest syntezą nieplanową (unscheduled DNA synthesis) – UDS [12]. W większości komórek, w których zachodzi naprawa DNA przez wycinanie, ilość wymienionego DNA stanowi poniżej 1% całego genomu [12]. Tak nieznaczna ilość może być przeoczona, jeśli jednocześnie wystąpiła replikacja DNA. W celu odróżnienia zachodzącego w czasie naprawy włączania znakowanej tymidyny od jej włączania podczas replikacji stosuje się komórki o niskim indeksie mitotycznym, np. limfocyty, hodowle ustalonych linii komórkowych w fazie plateau [14, 24, 25, 36]. Bardzo przydatne okazały się także pierwotne hodowle hepatocytów [4, 6, 27, 32, 43, 45], w których odsetek replikujących komórek wynosi poniżej 1% [12]. Dodatkowo można stosować blokowanie semikonserwatywnej replikacji DNA przez dodanie hydroksymocznika [24] i hodowlę komórek w środowisku o niskiej zawartości surowicy lub pozbawionym niektórych aminokwasów [2, 12]. Należy jednak rozważyć możliwość interakcji hydroksymocznika z niektórymi ksenobiotykami i wskutek tego zafałszowanie wyników badań [7].

Wykonanie badania UDS można podzielić na kilka etapów. W pierwszym do hodowli określonych komórek (w razie potrzeby z dodatkiem frakcji mikrosomalnej S-9 z wątroby szczura) ze związkiem chemicznym w kilku różnych stężeniach dodaje się znakowaną tymidynę. Dalsze etapy można wykonywać przy zastosowaniu 2. technik – techniki scyntylicyjnej lub audioradiograficznej. W technice scyntylicyjnej dokonuje się ekstrakcji DNA z narażonych komórek i mierzy liczbę rozpadów znakowanej trytem tymidyny na ilość całkowitego DNA oznaczonego spektrofotometrycznie w reakcji z difenylaminą [2, 12, 17, 26, 27]. W metodzie autoradiograficznej narażone komórki (w postaci jednokomórkowej warstwy związanej z podłożem) utrzuca się, pokrywa warstwą emulsji światłoczułej i wybarwia barwnikiem nie maskującym ziaren srebra wytworzonych pod wpływem promieniowania znakowanej tymidyny [27, 31, 39, 45, 46].

Obie te techniki mają swoje zalety i wady. Technika scyntylicyjna jest metodą bardziej czułą i szybszą niż autoradiograficzna, w której ekspozycja autoradiogramu trwa około 2 tygodni. Nie wymaga liczenia ziaren srebra, których obecność może być czasem następstwem artefaktów w metodzie autoradiograficznej. Stwierdzo-



no bowiem znaczące włączanie trytu do cytoplazmy bądź wskutek syntezy mitochondrialnego DNA, bądź w następstwie hydrolizy (zwłaszcza w roztworach ponad 2-tygodniowych) tymidyny i inkorporacji do różnych makrocząsteczek cytoplazmatycznych [27]. Istnieje kilka wad metody scyntylicyjnej [27]:

a) do wykonywania oceny UDS tą metodą wymagane są większe ilości komórek i badanego związku niż w metodzie autoradiograficznej.

b) zdarza się, że barwniki mogą wiązać się z DNA i utrudniać dodatkowo spektrofotometryczne oznaczenie DNA w próbce.

c) ponieważ metoda nie zapewnia oceny morfologicznej komórek (która możliwa jest w metodzie autoradiograficznej) można otrzymać wyniki fałszywie dodatnie w obecności związków, które odblokowując replikację DNA (zahamowaną hydroksymocznikiem) nie zawsze indukują naprawę DNA. W tych warunkach za pomocą metody autoradiograficznej można odróżnić replikację DNA od jego naprawy [27, 45].

