

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2017**

**Lucie Horáková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Genotoxicita vybraných chemických  
látek v kulturách savčích buněk**

**Bakalářská práce**

**Lucie Horáková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2017**

**Vedoucí práce: Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Jitky Prachařové, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne .....

.....

Lucie Horáková

## Souhrn

S umělými sladidly se setkáváme prakticky denně. Jsou to látky několikanásobně sladší než cukr, ale neobsahují žádné kalorie. Těchto bezesporu výhodných vlastností se využívá nejen při výrobě potravin, ale také léků, hygienických potřeb aj. Bohužel existují pochybnosti o zdravotní nezávadnosti některých umělých sladidel. Ke zjištění genotoxicity bylo provedeno mnoho studií s využitím rozličných *in vitro* i *in vivo* testů, avšak negativní vliv umělých sladidel nebyl jednoznačně prokázán.

Teoretická část této bakalářské práce se věnuje popisu testů používaných k zjišťování genotoxicity chemických látek *in vitro*. Dále jsou stručně popsána nejčastěji využívaná umělá sladidla. Experimentální část je pak zaměřena na studium genotoxického potenciálu umělých sladidel aspartamu a sacharinu na buněčné linii V79-4. Zvolená umělá sladidla byla testována pomocí nově zavedeného postupu hypoxantinganinfosforibosyltransferázového mutačního experimentu. Obě umělá sladidla způsobila za použitých experimentálních podmínek mírně zvýšenou hladinu mutací v *hprt* lokusu buněk V79-4 ve srovnání s kontrolními neošetřenými buňkami.

## Summary

Artificial sweeteners are important part of everyday life. These substances are much sweeter than sugar but unlike sugar they provide fewer calories. The beneficial properties are used not only in food production, but also in the pharmacological and cosmetic industry. Nevertheless, their potential health risk is still under investigation. Several studies using various *in vitro* and *in vivo* tests were conducted to prove the genotoxicity, still the negative impact of artificial sweeteners was not unambiguously proven.

The theoretical part of this thesis describes the tests used to detect the genotoxicity of chemical substances *in vitro*. Furthermore, the most commonly used artificial sweeteners are described. The experimental part focuses on testing genotoxic potential of two artificial sweeteners, aspartame and saccharine, on cell line V79-4. The chosen artificial sweeteners were tested using newly established hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase assay. Both artificial sweeteners tested showed slightly increased mutation level at *Hprt* locus in V79-4 cells compared to control untreated cells.

Velké poděkování patří mé vedoucí bakalářské práce Mgr. Jitce Prachařové, Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky, rady, ochotu a čas, který mi věnovala v průběhu zpracování této bakalářské práce. Ráda bych poděkovala svým rodičům za umožnění studia a podporu.

Tato práce byla podpořena studentským grandovým projektem Univerzity Palackého v Olomouci (IGA PřF 2017 017).

## Obsah

1 Úvod .....	8
2 Cíl práce.....	9
3 Současný stav řešené problematiky.....	10
3.1 Genetická toxikologie.....	10
3.2 Metody testování genotoxického účinku látek na savčích buňkách <i>in vitro</i> .....	11
3.2.1 Hypoxantinguaninfosforibosyltransferázový mutační experiment (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase assay, HPRT/HGPRT assay) .....	11
3.2.2 Thymidinkinázový test (Mouse Lymphoma Assay, MLA).....	13
3.2.3 <i>In vitro</i> mikrojádrový test ( <i>In vitro</i> micronucleus test, MNvit) .....	14
3.2.4 Chromozomový aberační test (Chromosome Aberration Test) .....	16
3.2.5 Kometový test (Comet assay, Single cell gel electrophoresis, SCGE) .....	17
3.2.6 Výměna sesterských chromatid (Sister Chromatid Exchange, SCE).....	18
3.3 Další testy.....	19
3.4 Umělá sladidla.....	20
3.4.1 Sacharin .....	20
3.4.2 Cyklamát.....	21
3.4.3 Aspartam.....	22
4 Materiál a metody.....	24
4.1 Chemikálie .....	24
4.2 Použité roztoky.....	24
4.3 Biologický materiál .....	25
4.4 Kultivace buněk.....	25
4.5 Počítání buněk .....	25
4.6 Optimalizace počtu buněk.....	26
4.7 HPRT mutační experiment na buněčné linii V79-4 .....	26
4.8 Stanovení schopnosti buněk tvořit kolonie a hladiny mutací .....	27
5 Výsledky .....	29
6 Diskuze .....	33
7 Závěr.....	36
8 Seznam použité literatury .....	37
9 Seznam použitých zkratek .....	44
10 Přílohy .....	45



