
Commet assay lab

Rok pořízení	2018 - 2020
Financování	OP VVV <u>CORE FACILITIES</u> CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002515
Zodpovědná osoba	prof. Ing. Zdeněk Fiala, CSc.

Každá lidská činnost může být za jistých okolností zdrojem rizik pro člověka i pro životní prostředí. V případě nárůstu a kumulace těchto rizik je nutno přijímat opatření, která sníží úroveň rizika na společensky přijatelnou úroveň. Nejprve je ale nutné možné riziko charakterizovat na základě identifikace a charakterizace nebezpečnosti a hodnocení expozice. V rámci identifikace rizika je nutné hodnotit i schopnost rizikového faktoru způsobovat poškození genetické informace buněk, tedy působit genotoxicky.

Pojem genotoxicita se vztahuje k látkám, faktorům nebo procesům, které poškozují strukturu DNA, mění informační obsah genomu a přenos informací a ovlivňují segregaci DNA či inhibují její replikaci. S procesem genotoxicity se do značné míry překrývá proces mutagenity, který je charakterizován náhlou, neuspořádanou změnou genetické informace, přenášené do dalších generací buněk. Látky (faktory) označené jako mutageny indukují lokálně ohraničené léze ve struktuře DNA a pokud nejsou odstraněny buněčnými opravnými systémy, mohou se v průběhu replikace DNA fixovat ve stabilní mutaci. Mutace mohou vznikat buď uvnitř jednotlivých genů (genové mutace) nebo mají za následek poškození chromozomů (chromozomové mutace). Chromozomové změny se mohou týkat struktury chromozomů nebo jejich počtu. Z uvedených důvodů lze o testech mutagenity hovořit jako o testech genotoxicity.

Testování karcinogenních účinků na zvířatech či analyzování karcinogenního potenciálu pomocí epidemiologických studií vyžaduje vysoké náklady a nutný čas se většinou měří v rocích. Krátkodobé testy genotoxicity umožňují orientačně vymezit ze široké palety několika set tisíc existujících i nově produkovaných (a používaných) látek ty, které svým genotoxickým působením signalizují i existenci další návazné nebezpečné vlastnosti - karcinogenity. Je však nutno zdůraznit, že vedle genotoxických mechanismů karcinogeneze (kdy první krok v procesu je navozen poškozením DNA mutačními změnami), existují i mechanismy ne-genotoxické (epigenetické), které krátkodobými testy genotoxicity identifikovány být nemohou.

Výhodou krátkodobých testů genotoxicity je potenciál rychlého odhalení existence genotoxického působení a podle charakteru použitého testu případně i mechanismus tohoto působení. Na základě vztahu mezi genotoxickým a karcinogenním mechanismem účinku lze určením genotoxického účinku vytipovat látky (faktory), kterým je nutno věnovat pozornost jako potenciálním karcinogenům a dále je sledovat v testech in vivo a v epidemiologických studiích.

Jedním z významných krátkodobých testů genotoxicity je test „Comet assay“ (CA), který se používá k detekci zlomů v jádrech buněk. Jedná se o všestranně využitelnou, relativně jednoduchou a citlivou metodu, která je v závislosti na variantě schopná detekovat jedno- i dvou-řetězcové zlomy DNA, alkali-labilní místa (apurinová/apyrimidinová místa) či inkompletní reparaci DNA, ale i oxidované purinové či pyrimidinové báze, cross-link vazby či apoptické buňky. Zlomy DNA detekovatelné pomocí CA by v buňce mohly být opraveny, být pro buňku letální či se v buňce fixovat za vzniku permanentní mutace. Poškození DNA lze pomocí CA detekovat v suspenzi kvasnic, protozoálních, rostlinných i živočišných buněk (bezobratlí i obratlovců), a to jak dělících se tak i nedělících se buněk.

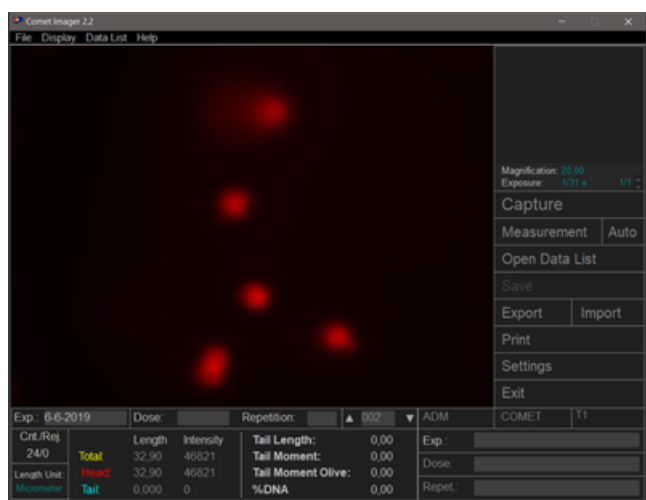


Obr. 1 (S) Sestava pro analýzu comet assay (fluorescenční mikroskop a PC se SW pro analýzu) s ukázkou měření



Obr. 2 Biohazard box s laminárním prouděním disponuje dvěma pracovními místy, tedy umožňuje práci dvou studentů zároveň

Během CA jsou buňky umístěny v agarózovém gelu. Po lýze buněčné a jaderné membrány v solném roztoku dochází vlivem elektroforézy k vycestování fragmentů DNA z jádra, přesněji řečeno z nukleoidu („hlavy“) do „ohonu“, čímž po vizualizaci vhodným barvivem vzniká typický obraz komety, který celé metodě dal své jméno. Čím více je DNA fragmentovaná, tím je „ohon“ větší a delší. Fragmentovaná DNA díky svému negativnímu náboji putuje směrem k anodě.



Obr. 3 Ukázka „komet“ z testu comet assay

CA hodnotí míru poškození DNA genotoxickými látkami, přítomnými v životním a pracovním prostředí a schopnost reparace poškozené DNA. Metoda je využívána v testech in vitro, in vivo a v epidemiologických studiích. Pro analýzu obvykle stačí malé množství buněk (<50 000, někteří autoři udávají i jen 10 000 buněk). Její velkou výhodou je možnost aplikace/modifikace na téměř všechny typy buněk a tedy i tkání, které lze na jednotlivé buňky rozdělit. Díky této skutečnosti je možné detekovat poškození DNA ve tkáních, které přicházejí jako první do kontaktu s karcinogeny. V neposlední řadě je nutno zmínit i relativní jednoduchost, rychlost, cenovou nenáročnost a citlivost detekovat i malé poškození DNA.

V rámci projektu CORE FACILITIES byla na Lékařské fakultě v Hradci Králové nově vybavena laboratoř pro testování genotoxického potenciálu různých látek (faktorů) v podmínkách in vitro, in vivo, či v rámci epidemiologických studií. Laboratoř disponuje biohazard boxem s laminárním prouděním, inkubátorem s řízenou atmosférou, chlazenou centrifugou, termoblokem a fluorescenčním mikroskopem s CCD kamerou a SW, který umožňuje měření vybraných parametrů během analýzy CA.

Autor textu: prof. Ing. Zdeněk Fiala, CSc., MUDr. Andrea Málková, Ph.D.