

## **B.18. USZKODZENIE I NAPRAWA DNA - NIEPLANOWA SYNTEZA DNA - BADANIE NA KOMÓRKACH SSAKÓW *IN VITRO***

### **1. METODA**

#### **1.1. Wstęp**

Zamieszczono we Wstępie Ogólnym Części B.

#### **1.2. Definicje**

Zamieszczono we Wstępie Ogólnym Części B.

#### **1.3. Substancje kontrolne**

Nie są stosowane.

#### **1.4. Zasada badania**

Test nieplanowej syntezy DNA (UDS) służy do oceny syntezy naprawczej DNA po wycięciu i usunięciu odcinka DNA zawierającego obszar uszkodzony przez czynniki chemiczne lub fizyczne. Badanie opiera się na pomiarze wbudowywania znakowanej trytem tymidyny ( $^3\text{H-TdR}$ ) do DNA komórek ssaków, niebędących w fazie S cyklu komórkowego. Ilość wbudowanej  $^3\text{H-TdR}$  może być określana metodą autoradiograficznego i scyntylicyjnego (LSC) pomiaru DNA wyizolowanego z komórek poddanych działaniu związku. Komórki ssaków w hodowli, o ile nie są to hepatocyty szczura z pierwotnej hodowli, są poddawane działaniu czynnika badanego w obecności lub bez egzogenego układu aktywacji metabolicznej. Test nieplanowej syntezy DNA może być również wykonany *in vivo*.

#### **1.5. Kryteria wiarygodności badań**

Nie są stosowane.

#### **1.6. Opis metody badawczej**

##### **1.6.1. Przygotowanie**

Substancje badane i kontrolne powinny być przygotowane w medium hodowlanym, rozpuszczone albo zawieszone w odpowiednim nośniku i dopiero później rozcieńczzone w medium hodowlanym w celu użycia ich do badania. Końcowe stężenie nośnika nie powinno wpływać na żywotność komórek.

W badaniu mogą być stosowane pierwotne hodowle hepatocytów szczura, limfocyty ludzkie lub określone linie komórkowe (np. diploidalne fibroblasty ludzkie).

Komórki powinny być ekspozowane na badaną substancję chemiczną zarówno z odpowiednim układem aktywacji metabolicznej, jak i bez niego.

##### **1.6.2. Warunki badania**

###### **Liczba hodowli**

Do określenia UDS metodą autoradiograficzną w każdym eksperymencie konieczne są przynajmniej dwie hodowle komórek, a sześć hodowli (lub mniej, jeśli jest to naukowo uzasadnione) do określenia UDS za pomocą licznika scyntylicyjnego.

##### **1.6.3. Stosowanie kontroli ujemnej i dodatniej**

Równolegle w każdym eksperymencie powinny być przeprowadzone badania kontrolne (kontrola dodatnia i kontrola ujemna tzn. komórki niepoddane działaniu żadnego związku i/lub z nośnikiem) z metabolicznym układem aktywującym i bez niego.

Przykładami substancji wykorzystywanych w badaniach kontrolnych dodatnich w teście na hepatocytach szczura są 7,12-dimetylobenzantracen lub 2-acetyloaminofluoren. W przypadku określonych linii komórkowych, przykładem substancji wykorzystywanej w kontroli dodatniej jest tlenek N-4-nitrochinoliny zarówno do oceny

autoradiograficznej, jak i scyntylicyjnej prowadzonej bez aktywacji metabolicznej; natomiast do badania w obecności układów aktywacji metabolicznej jako kontrolę pozytywną stosuje się N-dimetylnitrozoaminę.

#### 1.6.4. Stężenia substancji w czasie ekspozycji

W celu określenia dokładnej reakcji, w badaniu powinno stosować się wiele stężeń substancji badanej, w niezbędnym zakresie. Najwyższe stężenie powinno wywoływać niewielkie efekty cytotoksyczne. Związki stosunkowo słabo rozpuszczalne w wodzie powinny być badane w stężeniach, aż do osiągnięcia ich rozpuszczalności. Dla związków nietoksycznych, łatwo rozpuszczalnych w wodzie, górne stężenie badanej substancji powinno być określone w zależności od potrzeb.

#### 1.6.5. Komórki

Do utrzymywania hodowli powinny być stosowane odpowiednie media hodowlane, stężenie CO<sub>2</sub>, temperatura i wilgotność. Ustalone linie komórkowe powinny być okresowo sprawdzane, czy nie są zakażone *Mycoplasma*.

#### 1.6.6. Aktywacja metaboliczna

Do pierwotnej hodowli hepatocytów nie stosuje się układu metabolicznej aktywacji. Ustalone linie komórkowe i limfocyty są ekspozowane na badaną substancję zarówno w obecności, jak i bez odpowiedniego układu aktywacji metabolicznej.

#### 1.6.7. Opis postępowania

##### 1.6.7.1. Przygotowanie hodowli

Ustalone linie komórkowe otrzymane z hodowli podstawowych (np. przez trypsynizację lub wytrząsanie) wysiewa się w odpowiedniej gęstości w naczyniach hodowlanych i inkubuje w 37°C.

Krótkoterminowe hodowle hepatocytów szczura są zakładane ze świeżo wyizolowanych hepatocytów, w odpowiednim medium w celu przyczepienia się ich do podłoża hodowlanego.

Hodowle limfocytów ludzkich są zakładane przy użyciu odpowiednich technik.

##### 1.6.7.2. Wykonanie badania

Pierwotna hodowla hepatocytów szczura.