# 1 Úvod

Umělá sladidla jsou známa již od roku 1879, kdy byl objeven sacharin (Remsen *et* Fahlberg, 1879). Následovaly objevy dalších a dalších látek s podobnými vlastnostmi, jejichž výhodou je, že jsou bez kalorií a jsou mnohonásobně sladší než cukr. Uplatnění mají zejména v potravinářském průmyslu jako levnější alternativa cukru při výrobě potravin, ale mohou být součástí i různých léků a přípravků používaných pro osobní hygienu. Umělá sladidla se obecně řadí do skupiny potravinářských přídatných látek.

Ve spojitosti s rostoucí spotřebou, každodenní nebo nadměrnou konzumací umělých sladidel se začalo spekulovat o jejich možném negativním vlivu na lidský organismus. V dnešní době se v médiích můžeme setkat s odbornými, ale i laickými informacemi o potravinářských přídatných látkách a jejich potenciální škodlivosti. Umělá sladidla jsou spojována se vznikem rakoviny, cukrovky a jiných vážných onemocnění. Testování negativních účinků bylo předmětem mnoha odborných studií, ale nebyly získány jednoznačné výsledky, které by potvrdily nebo naopak vyvrátily genotoxické účinky těchto látek. Přesto bylo používání vybraných umělých sladidel v některých zemích světa úplně zakázáno. V současnosti je na trhu dostupná široká škála umělých sladidel ve formě tablet, kapek nebo sypkých směsí. Jsou obsažena ve velkém množství potravin a jiných produktů, a je tedy značně obtížné se jejich konzumaci zcela vyhnout. Je na každém z nás, jaké zaujmeme stanovisko k jejich používání, zda zvolíme přírodní nebo umělá sladidla, v každém případě je důležité dbát na dodržování doporučené denní dávky.

Povolení k používání potravinářských přídatných látek v Evropské unii musí být schváleno Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA). Používání umělých sladidel při výrobě potravin v České republice musí splňovat určité požadavky, které jsou vymezeny vyhláškou č. 4/2008 Sb. ze dne 3. ledna 2008 naposledy novelizovanou vyhláškou č. 122/2011 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin (Vyhláška č. 4/2008 Sb.).

## **2 Cíl práce**

1. Shromáždit a shrnout poznatky týkající se metod, které jsou využívány při testování genotoxického účinku chemických látek se zaměřením na vybraná umělá sladidla ve formě literární rešerše.
2. Zavést HPRT mutační experiment pro testování vybraných látek na živočišných buňkách do Laboratoře molekulární biofyziky a farmakologie Katedry biofyziky PřF UPOL.
3. Studovat genotoxický potenciál zvolených sladidel na buněčné linii V79.