4. INTERPRETACJA WYNIKÓW OTRZYMANYCH TESTEM UDS

W metodzie scyntylicyjnej wyniki przedstawia się w postaci liczby rozpadów znakowanej trytem tymidyny na μg DNA $\pm$ odchylenie standardowe dla każdego stężenia badanej substancji chemicznej i porównuje z jednocześnie wykonywaną próbą kontrolną z rozpuszczalnikiem danej substancji. Za wynik pozytywny świadczący o uszkodzeniu DNA przez dany związek chemiczny i indukcji włączania znakowanej trytem tymidyny uznaje się statystycznie znamienny w stosunku do kontroli wzrost liczby rozpadów na μg DNA wprost proporcjonalny do wielkości dawki badanego związku. Dodatkowo jako kontrolę pozytywną wykonuje się próby ze związkami modelowymi o znanym działaniu genotoksycznym. Są to związki, których działanie genotoksyczne przejawia się bezpośrednio, np. MNNG (N-metylo-N-nitro-N-nitrozoguanidyna); 4NQX-(1-tlenek-4-nitrochinoliny) lub po uprzedniej aktywacji metabolicznej, np. benzo(a)piren; aflatoksyna B₁; 3,3'-dichlorobenzidyna [2, 26, 37]. W obecności tych związków powinien wystąpić statystycznie znaczący w stosunku do kontroli wzrost włączania znakowanej tymidyny zależny od dawki stosowanego związku genotoksycznego [2].

W metodzie autoradiograficznej wielkość włączania tymidyny wskutek indukcji naprawy DNA uszkodzonego przez badany ksenobiotyk ocenia się obliczając liczbę wytworzonych ziaren srebra w jądrze komórkowym [10, 31, 43, 46]. Liczbę ziaren srebra zlicza się tylko w jądrze tych komórek, które były żywe w momencie utrwalenia, o czym świadczy obrzmienie jądra, oraz były równomiernie pokryte warstwą emulsji światłoczułej [46]. Nie zlicza się ziaren srebra w komórkach ze zmienioną morfologią, z artefaktami powstałymi w procesie barwienia oraz w jądrach odosobnionych bez otoczki cytoplazmatycznej [27]. Komórki znajdujące się w fazie S posiadają silnie zaczernione jądro i można je łatwo odróżnić od komórek w naprawie. Jednak komórki rozpoczynające lub kończące fazę S oraz te, w których replikacja DNA uległa zahamowaniu przez ksenobiotyk, mogą być błędnie rozpoznane jako komórki znajdujące się w fazie naprawy DNA [39]. Zliczanie ziaren srebra wykonuje się trzykrotnie, za każdym razem w jądrach 20 - 50 przypadkowo wybranych komórek spełniających ww. kryteria. Od liczby ziaren wykrytych w każdym jądrze odejmuje

się wartość odpowiadającego tła cytoplazmatycznego. Wartość tę otrzymuje się przez zliczenie ziaren srebra w trzech obszarach cytoplazmy przyległej do jądra, z których każdy ma powierzchnię równą zajmowanej przez jądro [27, 46]. Liczbę netto ziaren srebra w jądrze (NG) otrzymuje się po odjęciu od liczby ziaren w jądrze średniej wartości tła [31] lub najwyższej znalezionej liczby ziaren odpowiadającego tła, co zapobiega otrzymaniu fałszywie dodatnich wyników [27, 46].

Badany związek chemiczny uważa się za genotoksyczny, zdolny do indukcji UDS, gdy stwierdza się [43]:

- 1) wzrost NG ≥ 6 w stosunku do wartości NG kontroli z rozpuszczalnikiem,
- 2) odsetek jąder z NG ≥ 6 wynosi powyżej 10% w stosunku do kontroli z rozpuszczalnikiem,
- 3) odsetek jąder z NG ≥ 20 stanowi lub przekracza 2% liczby badanych jąder.

W zasadzie spełnieniu pierwszego warunku towarzyszy wypełnienie dwóch pozostałych. Spełnienie tylko drugiego lub trzeciego warunku również wskazuje na efekt genotoksyczny związku w teście UDS. Opisane efekty winny wykazywać zależność od wielkości dawki ksenobiotyku i wystąpić przy dwóch kolejnych stężeniach związku [43]. Jeśli w równolegle wykonanej próbie kontrolnej z rozpuszczalnikiem wielkość NG wynosi 6 lub jeżeli 1% komórek zawiera jądra z 20 ziarnami srebra netto, wówczas wynik należy uznać za błędny i odrzucić. Jeżeli początkowo stwierdza się wzrost UDS wyrażony liczbą ziaren srebra (NG) w jądrze i następnie jego obniżenie do wartości bliskich zera w kolejnych wyższych stężeniach, przy których stwierdza się cechy cytotoxycznosci, to należy przyjąć, że związek ma działanie genotoksyczne. W sytuacji, gdy stwierdza się odosobnione pojedyncze przypadki wzrostu UDS w dawkach znacznie niższych od toksycznych, wynik ten należy uznać za błędny. Jeśli przy stosowanych maksymalnych dawkach brak jest oznak cytotoxycznosci, próbę należy powtórzyć ze związkiem w wyższym stężeniu. Związek jest nieaktywny w teście UDS, jeśli nie powoduje zwiększenia liczby ziaren srebra (NG) w jądrze komórkowym lub stosowane dawki działają cytotoxycycznie [43].

