

Določanje mutagenega potenciala snovi na celični liniji mišjega limfoma

The mouse lymphoma mutagenicity assay (MLA)

Andreja Plaper

POVZETEK: V vsakdanjem življenju smo izpostavljeni številnim kemikalijam, ki na naš organizem delujejo z različno mero škodljivosti. Ena od toksičnih potencialov kemikalij je genotoksičnost. V prispevku je opisana ena od metod, s pomočjo katere prikažemo in ovrednotimo genetske poškodbe na sesalski celični liniji mišjega limfoma L5178Y $tk^{+/-}$ (klon 3.7.2C). Celična linija je heterozigotna na *Tk1* lokusu timidinske kinaze kromosoma 11. Mutacija v tem predelu kromosoma in inaktivacija tk^{+} alela povzroči izgubo aktivnosti tega encima in s tem pridobitev rezistence na tri-fluorotimidin (TFT). Tako lahko mutante $tk^{-/-}$ ločimo od nemutiranih celic. Mutirane celice, ki rastejo v selektivnem gojišču s TFT, kvantificiramo po določenem času, v katerem izrazijo svojo novo fenotipsko lastnost. Namen in cilj metode je prikazati potencial testne substance, da inducira mutacije na lokusu $tk^{+}tk^{-}$. Metoda je ena od testov mutagenosti, ki jih regulatorne organizacije uvrščajo v standardno skupino testov za določanje genotoksičnega potenciala zdravilnih učinkovin, ki morajo biti izvedeni pred registracijo.

Ključne besede: mutagenost, celice mišjega limfoma, L5178Y, rezistenca na TFT.

SUMMARY: In everyday life we are exposed to many chemicals which express different toxic potential to our organism. One of them is genotoxicity. In this paper, one of the methods which help to determine the genotoxic potential of chemicals is described. The method is mutagenicity assay on mouse lymphoma cell line (L5178Y $tk^{+/-}$ 3.7.2C), heterozygous at the thymidine kinase locus (*Tk1*) on chromosome 11. Mutation on this part of the chromosome and inactivation of the tk^{+} allele induces trifluorothymidine (TFT) resistance, and $tk^{-/-}$ mutants can be selected in a background of $tk^{+/-}$ non-mutant cells. Mutant cells, grown in the media containing the selective substance TFT, are quantified after a certain period of time, during which the cells express the new phenotypic characteristic. The purpose and aim of the test method is a demonstration of the test material potential to induce forward mutations at the $tk^{+}tk^{-}$ locus. The method is one of the mutagenicity tests included in the standard test battery for genotoxicity by regulatory agencies, and is obligatory for marketing authorisation of pharmaceuticals.

Keywords: mutagenicity, mouse lymphoma cells, L5178Y, TFT resistance;

OKRAJŠAVE: TFT, tri-fluorotimidin; ATCC, American type culture collection; ICH, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use - Mednarodna konferenca za harmonizacijo tehničnih zahtev za registracijo farmacevtskih učinkovin za humano uporabo; TK, timidinska kinaza; OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development – Organizacija za ekonomsko sodelovanje in razvoj; DMSO, dimetil sulfoksid; R₀P, gojišče RPMI 1640 z antibiotikom, natrijevim karbonatom in pluronikom F68; R₅P, gojišče R₀P s 5-odstotnim konjskim serumom; R₁₀P, gojišče R₀P z 10-odstotnim konjskim serumom; CM (cloning medium), gojišče za kloniranje; R₂₀P z 20-odstotnim konjskim serumom, natrijevim piruvatom in antimikotiki; THGM, timidin, hipoksantin, glicin metotreksat.; THG, timidin, hipoksantin, glicin; TMP, timidin monofosfat; UKEMS, United Kingdom Environmental Mutagen Society.