### 3 Současný stav řešené problematiky

#### 3.1 Genetická toxikologie

Genetická toxikologie je odvětví toxikologie, které se zabývá studiem změn v genetické informaci buňky vzniklých působením genotoxických látek, genotoxinů, na organismus. Dále se zabývá studiem mechanismů účinků a posuzováním případného negativního vlivu těchto látek na organismus. Jako obor byla genetická toxikologie uznána v roce 1969, kdy byla založena i vědecká společnost Environmental Mutagen Society. Jedná se o obor, který se neustále rozvíjí. Vyvíjí se nové testy, díky nimž lze přesněji identifikovat a hodnotit genotoxický potenciál např. chemických látek, posoudit jejich bezpečnost a stanovit zdravotní rizika (Brusick, 1987). Projevem genotoxicity určité látky může být mutageneze nebo karcinogeneze. Existuje určitá spojitost mezi karcinogenezí a mutagenezí, ale ne všechny mutageny jsou karcinogenní (Smart, 2004). Působením genotoxické látky na genetický materiál buňky může dojít: (a) ke genovým mutacím, (b) k ztrátě, zdvojení nebo přeuspořádání částí chromozomu, (c) k aneuploidii, pro kterou je typická změna počtu chromozomů (Timbrell, 2000) nebo k polyploidii, která je charakteristická změnou počtu celých chromozomálních sad (Smart, 2004). Mutace, které vzniknou v zárodečných buňkách, mohou být přeneseny do buněk další generace, zatímco mutace v buňkách somatických se dále nepřenášejí. Genotoxické látky, které způsobují mutace zárodečných buněk zároveň způsobují i mutace v buňkách somatických. Tyto změny mohou být příčinou vzniku dědičných onemocnění, rakoviny, některých autoimunních a degenerativních onemocnění, vrozených vad a mohou mít také vliv na reprodukci.

K testování genotoxicity látek se využívá velké množství krátkodobých nebo dlouhodobých testů na savčích buněčných liniích (Williams, 1989). Všechny nové látky, které budou dále využívány člověkem, musí podobnými testy úspěšně projít. Testování se vztahuje např. na léky, hnojiva, domácí prostředky, potravinová aditiva a průmyslové chemikálie (Proudlock, 2016).

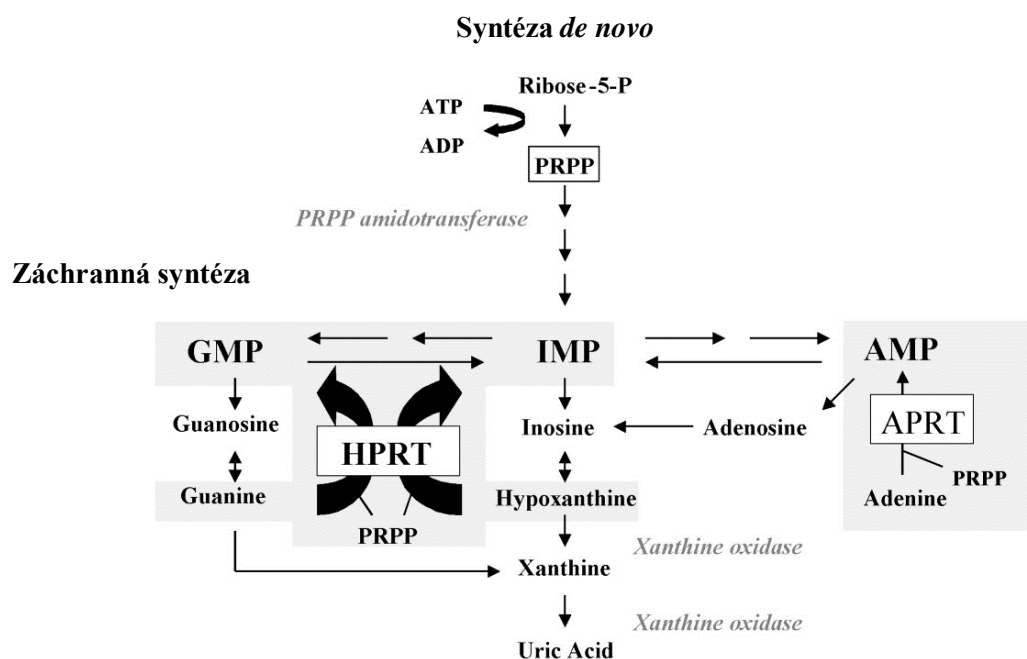
### 3.2 Metody testování genotoxického účinku látek na savčích buňkách *in vitro*

