

Mutageneze

Úvod

Mutageneze nebo též *genotoxicita* je proces, při němž dochází působením *mutagenních faktorů* (*mutagenů*) k poškození *DNA*. Tento pojem bývá často spojován s *karcinogenezí* (též kancerogenezí), což je proces, při němž dochází vlivem *karcinogenů* k poškození *DNA* s následkem přeměny normální buňky v buňku nádorovou. Tyto pojmy nelze bezvýhradně zaměňovat. Platí zde, že každý karcinogen je mutagenem, ne však u každého mutagenu byla prokázána karcinogenní aktivita. Tento článek by měl přispět k pochopení základních principů mutageneze, dává stručný přehled základních typů mutagenů a základních typů testování genotoxicity. Zaměřen je obecně, prakticky, vždy jsou uvedeny jen některé nejběžnější a modelové příklady. Proto je určen pregraduálním studentům medicíny i laické veřejnosti.

Mutagenní faktory

Mutagenní faktory jsou různorodou skupinou.

1. Dle jejich povahy a podstaty je dělíme na mutageny fyzikální, chemické a biologické.

- **Chemické mutageny** způsobují mutace na základě chemické modifikace *nukleotidu* (zejména bází) a změnami polynukleotidového řetězce (štěpení, vmezezení atd.). Pro představu uvádíme pár příkladů. **Alkylační, arylační látky** (yperit, benzo(a)pyren) vytváří tzv. *adukty* s bázemi nukleových kyselin. Dále jsou to tzv. **interkalátory** – např. *fluorescenční barviva* nebo **další chemické látky** způsobující *deaminace*, *hydroxylace*, *štěpení vazeb* v *DNA*, *RNA*. Různé **syntetické analogy bází** po svém zařazení způsobují hlavně *substituční mutace*, protože se během replikace chybně párují s **komplementárními** bázemi. Typickými zástupci z běžného života jsou různá *potravinářská barviva*, *produkty spalování* (tedy kouření a automobilové zplodiny) a *PCB* – složky umělých hmot.
- **Fyzikálními mutageny** jsou zejména **ionizační** a **UV záření**. Působením UV záření vznikají mutace při replikaci – mezi nejčastější patří *pyrimidinové dimery*. Před tímto zářením jsme chráněni kožními orgány, kde se tyto mutace shromažďují. Při nadměrném vystavení UV světlu nebo při poruchách *replikačních reparačních mechanismů* může mít vysoké nahromadění mutací karcinogenní účinek a vznikají *rakoviny kůže*. Jedna z nejznámějších geneticky podmíněných poruch, kdy jsou poškozeny právě i *reparace thyminových dimerů* vzniklých po UV záření, je *xeroderma pigmentosum*.
- **Biologickými mutageny** jsou biologicky aktivní částice jako například **viry** (*DNA*, *RNA*, *retro*) a **transpozony** (*Line*, *Alu*, *Sine*).

2. Mutageny dělíme dále z hlediska biochemického, dle mechanismu působení, na přímé a promutagenní látky.

- **Přímé mutageny** jsou faktory schopné svou vlastní podstatou a složením vyvolat nějaké změny v *DNA*.
- **Promutageny** jsou samy o sobě neškodné, mutagenními se stanou až po *metabolické aktivaci*, která umožňuje jejich zpracování organismem.

Testy genotoxicity

Abychom zjistili, které látky a faktory jsou v jaké míře mutagenní a člověku nebezpečné, provádí se tzv. testy mutagenity nebo genotoxicity. Základní laboratorní testování se provádí na třech úrovních – molekulární, genové a chromozomové.

1. **Testy na molekulární úrovni** zjišťují změny na úrovni *DNA* například následujícími mechanismy:
 - **stanovení aduktů**, imunohistochemickými metodami zjišťujeme míru přítomnosti *aduktů* v testovacím vzorku *DNA*;
 - pomocí *PCR* (polymerázové řetězové reakce) a jiných molekulárně-biologických metod zjišťujeme **vznik konkrétních mutací**;
 - tzv. **neplánovaná syntéza DNA (UDS)** je založena na měření míry reparačních mechanismů (*reparačních syntéz*) úměrné poškození *DNA* cestou inkorporace *radioaktivně značeného* nukleotidu;
 - nejznámější tzv. „**kometový test**“ (**comet assay**) nebo **SSGE (single cell electrophoresis)** využívá toho, že vlivem mutagenních účinků vznikají v jádrech buněk fragmenty. Jejich množství je úměrné míře genotoxicity působícího testovaného potenciálního mutagenu na buňku. Jádra buněk převádíme do gelu a pomocí *elektroforézy* se *uvolňují vzniklé fragmenty*. Po obarvení jader *fluorescenčním barvivem* a pozorování přes *fluorescenční mikroskop* pozorujeme útvar podobající se *letící kometě*, jejíž tělo odpovídá jádru a velikost (délka a rozsah) ohonu odpovídá množství fragmentů *DNA*, a tedy i míře genotoxicity.
2. **Testy na úrovni genové** zjišťují rozsáhlejší poškození celých genů. Genové mutace jsou zjistitelné následujícími biochemickými metodami:
 - **SOS/umu test** měří podobně jako u neplánované syntézy *DNA* úroveň reparačních mechanismů, které budou probíhat na látce, jež byla vystavena mutagenu, nyní jde ale o opravy v rámci celých genů. Využívají se zde speciální kmeny bakterií a sleduje se míra exprese mutátorových genů (tedy genů jejichž produkty se podílejí zásadně v reparačních procesech).
 - **indukci rezistentních mutantů** u savčích buněk *in vitro*, kdy můžeme působením mutagenů indukovat vznik mutantů, které budou rezistentní k určitým normálně toxickým chemickým látkám jako např. vůči ouabainu, 6-thioguaninu, 8-azaguaninu atd...