1 Uvod

Mutageni potencial neke snovi pomeni zmožnost indukcije dedne spremembe genetskega materiala v celici ali organizmu. Mutacija lahko vključuje en sam gen ali pa skupino genov. Genotoksičnost je širši pojem. Razumemo ga kot zmožnost interakcije kemikalije z DNA ali s celičnim aparatom, ki je vključen v razmnoževanje genoma (npr. topoizomeraze, delitveno vreteno). Za odobritev uporabe različnih kemikalij in proizvodov (pesticidov, kozmetičnih preparatov, prehrabnih izdelkov in farmacevtikov) regulatorne agencije zahtevajo različne skupine genotoksičnih testov. Kadar ocenjujemo mutagenost oz. genotoksičnost kemikalije, moramo upoštevati različne končne

učinke takega delovanja: točkaste mutacije na molekuli DNA, spremembe v številu (poliplodija, aneuplodija) ali strukturi kromosomov (klastogeneza). Zato seveda preskušanje genotoksičnega potenciala učinkovine z enim testom ne zadošča. Kombinacija primernih testov zagotavlja varno uporabo določenih kemikalij za ljudi. Med strožje zakonodajne predpise gotovo sodijo smernice za varno uporabo zdravilnih učinkovin. Primer predpisane skupine testov za testiranje genotoksičnosti farmacevtikov vsebuje tri postopke. Prvi je *in vitro* test povratnih mutacij na bakterijah (*Salmonella sp.* ali *Escherichia sp.*), za katerega se je izkazalo, da zazna odgovarjajoče genetske spremembe za večino genotoksičnih glodalskih karcinogenov (1). Druga, tudi *in vitro* metoda, je določanje genskih poškodb na celicah mišjega lim-

foma (MLA - *mouse lymphoma assay*) ali alternativno, test za citogenetsko vrednotenje kromosomskih poškodb. Ena ali druga metoda je obvezna v predpisani skupini. Testi na sesalskih celicah zaznajo poškodbe na DNA, ki jih na bakterijskih celicah ne moremo zaznati (klastogeni učinki, kromosomske aberacije). Postopki na sesalskih celicah so pomembno dopolnilo predvsem za tiste snovi, ki imajo negativen rezultat na bakterijskem testu za določanje mutagenosti. Obvezen v predpisani skupini genotoksičnih testov je tudi eden od *in vivo* testov. Ta namreč zagotovi model, v katerem so vključeni dodatni faktorji, ki vplivajo na genotoksično aktivnost spojin. Ti faktorji so absorpcija, distribucija, metabolizem in izločanje snovi. Za ta namen je primeren *in vivo* test za zasledovanje kromosomskih poškodb na glodalskih hematopoietskih celicah, ki je lahko analiza kromosomskih aberacij na celicah kostnega mozga ali analiza mikronukleusov v kostnem mozgu ali eritrocitih periferne krvi. Šele kombinacija naštetih *in vitro* in *in vivo* metod zagotavlja končno oceno varnosti uporabe neke snovi za človeka.

Namen prispevka je prikazati eno od metod, ki so predpisane v obvezni skupini testov za določanje genotoksičnega potenciala kemikalij - metodo določanja genskih mutacij na celicah mišjega limfoma (MLA). Metoda je validirana in se vrsto let uporablja za preizkušanje mnogih kemikalij (2-7). Testiranje mutacij na specifičnem lokusu sesalskih celic *in vitro* lahko uporabljamo za prikaz in kvantifikacijo genetskih poškodb. V prispevku so podani: status metode, zakonodajne zahteve, protokol za izvedbo metode in kriteriji za analizo in evalvacijo rezultatov.

1.1 Zgodovina nastanka mutirane celične linije

Od leta 1964 so znanstveniki v kulturah sesalskih celic inducirali mutacije, med drugim z namenom, da bi pripravili celične linije, na katerih bi bilo mogoče opazovati mutageni potencial kemikalij (8, 9). Heterozigotni sistem timidinske kinaze, kjer je tk^+ lokus mutiran v tk^- lokus, je leta 1972 opisal Clive s sodelavci (10) in temelji na celični liniji mišjega limfoma, ki jo je osnoval Fisher leta 1958 (11). Bolj natančen opis testa je Clive s sodelavci objavil leta 1975 (11). Obstajata dve metodi za izvajanje testa: pomnoževanje (kloniranje) celic v mehkem agarju in novejša, suspenzijska metoda, ki jo izvajamo v mikrotitrskih ploščicah (14).