Pomocí krátkodobých nebo dlouhodobých testů se zjišťuje a hodnotí genotoxický účinek látek, který může způsobovat poškození různého rozsahu, jak bylo popsáno v předchozí kapitole. Nejčastěji bývají detekovány bodové mutace, mutace vzniklé posunem čtecího rámce, změny struktury a počtu chromozomů aj. Kromě *in vitro* testů na savčích buňkách existují i další postupy, kdy se dané látky testují na kulturách kvasinek, bakterií nebo octomilkách (Smart, 2004; Young, 2002). Tyto organismy se od savčích buněk značně liší. Stejná látka tak může vyvolat odlišnou odpověď v rozdílných organismech a nemusí být odhalen genotoxický potenciál látky a její vliv na člověka (Johnson, 2012).

Mezi základní *in vitro* testy využívané ke zjišťování genotoxického potenciálu látek na savčích buněčných liniích patří: hypoxantinguaninfosforibosyltransferázový mutační experiment, thymidinkinázový test, mikrojaderný test, chromozomový aberační test, kometový test a test výměny sesterských chromatid. Uvedené testy jsou podrobněji popsány v následujících podkapitolách.

#### 3.2.1 Hypoxantinguaninfosforibosyltransferázový mutační experiment (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase assay, HPRT/HGPRT assay)

HPRT mutační experiment je využíván k detekci genových mutací v savčích buňkách. Pomocí tohoto experimentu lze testovat mnoho potenciálně genotoxických látek způsobujících mutace v HPRT genu (Johnson, 2012), který se nachází na dlouhém raménku chromozomu X. HPRT gen kóduje enzym hypoxantinguaninfosforibosyltransferázu (HPRT). Tento tzv. cytoplazmatický enzym, není pro buňku esenciální a jeho množství v buňce odpovídá 0,005-0,04 % všech proteinů. Vyskytuje ve všech savčích buňkách (Stout *et Caskey*, 1985), ale nejvyšší aktivita byla pozorována v mozku a varlatech (Saigal *et al.*, 2006). HPRT společně s adeninfosforibosyltransferázou (APRT) hrají důležitou roli v metabolismu purinových nukleotidů, konkrétně při záchranné (recyklační nebo šetřící) syntéze tzv. „salvage pathway“. Tato reakce je pro buňku energeticky výhodnější než syntéza nukleotidů *de novo*. Z tohoto důvodu je až 90 % purinových bází recyklováno a znovu použito k syntéze nukleotidů. Úkolem HPRT při záchranné syntéze nukleotidů je přeměna hypoxantinu a 5'-fosforibosyl-1-pyrofosfátu (PRPP) na inosinmonofosfát, guaninu a PRPP na guanosinmonofosfát. Během reakce dochází k uvolnění difosfátu. APRT pak katalyzuje přeměnu adeninu a PRPP na adenosinmonofosfát (Stout *et Caskey*, 1985). Metabolismus purinových nukleotidů je podrobněji znázorněn na obr. 1.



Obr. 1: Metabolismus purinových nukleotidů (ATP: adenosin trifosfát, ADP: adenosin difosfát, PRPP: 5'-fosforibosyl-1-pyrofosfát, GMP: guanosin monofosfát, HPRT: hypoxantinguaninfosforibosyltransferáza, IMP: inosin monofosfát, AMP: adenosin monofosfát, APRT: adeninfosforibosyltransferáza, převzato z: Torres *et Puig*, 2007 a upraveno).

Poruchy enzymové aktivity HPRT mají za následek vznik různých syndromů (Seegmiller *et al.*, 1967). Úplný deficit HPRT vede ke vzniku dědičného Lesch-Nyhanova syndromu, který byl poprvé popsán v roce 1964 (Lesch *et Nyhan*, 1964). Projevuje se hyperurikémií (zvýšenou produkcí kyseliny močové), křečemi, mentální retardací, hyperreflexií a sebepoškozováním. Částečný deficit HPRT je příčinou vzniku Kelley-Seegmillerova syndromu, který se projevuje hlavně vznikem dny, ale nedochází k neurologickému postižení (Saigal *et al.*, 2006).