Świeżo wyizolowane hepatocyty szczura są ekspozowane na badaną substancję w medium zawierającym <sup>3</sup>H-TdR przez odpowiednio długi czas. Po zakończeniu okresu działania, medium powinno być ściągnięte z nad komórek, następnie komórki powinny być przemyte, utrwalone i umieszczone na szkiełkach podstawowych oraz wysuszone. Preparaty komórek na szkiełkach podstawowych powinny być pokryte emulsją autoradiograficzną (może być stosowana inna odpowiednia emulsja światłoczuła), następnie ekspozowane, wywołane, odpowiednio zabarwione i policzone.

Ustalone linie komórkowe i limfocyty.

*Techniki autoradiograficzne:* Hodowle komórek są ekspozowane na badaną substancję przez odpowiednio długi czas, następnie poddawane działaniu <sup>3</sup>H-TdR. Czas narażenia komórek jest uzależniony od rodzaju substancji, aktywności układów metabolicznych i typu komórek. W celu wykrycia szczytu UDS, <sup>3</sup>H-TdR powinna być dodawana równocześnie z badaną substancją lub w ciągu kilku minut po ekspozycji na badaną substancję. Wybór jednej z tych dwóch procedur będzie zależał od interakcji pomiędzy badaną substancją i <sup>3</sup>H-TdR. W celu rozróżnienia (oddzielenia) UDS od semikonserwatywnej replikacji DNA, należy zahamować replikację DNA, na przykład przez stosowanie medium bez argininy lub o niskiej zawartości surowicy albo stosowanie w medium hodowlanym hydroksymocznika.

*Pomiary UDS za pomocą LSC:* Przed ekspozycją na badaną substancję, przejście komórek do fazy S powinno być zablokowane w sposób opisany powyżej; następnie komórki powinny być ekspozowane na badaną substancję, jak opisano w metodzie autoradiograficznej. Pod koniec okresu inkubowania DNA powinno być wyekstrahowane z komórek i powinna być oznaczona całkowita zawartość DNA oraz ilość wbudowanej tymidyny.

Należy zaznaczyć, że jeżeli w powyższych metodach stosowane są limfocyty ludzkie, blokowanie semikonserwatywnej replikacji DNA nie jest konieczne, jeśli są to hodowle niestymulowane.

### 1.6.7.3. Analizy

#### *Ocena autoradiograficzna*

Do oceny UDS w hodowli komórek nie są liczone jądra komórkowe w fazie S. Powinno być policzone przynajmniej 50 komórek w każdym stężeniu. Szkiełka podstawowe powinny być przed liczeniem zakodowane. Na każdym szkiełku powinno być kilka oddzielnych policzonych, przypadkowych pól. Ilość wbudowanej  $^3\text{H-TdR}$  w cytoplazmie powinna być określona przez policzenie, w każdej analizowanej komórce, ziaren z trzech obszarów cytoplazmy, z których każdy ma powierzchnię odpowiadającą powierzchni jądra komórkowego.

#### *Oznaczanie z użyciem licznika LSC*

Do oceny UDS metodą LSC powinna być stosowana odpowiednia ilość hodowli dla każdego stężenia i kontroli. Wszystkie wyniki powinny być potwierdzone w oddzielnym, niezależnym eksperymencie.

## 2. WYNIKI

Wyniki powinny być przedstawione w formie tabelarycznej.

### 2.1. Ocena autoradiograficzna

Oddzielnie należy zanotować ilość wbudowanej  $^3\text{H-TdR}$  do cytoplazmy i ilość ziaren znalezionych poza jądrem komórkowym.

Do opisu rozmieszczenia  $^3\text{H-TdR}$  wbudowanej w cytoplazmie oraz ilości ziaren/na jądro komórkowe może być stosowana wartość średniej arytmetycznej, mediany i modalnej.

### 2.2. Ocena z użyciem licznika LSC

W metodzie LSC ilość wbudowanej  $^3\text{H-TdR}$  powinna być przedstawiona w postaci liczby rozpadów na minutę na  $\mu\text{g}$  DNA ( $\text{dpm}/\mu\text{g}$  DNA). Do opisu rozmieszczenia wbudowanej  $^3\text{H-TdR}$  może być stosowana średnia arytmetyczna  $\text{dpm}/\mu\text{mg}$  DNA i jej standardowe odchylenie.

Wyniki powinny być obliczane przy użyciu odpowiednich metod statystycznych.

## 3. SPRAWOZDANIE

### 3.1. Sprawozdanie z badań

W sprawozdaniu zamieszcza się, z uwzględnieniem zakresu badań, następujące informacje:

- nazwę zastosowanych komórek, gęstość komórek w hodowli i liczbę pasaży komórkowych w czasie działania związku, liczbę hodowli komórkowych,
- opis metod stosowanych do utrzymywania hodowli komórek z podaniem medium, temperatury i stężenia  $\text{CO}_2$ ,
- nazwę substancji badanej, nośnika, stężenia i uzasadnienie wyboru stężeń zastosowanych w badaniu,
- szczegółowy opis układów aktywacji metabolicznej,
- przebieg doświadczenia,
- kontrole dodatnie i ujemne,
- opis zastosowanej techniki autoradiograficznej,
- opis procedury zastosowanej do zablokowania przejścia komórek do fazy S,
- opis procedury zastosowanej do ekstrakcji DNA i oznaczenia całkowitej zawartości DNA metodą LSC,
- zależność dawka/odpowiedź, jeśli to możliwe,
- ocenę statystyczną,
- omówienie wyników,
- interpretację wyników.

### 3.2. Ocena i interpretacja wyników

Przeprowadza się na podstawie przepisów Wstępu Ogólnego Części B.