1.2 Genetska osnova testa

V MLA uporabljamo celično linijo mišjega limfoma L5178Y $TK^{+/-}$ (klon 3.7.2C), ki je heterozigotna v lokusu timidinske kinaze ($Tk1$) na kromosomu 11. Celice z aktivno timidinsko kinazo (TK) reagirajo na citostatične in citotoksične učinke trifluorotimidina (TFT), tako da odmrejo. Povratne mutacije aktivnega gena TK povzročijo izgubo aktivnosti tega encima in s tem pridobitev rezistence na TFT. Mutirane celice torej lahko rastejo v prisotnosti TFT, medtem ko normalne celice ne morejo. Mutante kvantificiramo po določenem času, v katerem izrazijo novo fenotipsko lastnost tako, da jih razmnožujemo v gojišču, ki mu dodamo selektivno substanco TFT (10, 11, 12).

1.3 Zakonodajne zahteve

Vrednotenje genotoksičnega potenciala neke snovi, ki ga zahtevajo mednarodne regulatorne agencije, je določeno v različnih dokumen-

tih. Za registracijo farmacevtskih učinkovin moramo upoštevati zahteve in navodila Organizacije za ekonomsko sodelovanje in razvoj (OECD) (15) in Mednarodne konference za harmonizacijo tehničnih zahtev za registracijo farmacevtskih učinkovin za humano uporabo (ICH). ICH je v okviru svojih navodil izdala dve poglavji, ki določata izbor metod za določanje genotoksičnosti in navodila za izvajanja teh metod: S2A – Navodilo za specifične vidike veljavnih genotoksičnih testov za farmacevte (16) in S2B – Standardna skupina testov za določanje genotoksičnosti (17). OECD določa pravila izvajanja metode MLA v poglavju 476 (15).

2 Postopek

2.1 Celice

Za MLA uporabljamo celice mišjega limfoma, klon L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C, ki ga lahko kupimo v zbirki ATCC (CRL-9518) ali zbirki Jane Cole, UK. Celice uvrščamo v varnostni razred 1 (biosafety level: 1), kar pomeni, da je delo s celicami varno z upoštevanjem običajnih pravil ravnanja z biološkim materialom v laboratoriju. Celice rastejo v suspenzijski kulturi z generacijskim časom 11 ur. Imajo stabilno število diploidnih kromosomov (11).

2.2 Metabolična aktivacija

Navodila OECD zahtevajo izvajanje MLA v prisotnosti in odsotnosti metabolične aktivacije. Za metabolično aktivacijo uporabljamo encime, ki jih pridobimo iz podganjih jeter, induciranih z znanimi induktorji citokromov P450 (Na-fenobarbiton, β -naftoflavon ali aroclor 1254). Pripravimo postmitohondrijsko frakcijo sesalskih jeter (S9), ki jo v končnem testnem vzorcu dodamo od 1 % do 10 %. S9 je na voljo komercialno (Molecular Toxicology, Boone, NC, USA) ali jo pripravimo sami po postopku, ki ga je opisal Ames s sodelavci (18).

2.3 Gojišča in pogoji za vzgojo celic

Za gojenje celic uporabljamo gojišče RPMI 1640 z glutaminom (0,3 g/l) brez natrijevega karbonata, ki ga dodajamo naknadno do 0,11 % (R_0P). Za različne namene v poskusu dodajamo toplotno inaktiviran konjski serum: 5 % v gojišče, v katerem celicam dodajamo testno substanco (R_5P), 10 % v gojišče za gojenje celic ($R_{10}P$) in 20 % v gojišče za pomnoževanje celic (CM). Obvezno dodajamo tudi pluronik F68 (0,5 %), ki zagotavlja suspenzijsko rast celic (6) in antibiotik. Gojišču za razmnoževanje celic poleg 20 % seruma dodamo tudi antimikotik in Na-piruvat (1,9 mM).

Selektivno gojišče

V testu uporabljamo dve selektivni gojišči: gojišče za razmnoževanje celic z dodatkom TFT (tri fluoro timidin), ki zagotavlja kvantifikacijo in karakterizacijo mutant $TK^{-/-}$, in THGM, očiščevalno gojišče, ki odstrani spontane mutante in optimizira občutljivost metode. Sestava THGM je naslednja: timidin (0,03 %), hipoksantin (0,05 %), glicin (0,075 %), metotretsat (10 μ g/ml).