Wartości NG kontroli pozytywnej nie należy stosować jako odnośnika ilościowego względem wartości NG indukowanej przez badany związek, która prawdopodobnie jest bardziej zależna od rodzaju powstałego uszkodzenia DNA i działającego mechanizmu naprawy niż od potencjalnej siły działania mutagennego lub kancerogennego danego związku [43]. Niektóre formy uszkodzenia DNA mogą być bowiem reperowane bez włączania nowych zasad. Kontrola pozytywna jest stosowana do wykazania, że dana hodowla komórkowa jest właściwa i wrażliwa, a stosowana metodyka odpowiednia do wykrycia UDS [43].

5. PRZYKŁADY PRAKTYCZNYCH ZASTOSOWAŃ TESTU UDS

Z analizy piśmiennictwa wynika, że test UDS stosowany jest do:

- 1) oceny działania mutagennego i potencjalnie kancerogennego substancji oraz mieszanin chemicznych [2, 9, 10, 12, 26, 30, 33, 37, 43 - 46],
- 2) identyfikacji działania narządowego genotoksycznych związków chemicznych [3, 27, 39],



3) detekcji inhibitorów naprawy DNA [39].

4) wykrywania osobników z upośledzeniem naprawy DNA [15, 23, 28, 34, 36, 42].

Wykrycie naprawy DNA po narażeniu na związek chemiczny jest dowodem, że związek chemiczny powoduje uszkodzenie pierwotne DNA, które może być zreperowane. Jednak niektóre rodzaje uszkodzeń DNA nie są wykrywane za pomocą testu UDS. Są to [21, 45]:

1) bezpośrednie rozerwanie pojedynczej lub podwójnej nici DNA,

2) uszkodzenie nietrwałe, przejawiające się pęknięciem nici w środowisku zasadowym,

3) niektóre rodzaje adduktów nie indukujących naprawy przez wycinanie,

4) uszkodzenie przez typowe związki interkalacyjne,

5) addukty usuwane w reakcji demetylacji.

Odpowiedź na pytanie, w jakim stopniu indukcja naprawy DNA przez ksenobiotyki może być wskaźnikiem jego działania mutagennego lub potencjalnie kancerogennego jest złożona i nie zawsze w pełni jednoznaczna. Wielkość naprawy DNA indukowana przez czynnik chemiczny zależy bowiem m.in. od [11]:

1) rodzaju i rozmiaru reakcji z DNA np: ogólnej liczby uszkodzonych zasad, wytworzenia adduktów itp,

2) względnego stosunku liczby miejsc reperowanych w drodze naprawy przez wycinanie do ogólnej liczby uszkodzeń DNA,

3) kinetyki naprawy jako funkcji czasu i dawki,

4) charakteru i nasilenia modyfikacji innych miejsc np: białek.

Badania wzajemnych relacji między uszkodzeniem DNA a naprawą przez wycinanie, replikacją lub mutagenezą muszą uwzględnić rozmaity charakter jakościowy i ilościowy uszkodzeń powodujących mutacje oraz sposób naprawy [11]. Wyniki doświadczalne licznych prac wskazują na przydatność badania UDS jako testu prognostycznego dla związków podejrzanych o działanie kancerogenne [39]. Porównanie zdolności indukcji UDS przez związki chemiczne i ich izomery oraz pochodne o zróżnicowanej sile działania kancerogennego wykazało pozytywną korelację między wielkością indukcji UDS a siłą ich działania kancerogennego [39]. Korelację stwierdzono także badając indukcję i nasilenie UDS przez bezpośrednio kancerogeny oraz ich najbliższe pochodne formy o działaniu prokancerogenym. Indukcję UDS obserwowano przy niższym stężeniu kancerogenu bezpośredniego niż jego prokancerogenów [39]. Pod wpływem metali ciężkich i hydrazyn wykazano indukcję UDS w hodowlach komórek ssaków [33]. Działanie mutagenne tych czynników było trudne do wykazania za pomocą testów bakteryjnych ze względu na obecność znacznej aktywności katalazy w bakteriach [33]. Wiele prac doświadczalnych, w których stwierdzono pozytywną korelację między działaniem kancerogennym związków chemicznych a ich zdolnością do indukcji UDS było wykonanych z użyciem silnych kancerogenów [45]. Zagadnienie to komplikuje się przy ocenie zdolności indukcji UDS przez związki mutagenne o słabszej sile działania lub epigenetycznym mechanizmie onkogenezy [2, 5, 13, 17, 22, 26, 31, 46], dla których ocena działania mutagennego tych związków wykonana na szczepach *Salmonella typhimurium* jest często rozbieżna lub negatywna [1]. Badania naprawy DNA wykonane na komórkach linii HeLa i pierwotnych hodowlach hepatocytów szczura po narażeniu na 8 kancerogenów: heksametylofosforamid - HMPA; o-toluidynę-TOL; safrol-SAF; dietylostilboestrol-DES; benzen-BEN; akrylonitryl-ACN; dietyloheksyloftalan-DEHP; fenobarbital-PB i 2 związki niekancerogenne -