- **Amesův test**, jeden z nejpoužívanějších testů genotoxicity, umožňuje sledovat reverzní mutace u histidin-deficientních kmenů bakterie *Salmonella typhimurium*. Tyto kmeny přežijí pouze v médiu obsahujícím histidin. Působením mutagenů u těchto bakterií dojde k reverzní mutaci, která zpětně opraví poškozený gen a tím bakterie získají znovu schopnost tvorby histidinu, kterou předtím postrádaly. Množství žijících bakterií na mediu bez histidinu odpovídá síle a množství mutagenu. Test se provádí na třech Petriho miskách s mutantními kmeny bakterií v mediu chudém na histidin. Miska, do které nebyl přidán mutagen, slouží jako negativní kontrola a objevuje se zde jen malé množství adaptovaných životaschopných bakterií – tzv. spontánní revertanti. Do druhé misky se navíc přidává testovaná látka (potenciální mutagen) a prokázání mutagenity koresponduje s velkým množstvím životaschopných revertantů. Třetí miska slouží jako pozitivní kontrola a místo testované látky přidáváme navíc již známý mutagen, jehož účinek je stejný jako v předchozím případě.
3. **Testy na úrovni chromozomové** odhalují množství změn v rámci *chromozomových aberací*, ať už velkého, či submikroskopického rozsahu. Většinou se jedná o poškození více genů, genových skupin vlivem strukturní nebo numerické aberace vzniklé jako následek mutagenního působení. Mezi tři nejpoužívanější metody patří:
- **Testování pomocí detekce a stanovení frekvence strukturních a numerických chromozomových aberací** u savčích buněk v kultuře, na laboratorních zvířatech nebo u osob, které přišly do styku s testovaným mutagenem. Tímto způsobem probíhá např. monitoring pracovníků *rizikových pracovišť*. U každé osoby se zde např. pomocí *karyotypizace*, *CGH* nebo *čipových metod (array CGH)* dá zjistit množství aberací v jednotlivých buňkách. Mutagenitu dále hodnotíme dle hodnoty frekvence buněk s velkým množstvím aberací, přičemž frekvenci do 2 % považujeme za *normální nález*, hodnoty 2–4 % jsou *hraniční* a nález nad 4 % je považován za *výsledek působení mutagenu*. Je nutno podotknout, že při takto prováděném testování dojdeme k objektivnímu výsledku, pokud testujeme dostatečný počet osob (cca 20), nejlépe s 50 % zastoupení mužů a žen.
 - Další možností je **testování výměny sesterských chromatid (SCE – Sister Chromatid Exchanges)**. Sledujeme míru – *frekvenci výměn sesterských chromatid*, která roste u buněk vystavených mutagenu. K detekci můžeme využít barvení malovacími sondami *M-FISH* nebo *metodu SKY*, kdy nabarvené chromozomy pozorujeme pod fluorescenčním mikroskopem a výsledky jsou zpracovány a zaznamenány počítačem.
 - **Mikronucleus test** neboli „test tvorby mikrojadér“ je založen na faktu, že působením mutagenů dochází k tvorbě chromozomových fragmentů bez centromer. Tyto *acentrické chromozomy* nejsou během mitózy zavzaty do jádra a v cytoplazmě vytváří tzv. mikrojadra. Míra výskytu mikrojadér nás tedy také, jako testy předešlé, informuje o tom, má-li látka mutagenní účinek a o síle mutagenu.

Odkazy

Externí odkazy

- [1] (<https://dl1.cuni.cz/>), kurz lékařské biologie II.
- Ústav experimentální botaniky AV ČR - Rostlina s příběhem (http://www.google.cz/imgres?q=kometov%C3%B D+test&hl=cs&client=firefox-a&hs=al&sa=X&rls=org.mozilla:cs:official&biw=1280&bih=579&tbm=isch&prmd=imvns&tbnid=gzs1L6lv_yPhWM:&imgrefurl=http://www.ueb.cas.cz/cs/internet-site/pro-verejnost-novinare/r ostlina-s-pribehem%3Fpage%3D2&docid=-VhPU1gHEcn-xM&imgurl=http://www.ueb.cas.cz/cs/system/files/use rs/public/kolar_27/obrazky_popularizace/fotopribeh/fotopribeh_0410_mini.jpg&w=150&h=150&ei=SYIDT_HPGY -XOpWzhfcO&zoom=1)

Související články

- *mutageny a mutageneze*

Zdroje

- KOČÁREK, Eduard a Martin PÁNEK. *Praktická cvičení z klinické cytogenetiky : pracovní sešit ke skriptům Klinická cytogenetika I*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 2006. 54 s. s. 47-52. ISBN 80-246-1070-1.
- KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahúše NOVOTNÁ, et al. *Klinická cytogenetika I : Úvod do klinické cytogenetiky, vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2. vydání. Praha : Karolinum, 2010. 134 s. ISBN 978-80-246-1880-7.
- GOETZ, Pavel, et al. *Vybrané kapitoly z lékařské biologie, díl 2*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 2002. 139 s. ISBN 80-246-0320-9.