2.4 Odstranjevanje spontanih mutant

Heterozigotne celice tk^+tk^- v suspenziji spontano mutirajo v tk^-tk^- z mutacijsko frekvenco 2×10^{-6} mutacij na generacijo (12, 13). Homozigotne mutante moramo pred poskusom odstraniti.

Odstranitev spontanah tk⁻ mutant omogoča metoda s posebnim gojiščem THGM. Gojišče vsebuje metotreksat, ki inhibira timidilno sintazo odvisno od folata in s tem sintezo timidin monofosfata. Celice so zato prisiljene uporabljati zunajcelični timidin, ki pa ga mora fosforilirati timidinska kinaza. Homozigotne mutante TK⁻ ne morejo fosforilirati eksogenega timidina in odmrejo zaradi pomanjkanja TMP. Drugi dve sestavini gojišča sta hipoksantin in timidin, ki ju dodamo zato, da nadomestimo blokado metabolizma folata in posredno sintezo purinov. Glicin dodamo kot vir metilnih skupin (13). Celice rastejo v gojišču THGM 24 ur, nato jih speremo in resuspendiramo v THG (THGM brez metotreksata). Očiščene celice uporabimo za eksperiment, preostanek zavržemo.

3 Določanje mutagenosti

3.1 Topnost testnega materiala

Topnost testne substance preizkusimo v različnih topilih. Za topne substance je najvišja koncentracija, ki jo izberemo, odvisna od toksičnosti le-te, vendar ne sme presegati koncentracije 5 mg/ml. Organska topila naj ne bi presegala 1 % skupnega volumna vzorca.

3.2 Testiranje toksičnosti substance

Odmerki učinkovine za testiranje mutagenosti morajo segati do toksičnih koncentracij. Najvišje uporabljene koncentracije dovoljujejo preživetje v območju od 10-20 % glede na vzporedne kontrole, ki vsebujejo le topilo. Pred testom mutageneze določimo toksični potencial substance z mešanico S9 in brez nje. Za test uporabimo nasičeno raztopino substance in še 8 razredčitev. Celice izpostavimo substanci tako, kot je določeno v testu mutagenosti, le da v tem primeru ne delamo v duplikatu. Po tretiranju določimo gostoto celic s hemocitometrom, prilagodimo koncentracijo do 8 celic/ml in po 0,2 ml zasejemo na 2 mikrotitrski plošči s 96 vdolbinami. Kulture inkubiramo 9 dni na 37 °C v 5-% CO₂ atmosferi.

Število negativnih vdolbin po 9 dneh in gostota celic, ki jo določimo po tretiranju s substanco, služita za izračun relativnega preživetja (RS - relative survival)) za vsako celično kulturo na dan 0.

3.3 Test mutagenosti

Naredimo dva popolna testa mutagenosti v prisotnosti in odsotnosti mešanice S9. Vse kulture, ki jih izpostavimo testni substanci, pozitivnim in negativnim kontrolam, tretiramo v duplikatu.

V prvem poskusu izberemo 6 koncentracij. Najvišja koncentracija za prvo testiranje je tista, ki inducira skoraj 100-% smrtnost celic. Dodatne koncentracije izberemo z namenom, da bi dobili rezultate za kritične toksične koncentracije, tj. v območju od 10-20 % preživetja. Za netoksične substance najvišja koncentracija navadno ne presega 5 mg/ml. Za drugi poskus lahko koncentracije spremenimo, tako da dosežemo ustrezen nivo toksičnosti.

3.3.1 Pozitivna in negativna kontrola

Negativna kontrola so celične kulture, ki jih obdelamo popolnoma enako kot kulture v testu, le da namesto substance dodajamo topilo, v katerem raztapljamo preizkušane.

Kot pozitivno kontrolo lahko uporabimo različne mutagene. Pozitivna kontrola, ki potrebuje metabolično aktivacijo z mešanico S9, je za indukcijo malih in velikih kolonij običajno 3-metilkolantren (3-MC topen v DMSO). Končna koncentracija v celični kulturi je 2,5 µg/ml. Mutagena kemikalija, ki ne potrebuje metabolične aktivacije, je za indukcijo velikih kolonij, etilmetan sulfonat (EMS), katerega končna koncentracija v kulturi je 250 µg/ml. Za indukcijo malih kolonij pa uporabljamo metilmetan sulfonat do končne koncentracije 15 µg/ml.