kaprolaktam (CAP) i benzoinę (ZOIN) wykazały wzrost UDS tylko po narażeniu na HMPA, TOL i SAF [2, 5, 13, 17, 22, 26, 31, 46]. Stwierdzono również zaskakująco niską czułość metody autoradiograficznej badania UDS w porównaniu ze scyntylicyjną. Za pomocą tej metody (autoradiograficznej) indukcję UDS wykryto po narażeniu na HMPA [1, 45]. W przypadku tych związków większą wrażliwość detekcji uszkodzenia DNA stwierdzono za pomocą badania fragmentacji DNA niż testu UDS. Za pomocą badania fragmentacji DNA uszkodzenie DNA stwierdzono po narażeniu na 5 związków - TOL, BEN, SAF, ACN i DES [1, 45]. Wyniki tych prac sugerują rolę badań naprawy DNA indukowanej przez ksenobiotyki w proponowanej baterii testów służących do oceny działania genotoksycznego. Wnioskuje się, że wyniki badań UDS uzyskane metodą autoradiograficzną będą mało przydatne w roli badań uzupełniających dla związków chemicznych, które nie wykazały działania mutagennego w testach bakteryjnych ze szczepami *Salmonella typhimurium*. Mogą jednak mieć znaczenie jako dodatkowe badania potwierdzające dla związków, które były mutagenne w teście Amesa. Istnieje pogląd, że wyniki uzupełniające dla związków niemutagennych w testach z *Salmonella typhimurium* winny być uzyskane raczej za pomocą badania fragmentacji DNA lub testu UDS wykonanego techniką scyntylicyjną [1].

Ostatnio szczególną uwagę poświęca się możliwości wykorzystania testu UDS do oceny działania genotoksycznego w warunkach *in vivo* ze względu na niewielką liczbę testów pozwalających dokonać takiej oceny [39]. Zastosowanie testu mikrojądrowego, jak również badanie aberracji chromosomowych jest ograniczone praktycznie do tkanek lub komórek o częstym podziale komórkowym, takich jak szpik kostny, fibroblasty itd. [1, 18, 19, 39]. Testy "pośredniego gospodarza" również posiadają swoje ograniczenia, gdyż bakterie znajdują się na zewnątrz komórek gospodarza. Oprócz silnych kancerogenów, jedynie prokancerogeny, które ulegają aktywacji w komórce ssaków i następnie przenikają do środowiska zewnętrznego, w którym znajdują się organizmy wskaźnikowe np. bakterie mogą wykazywać działanie mutagenne [21, 39].

Badanie UDS w limfocytach krwi obwodowej wydaje się użytecznym wskaźnikiem dla monitoringu biologicznego ludzi narażonych na obecne w środowisku czynniki genotoksyczne [39]. Istnieją doniesienia, że badanie UDS w limfocytach ludzi może być również przydatne do identyfikacji ludzi z wrodzonymi zaburzeniami naprawy DNA [34, 39].