HPRT mutační experiment poprvé provedli Furth *et al.* (1981) na lidské lymfoblastoidní buněčné linii kultivované v mikrotitračních destičkách. K experimentu je dále vhodné použít např. buněčné linie CHO, V79, L5178Y, AS52 nebo TK6 (OECD, 2015a). Buňky musí mít jednu funkční kopii genu kódující HPRT (Anonymous 1), jsou pro HPRT hemizygotní (Keohavong *et al.*, 2005). Výběr těchto buněk se provádí pomocí HAT média (Monnat, 2009), které bylo poprvé použito v roce 1962 W. Szybalskim a jeho ženou. Médium je složeno z aminopterinu, hypoxantinu a thymidinu. Aminopterin inhibuje syntézu nukleotidů *de novo*. Přítomnost thymidinu a hypoxantinu v HAT médiu umožňuje buňkám s funkčním HPRT

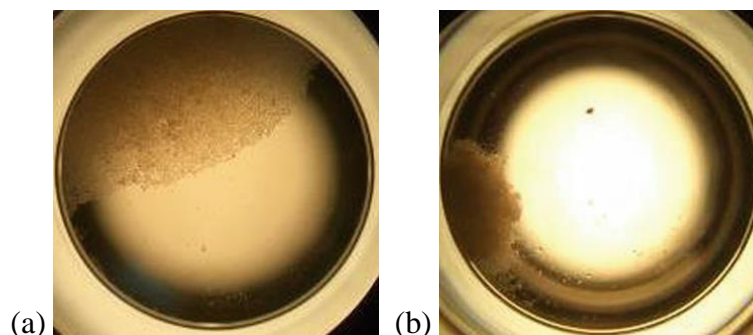
genem přežít. Buňky s mutací v HPRT genu z důvodu zablokování obou cest biosyntézy nepřežívají (Bigda *et* Koszałka, 2013).

HPRT mutačním experimentem lze detekovat 6-thioguanin (6-TG) nebo 8-azaguanin (8-AG) rezistentní mutanty. Buňky s funkčním HPRT genem jsou ošetřeny testovanou látkou. V případě, že testované látky způsobí mutaci v HPRT genu, jsou tyto buňky schopné přežít a tvořit kolonie v přítomnosti toxických purinových analogů jako je 6-TG nebo 8-AG (Albertini, 2001). Tyto toxické analogy nejsou zabudovány do DNA, a to umožňuje buňkám přežít. Pokud testovaná látka nezpůsobí mutaci v HPRT genu, dojde u těchto buněk k inkorporaci 6-TG/8-AG do DNA a buňky nepřežívají (Johnson, 2012).

### 3.2.2 Thymidinkinázový test (Mouse Lymphoma Assay, MLA)

Thymidinkinázový test je jedním z nejpoužívanějších *in vitro* genotoxických testů k detekci genových mutací způsobených testovanou látkou. Je znám i pod názvem Mouse Lymphoma Assay (Johnson, 2012), jelikož se k testování využívá myší lymfoidní buněčná linie L5178Y (TK<sup>+/-</sup>). Enzym thymidinkináza (TK) je kódován genem, který se nachází na chromozomu 11 a stejně jako HPRT se účastní metabolismu nukleotidů a není pro buňku esenciální (Lloyd *et* Kidd, 2012). Testováním chemických látek na savčích buňkách lze zjistit indukované mutace v lokusu genu kódujícího thymidinkinázu u buněčné linie L5178Y (TK<sup>+/-</sup>). Tyto buňky mají pouze jednu funkční kopii daného genu (Applegate *et al.*, 1990).