3.3.2 Tretiranje kultur

V gojišču, ki ga uporabljamo ob tretiranju, zmanjšamo nivo seruma do 5 %, ker previsoka količina seruma lahko zabriše učinek nekaterih mutagenov (12). Za vsako pozitivno in negativno kontrolo ter vsako testno koncentracijo pripravimo po dve centrifugirki. V vsak par centrifugirki dodamo odgovarjajočo količino gojišča, celice do koncentracije 6×10^5 celic/ml, mešanico S9 oz. gojišče, pozitivno kontrolo oz. topilo ali eno od koncentracij preizkušanca. Vse epruvete inkubiramo na rolerju 4 ure pri 37 °C. Odvzamemo majhen vzorec celic (~0,2 ml) iz vsake kulture in določimo število celic (število celic dneva 0). Celice nato speremo z 20 ml gojišča R₁₀P in resuspendiramo v R₁₀P do gostote ~ 3×10^5 celic/ml. Del kultur razredčimo v gojišču CM do koncentracije 8 celic/ml. V vsako vdolbino na ploščici zasejemo po 200 µl razredčene kulture. Inkubiramo v CO₂ inkubatorju 9 dni. Relativno preživetje določimo na enak način, kakor je opisano pri testiranju toksičnosti.

Naslednji dan celice ponovno preštejemo (število celic na dan 1) in jih razredčimo tako, da imajo gostoto ~ 3×10^5 celic/ml. Kulture damo nato nazaj v inkubator, kjer jih pustimo še en dan.

Tretji dan (dan 2) celice spet preštejemo. Vse pozitivne in negativne kontrole ter tiste kulture, ki so bile izpostavljene štirim najvišjim koncentracijam testne substance in imajo najmanj 3×10^5 celic/ml, izberemo za izražanje genetskih poškodb.

3.3.3 Izražanje genetskih poškodb

Učinkovitost kloniranja

Vsako kulturo razredčimo v gojišču za pomnoževanje celic (CM) do 8 celic/ml. Po 200 µl kulture odpipetiramo na mikrotitrski plošči s 96 vdolbinami.

Selekcija mutant

Selekcijo mutant izvedemo tako, da h gojišču CM dodamo TFT (3 µg/ml). Celice resuspendiramo v selekcijskem gojišču (1×10^4 celic/ml) in razdelimo po 200 µl na mikrotitrski ploščice s 96 vdolbinami.

Vse plošče inkubiramo pri 37°C v atmosferi 5 % CO₂, 95 % zraka (v/v), dokler se kolonije popolnoma ne razvijejo (9 dni za določanje učinkovitosti kloniranja in 12 dni za selekcijo mutant). Po končanem poskusu pregledamo plošče pod lupo z osvetljeno podlago. Na ploščah poskusa učinkovitosti kloniranja (iz dneva 2) po devetih dneh preštejemo prazne jamice. Izračunamo učinkovitost kloniranja (*cloning efficiency*-CE_{nemutante}).

Na ploščah poskusa selekcije mutant po 12 dneh preštejemo vdolbine, ki imajo male kolonije, in vdolbine, ki vsebujejo velike kolonije. Izračunamo število praznih vdolbin. Molekularna osnova za velike in male kolonije še ni povsem razjasnjena. Ena hipoteza predpostavlja gen, ki kontrolira celično rast in naj bi bil blizu Tk1 gena (19).

Poškodba kromosoma v tem delu naj bi vodila do upočasnjene rasti celice. Ugotovili so, da pri malih kolonijah dejansko prihaja do kromosomskih aberacij in nastajanja mikronukleusov z večjo frekvenco kot pri velikih kolonijah (20, 21). Avtorji so zaključili, da določitev števila malih kolonij lahko nakazuje obseg klastogenosti testirane substance poleg mutagenosti, ki jo pokažejo velike kolonije.