PIŚMIENNICTWO

1. Ashby J. i in.: Overview and conclusion of the IPCS collaborative study on *in vitro* assay systems. *Prog Mutat Res* 1985, 5, 117 - 174
2. Barrett R.M.: Assays for unscheduled synthesis in HeLa S3 cells. *Prog Mutat Res* 1985, 5, 347 - 352
3. Beikirch M.: Induction of unscheduled DNA synthesis by chemical mutagens in testicular cells of the mouse *in vitro*. *Arch Toxicol* 1977, 37, 195 - 201
4. Bradlaw J.A. i in.: Evaluation of purified 4-deoxynivalenol (vomitoxin) for unscheduled DNA synthesis in the primary rat hepatocyte - DNA repair assay. *Food Chem Toxic* 1985, 23(12), 1063 - 1067



5. Bradley M.O.: Measurement of DNA single-strand breaks by alkaline elution in rat hepatocytes. *Prog Mutat Res* 1985, 5, 353 - 357
6. Bradley M.O., Sina J.F.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the alkaline elution (rat hepatocyte assay). W: Handbook of mutagenicity test procedures. Wyd. II. Eds. Kilbey B.J. i in. Amsterdam, Elsevier 1984, 71 - 83
7. Brandt W.N., Flamm W.G., Bernheim N.J.: The value of hydroxyurea in assessing repair synthesis of DNA in HeLa cells. *Chem Biol Interact* 1972, 5, 327 - 339
8. Bridges B.: Evaluation of mutagenicity and carcinogenicity using a three-tier system. *Mutat Res* 1976, 41, 71 - 72
9. Brown H.S., Jeffrey A.M., Weinstein B.: Formation of DNA adducts in 10 T½ mouse embryo fibroblasts incubated with benzo(a)pyrene or dihydrodiol oxide derivatives. *Cancer Res* 1979, 39, 1673 - 1677
10. Brusick D.: Principles of genetic toxicology. Plenum Press, New York, London 1980
11. Cleaver J.E.: Repair processes for photochemical damage in mammalian cells. In: Advances in radiation biology. Eds. J.T. Lett i in. Vol. 4. Acad. Press, New York, 1 - 75
12. Cleaver J.E.: Methods for studying excision repair of eukaryotic DNA damaged by physical and chemical mutagens. *wg.* [27] s. 33 - 71
13. Douglas G.R. i in.: Alkaline sucrose sedimentation, sister-chromatid exchange and micronucleus assay in CHO cells. *Prog Mutat Res* 1985, 5, 359 - 366
14. Evans R.S., Norman A.: Unscheduled incorporation of thymidine in ultraviolet-irradiated human lymphocytes. *Radiat Res* 1968, 36, 287 - 289
15. Fujiwara Y., Tatsumi M.: Repair of mitomycin C damage to DNA in mammalian cells and its impairment in Fanconi's anemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1975, 66, 592
16. Fujiwara Y., Tatsumi M., Sasaki M.S.: Crosslink repair in human cells and its possible defects in Fanconi's anemia cells. *J Mol Biol* 1977, 113, 635 - 650
17. Glauert H.P. i in.: Assays to measure induction of unscheduled DNA synthesis in cultured hepatocytes. *Prog Mutat Res* 1985, 5, 371 - 373
18. Heddle J.A.: A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat Res* 1973, 18, 187 - 190
19. Heddle J.A., Stuart E., Salamone M.F.: The bone marrow micronucleus test. *wg.* [27], 441 - 459
20. Kaye J., Smith C.A., Hanawalt P.C.: DNA repair in human cells containing photoadducts of 8-methoxypsoralen or angelicin. *Cancer Res* 1980, 40, 696 - 702
21. Kilbey B.J. i in.: Handbook of mutagenicity test procedures. Wyd. VI. Elsevier, Amsterdam 1984
22. Lakhnisky Th., Hendrick B.: Induction of DNA single - strand breaks in CHO cells in culture. *Prog Mutat Res* 1985, 5, 367 - 370
23. Lehman A. i in.: Repair of ultraviolet light damage in a variety of human fibroblast cell strains. *Cancer Res* 1977, 37, 904
24. Lieberman M.W., Sell S., Farber E.: Deoxyribonucleoside incorporation and the role of hydroxyurea in a model lymphocyte system for studying DNA repair in carcinogenesis. *Cancer Res* 1971, 31, 1307 - 1312