Iz podatkov, ki jih dobimo iz plošče poskusa selekcije mutant, določimo razmerje med malimi in velikimi kolonijami in učinkovitost kloniranja za mutante ($CE_{mutante}$). Iz razmerja ($CE_{mutante}$) / ($CE_{nemutante}$) izračunamo mutacijsko frakcijo.

3.3.4 Izračuni

IZRAČUN RELATIVNEGA PREŽIVETJA

Učinkovitost kloniranja (CE-cloning efficiency)

Iz razmerja med praznimi in polnimi jamicami izračunamo učinkovitost kloniranja (CE) po naslednji formuli (22):

$P(o)$ = prazne jamice/vse jamice

$CE = -\ln(P(o))$ /število celic na jamico

Faktor celičnega štetja (CCF – cell count factor)

Na začetku eksperimentiranja je gostota celic 3×10^5 celic/ml. Vsako odstopanje od te gostote na koncu eksperimentiranja izračunamo tako, da število celic v individualni kulturi, ki smo jo tretirali, delimo s povprečjem števila celic v kontrolnih kulturah:

CCF = individualna vrednost gostote celic po tretiranju /srednja vrednost gostote celic, tretiranih s topilom

Preživetje

Preživetje (**S – survival**) izrazimo kot zmnožek učinkovitosti kloniranja (CE) s faktorjem celičnega štetja CCF:

$S = CE \times CCF$

Relativno preživetje

Relativno preživetje (RS) je izraženo kot razmerje med vrednostjo preživetja (S) individualne kulture in povprečno vrednostjo preživetja (S) kontrolnih kultur.

$RS = S$ individualne kulture/ povprečna vrednost S kontrolnih kultur.

RELATIVNA SUSPENZIJSKA RAST (RSG – relative suspension growth)

Pri testiranju toksičnosti določimo tudi relativno suspenzijsko rast, to je zmožnost kulture, da se namnoži v dveh dneh do gostote 3×10^5 celic/ml:

Izračun za totalno suspenzijsko rast je:

(število celic dneva 1 /končna koncentracija dneva 0) x (število celic dneva 2 /končna koncentracija dneva 1)

% RSG (relativna suspenzijska rast) = ((vrednost suspenzijske rasti individualne kulture) / (vrednost suspenzijske rasti za povprečje kontrolnih kultur)) x 100.

OCENA PREŽIVETJA CELIC

Priporočeno izhodišče za oceno preživetja pri poskusu na mikrotitrskih ploščah je relativno preživetje v dnevu 0. Relativno preživetje v dnevu 0 predstavlja učinkovitost kloniranja kulture takoj

po tretiranju. Izračun je prilagojen tako, da upošteva izgubo celic zaradi toksičnosti med tretiranjem (22).

Izračun relativnega preživetja izvedemo po naslednjem postopku:

Na ploščah za poskus učinkovitosti kloniranja preštejemo prazne jamice. Iz teh podatkov izračunamo učinkovitost kloniranja (CE), faktor celičnega štetja (CCF), preživetje (S) in relativno preživetje (RS) po formulah točke 3.3.4.

Iz podatkov števila celic v posamezni kulturi ob upoštevanju dnevni razredčitev izračunamo totalno suspenzijsko rast in relativno suspenzijsko rast (RGS) po formulah točke 3.3.4.

OCENA MUTACIJSKIH FRAKCIJ

Mutacijsko frakcijo določimo tako, da izračunamo razmerje med učinkovitostjo kloniranja mutant (CE_{mutant}) in učinkovitostjo kloniranja nemutant ($CE_{nemutant}$).

Učinkovitost kloniranja nemutant ($CE_{nemutant}$) izračunamo iz števila praznih jamic, ki jih dobimo iz plošče poskusa učinkovitosti kloniranja dneva 2 po formuli iz točke 3.4.4. Upoštevam število zasejanih celic (1,6 celic/ jamico).

Učinkovitost kloniranja za mutante (CE_{mutant}) izračunamo iz števila praznih jamic, ki jih dobimo iz plošče poskusa selekcije mutant po enaki formuli kot zgoraj. Upoštevam, da smo na teh ploščah zasejali 2000 celic na jamico.

Mutacijsko frakcijo izračunamo iz razmerja mutacij med kulturo, ki smo jo gojili v selektivnem gojišču, in kulturo, ki smo jo gojili v neselektivnem gojišču.

Mutacijska frakcija = $CE_{mutant} / CE_{nemutant}$

Vsako mutacijsko frakcijo izrazimo glede na 10^6 živih celic.

Frakcija velikosti kolonij

Za vsako kulturo določimo razmerje med številom malih in velikih kolonij.

4 Analiza in interpretacija rezultatov

4.1 Statistična analiza

Statistično značilno frekvenco mutacij določimo v skladu z navodili UKEMS (23). Logaritem frekvence mutacij kontrole primerjamo z logaritmom frekvence mutacij vsake testirane koncentracije z Dunnettovim testom. Iz podatkov, ki smo jih pridobili s testiranjem, z utežno regresijo preverimo linearni trend mutacijske frekvence. Test za linearni trend je »enorepi«, negativnega trenda ne upoštevamo. Ta test potrebuje izračun faktorja heterogenosti, da dobimo modificirano oceno variance.

4.2 Kriteriji za veljaven poskus

Poskus je veljaven, če dosežemo kriterije, ki se ujemajo z navodili UKEMS (21) in sklepi Portlandskega delovnega srečanja (24).

Doseči moramo naslednje kriterije:

1. Frekvenca mutacij negativne kontrole (topilo) mora doseči vrednosti, ki so znotraj normalnega območja (nad 60 mutant na 10^6

celic, vendar ne trikrat več od srednje vrednosti zgodovinskih okvirov) (23, 24).

2. Vsaj ena koncentracija vsake pozitivne kontrole mora izzvati statistično značilno povečanje frekvence mutacij
3. Učinkovitost kloniranja negativnih kontrol iz eksperimentov mutagenosti mora biti v okviru med 60 in 140 % na dan 0 in med 70 in 130 % na dan 2 (23, 24).
4. Ne smejo se pojavljati tehnični problemi, kot je npr. kontaminacija, prevelika toksičnost, spremembe ozmolarnosti ali pH.

4.3 Kriteriji za vrednotenje rezultatov

Preizkušanece nemo kot mutagen, če so izpolnjeni naslednji kriteriji:

1. če je poskus veljaven (točka 4.2);
2. če je frekvenca mutacij ene ali več testiranih koncentracij statistično večja od negativne kontrole ($p < 0,05$);
3. če analiza linearnega trenda pokaže od doze odvisno povečanje frekvence mutacij.

5 Sklep

Kriteriji za mutagenost, ki jo določimo s tem testom, so enaki za vse kemikalije. Končna ocena o varnosti je odvisna od rezultatov ostalih testov in namena uporabe snovi. Pri zagotavljanju varne uporabe farmacevtikov je potrebno pred prvim preizkušanjem zdravilne učinkovine na človeka narediti *in vitro* teste za vrednotenje mutacij in kromosomskih poškodb. Standardna skupina predpisanih testov (omenjena v uvodu prispevka) mora biti narejena pred začetkom II. stopnje kliničnega preskušanja zdravila. Opisana metoda je torej eno od pomembnih orodij farmacevtske industrije za zagotavljanje varne uporabe zdravilnih učinkovin.