25. Lieberman M.W., Poirier M.C.: Deoxyribonucleoside incorporation during DNA repair of carcinogen induced damage in human diploid fibroblasts. *Cancer Res* 1973, 33, 2097 - 2103
26. Martin C.N., Campbell J.: Tests for induction of unscheduled DNA repair synthesis in HeLa cells. *Prog Mutat Res* 1985, 5, 375 - 379
27. Mitchell A.D., Mirsalis J.C.: Unscheduled DNA synthesis as an indicator of genotoxic exposure w Single-cell mutation monitoring systems. A.A. Ansari and F.J. de Serres (eds.). Plenum Press, New York, 1984, 165 - 216
28. Mortelmans K. i in.: Photoreactivation of thymine dimers in UV irradiated human cells. Unique dependence on culture conditions. *Mutat Res* 1977, 44, 433 - 446
29. Park S.D., Cleaver J.E.: Post-replication repair: Questions of its definition and possible alterations in Xeroderma pigmentosum cell strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, 76, 3927 - 3931
30. Probst G.S. i in.: Chemically-induced unscheduled DNA synthesis in primary rat hepatocyte culture: A comparison with bacterial mutagenicity using 218 compounds. *Environ Mutagen* 1981, 3, 11 - 32
31. Probst G.S., Hill L.E.: Tests for the induction of DNA-repair synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Prog Mutat Res* 1985, 5, 381 - 386
32. Probst G.S., Hill L.E.: Influence of age, sex and strain on the in vitro induction of unscheduled DNA synthesis in rat hepatocyte primary cultures. *Cell Biol Tox* 1987, 3(2), 113 - 125
33. Rasmussen R.E., Painter R.B.: Radiation - stimulated DNA synthesis in cultured mammalian cells. *J Cell Biol* 1966, 29, 11 - 19
34. Rasmussen R.E.: Repair of chemical carcinogen-induced lesions. In: Genetic differences in chemical carcinogens. CRC Press, Florida 1980, 68 - 84
35. Regan J.D., Setlow R.B.: Two forms of repair in the DNA of human cells damaged by chemical carcinogens and mutagens. *Cancer Res* 1974, 34, 3318 - 3325
36. Robbins J.H., Kraemer K.H.: Abnormal rate and duration of ultraviolet-induced thymidine incorporation into lymphocytes from patients with xeroderma pigmentosum and associated neurological complications. *Mutat Res* 1972, 15, 92 - 97
37. Singer B.: Sites in nucleic acids reacting with alkylating agents of differing carcinogenicity or mutagenicity. *J Toxicol Environ Health* 1977, 2, 1279 - 1295
38. Snyder R.D., Regan J.D.: DNA repair in normal human and xeroderma pigmentosum group A fibroblasts following treatment with various methanesulfonates and a demonstration of a long-patch (U.V-like) repair component. *Carcinogenesis* 1982, 3, 7 - 14
39. Stich H.F., San R.H.C., Freeman H.J.: DNA repair synthesis (UDS) as an in vitro and in vivo bioassay to detect precarcinogens, ultimate carcinogens and organotropic carcinogens. In: A.A. Ansari and F. de Serres (eds). Single-cell mutation monitoring systems. Plenum, New York 1984, 65 - 82
40. Strauss B.S., Karran P., Higgins N.P.: Alkylation damage and DNA excision repair in mammalian cells. *J Toxicol Environ Health* 1977, 2, 1395 - 1414
41. Sutherland B.M.: Photoreactivating enzyme from human leukocytes. *Nature* 1974, 248, 109 - 112



42. Sutherland B.M., Rice M., Wagner E.K.: Xeroderma pigmentosum cells contain low levels of photoreactivating enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 1975, 72, 103 - 107

43. Williams G.M.: Detection of chemical carcinogens by unscheduled DNA synthesis in rat liver primary cell cultures. Cancer Res 1977, 37, 1845 - 1851

44. Williams G.M.: Further improvements in the hepatocyte DNA repair test for carcinogens: detection of carcinogenic biphenyl derivatives. Cancer Lett 1978, 4, 69 - 75

45. Williams G.M. i in.: Summary report on the performance of the assays for DNA damage. Prog Mutat Res 1985, 5, 59 - 67

46. Williams G.M., Tong C., Ved Brat S.: Tests with the rat hepatocyte primary culture/DNA repair test. Prog Mutat Res 1985, 5, 341 - 345

R. Rolecki, B. Barański

APPLICATION OF UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS (UDS) TEST TO EVALUATE GENOTOXICITY OF CHEMICAL SUBSTANCES

Summary

This work contains a general discussion on DNA repair systems and on the methods of evaluating the genotoxic effects. Among the methods used to evaluate primary DNA defects, the methods allowing estimation of UDS magnitude have been described in more detail. Interpretation of the UDS test results has been presented as well as the examples of practical applications of the UDS test.