6 Literatura

1. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res* 1975; 347-64).
2. McGregor DB, Martin R, Cattanach P, Edwards I, McBride D, Caspary WJ. Responses of the L5178 tk⁺/tk⁻ Mouse Lymphoma Cell Forward Mutation Assay to Coded Chemicals. I: Results for Nine Compounds. *Environ Mutag* 1987; 9: 143-160.
3. McGregor DB, Brown A, Cattanach P, Edwards I, McBride D, Caspary WJ. Responses of the L5178 tk⁺/tk⁻ Mouse Lymphoma Cell Forward Mutation Assay II: 18 Coded Chemicals. *Environ Molec Mutag* 1988; 11: 91-118.
4. McGregor DB, Brown A, Cattanach P, Edwards I, McBride D, Riach C, Caspary WJ. Responses of the L5178 tk⁺/tk⁻ Mouse Lymphoma Cell Forward Mutation Assay III: 72 Coded Chemicals. *Environ Molec Mutag* 1988; 12:85-154.
5. McGregor DB, Brown A, Howgate S, McBride D P, Riach CG, Caspary WJ. Responses of the L5178 tk⁺/tk⁻ Mouse Lymphoma Cell Forward Mutation Assay V: 27 Coded Environ Molec Mutag 1991; 17: 196-219.
6. McGregor DB, Brown A, Cattanach P, Edwards I, McBride D, Riach C, Shepherd W, Caspary WJ. Responses of the L5178Y Mouse Lymphoma Forward Mutation Assay: V. Gases and Vapors. *Environ Molec Mutag* 1991;17: 122-29.
7. Clive D, Johnson KO, Spector JF, Batson AG, Brown MM. Validation and Characterization of the L5178Y/TK± mouse lymphoma mutagen assay system. *Mut Res* 1979; 59(1): 61-108.
8. Ficher, GA and Sartorelli AC. Development, Maintenance and Assay of Drug Resistance. *Methods in Medical Research* 1964; 10: 247-62.
9. Kao FT and Puck TT. Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proceedures of National Academy of Science USA* 1968; 60: 1275-81.
10. Clive D, Flamm WG, Machesko MR, Bernheim NJ. A Mutational Assay System Using the Tymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res* 1972;16: 77-87.
11. Fisher GA. Studies of The Culture of Leukemia Cells *In vitro* *Ann Ny Acad Sci* 1958; 76: 673-80.
12. Clive D, Spector JFS. Laboratory Procedure for Assessing Specific Locus Mutations at the TK Locus in Cultured L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mut Res* 1975;31: 17-29.
13. Clive D, Caspary W, Kirby PE, Krehl R, MOore M, Mayo J, Oberly TJ. Guide for Performing the Mouse Lymphoma Assay for Mammalian Cell Mutagenicity. *Mut Res* 1987; 189: 143-156.
14. Cole J, Arlett CF, Green MHL, Lowe J Muriel W. A comparison of the agar cloning and microtitration techniques for assaying cell survival and mutation frequency in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mut Res* 1983; 111: 371-386.
15. OECD guidelines for testing of chemicals; Section 4, Subpart 476; OECD, 1997.
16. ICH Topic S2A; Harmonised Tripartite Guideline CPM/ICH/141/95, approved September 1995 Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals; ICH 1995.
17. ICH Topic S2B: Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals for Humane Use. Step 4 Guideline, Brussels; ICH 1997.
18. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mut Res* 1983;113: 173-215.
19. Liechty MC, Scalzi JM, Sims KR, Crosby H, Spencer DL, Davis LM, Caspary WJ and Hoizer JC. Analysis of large and small colony L5178Y tk⁻/tk⁻ mouse lymphoma mutants by loss of heterozygosity (LOH) and by whole chromosome 11 painting: detection of recombination. *Mutagenesis* 1998; 13: 461-474.
20. Hozier J, Sawyer J, Moore M, Howard B, Clive D. Cytogenetic analysis of the L5178Y tk⁻/tk⁻ mouse lymphoma mutagenesis assay system. *Mutat Res* 1981; 84: 169-181.
21. Blazak WF, os FJ, Rudd CJ, Caspary WJ. Chromosome analysis of small and large L5178Y mouse lymphoma cell colonies from mutagen-treated and control cultures. *Mutat Res* 1989; 224: 197-208.
22. Clements J. The Mouse Lymphoma Assay. 2000. *Mut Res* 455: 97-110.
23. Robinson WD, Green MHL, Cole J, Garner RC, Healy MJR, Gatehouse D, 1989; Statistical evaluation of bacterial/ mammalian fluctuation tests. V Statistical Evaluation of mutagenicity test data (Edited by Kirkland DJ) Cambridge University Press, pp 102-140.
24. Clive D, Bolcsfoldi G, Clements J, Cole M, Honma J, Majeska M, Moore L, Muller B, Myher T, Oberly M, Oudelkhim MC, Rudd C, Shimada H, Sofuni T, Thybaud V, Vilcox P. Consensus agreement regarding protocol issues discussed during the mouse lymphoma workshop: Portland Oregon, May7, 1994; *Environ Mol Mutagen* 1995; 25: 165-168.