Po ošetření buněčné linie L5178Y (TK<sup>+/-</sup>) potenciální genotoxickou látkou jsou buňky selektovány pomocí toxického pyrimidinového analogu např. trifluorothymidinu (TFT, Anonymous 2). TFT je toxický analog thymidinu a po začlenění do DNA způsobuje inhibici buněčného metabolismu a zastavení buněčného dělení (OECD, 2015b). Buňky, v nichž došlo vlivem testované látky k mutaci v TK genu (TK<sup>-/-</sup>), jsou rezistentní k TFT a mají schopnost přežít a tvořit kolonie v jeho přítomnosti. Pokud testovaná látka nezpůsobila mutaci v TK genu a buňky tak mají TK gen funkční (TK<sup>+/-</sup>), je TFT inkorporován do DNA a v jeho přítomnosti buňky nepřežívají (Johnson, 2012). Na základě toho, jaký typ mutace testovaná látka způsobila, tvoří buňky s mutací v TK genu malé (<0,6 mm) nebo velké (>0,6 mm) kolonie (Moore *et* Doerr, 1990). Buňky tvořící malé kolonie rostou pomaleji a testovaná látka zde zapříčinila vznik chromozomových aberací, které postihují i chromozom 11. Naopak velké kolonie buněk rostou stejnou rychlostí jako TK<sup>+/-</sup> buňky a testovaná látka vyvolala bodové mutace (Clements, 2000). Kolonie se mezi sebou liší také vzhledem. Velké kolonie mají hladký okraj a nevytváří takové shluky jako malé kolonie s nerovnoměrným okrajem (viz obr. 2) (Lloyd *et* Kidd, 2012).



Obr. 2: Kolonie vzniklé při thymidinkinázovém testu (a) velké kolonie s hladkým okrajem, (b) malé kolonie s nerovnoměrným okrajem (převzato z: Lloyd *et* Kidd, 2012).

HPRT mutační experiment a thymidinkinázový test jsou založeny na velmi podobném principu, přesto jsou mezi nimi určité rozdíly (Williams, 1989). Frekvence spontánních mutací je většinou nižší v HPRT genu než v TK genu. V HPRT genu je vysoký podíl mutací letální (Johnson, 2012). Schématické znázornění principu HPRT mutačního experimentu a thymidinkinázového testu je v příloze 1.

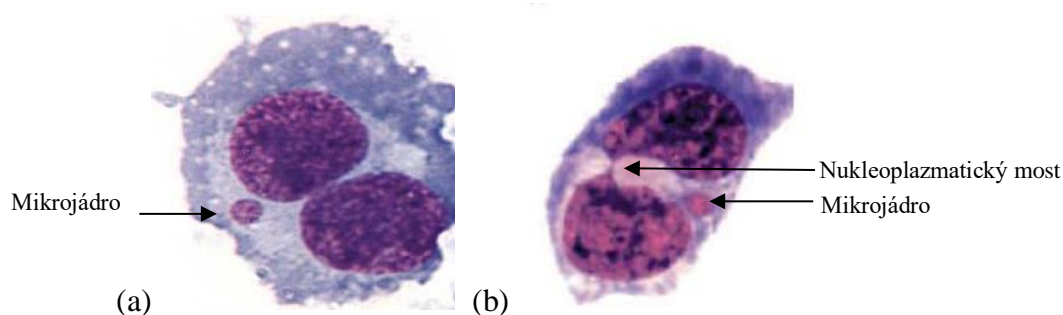
### 3.2.3 *In vitro* mikrojádrový test (*In vitro* micronucleus test, MNvit)

Mikrojádrový test je relativně jednoduchá a rychlá metoda, která byla navržena W. Schmidem v roce 1975 (Schmid, 1975). Využívá se k *in vitro* detekci poškození na úrovni chromozómů, které je způsobené testovanou látkou (Doherty, 2012). Mikrojádrový test může být proveden také *in vivo* (OECD, 2016a).

K experimentu se využívají převážně myeloblasty, erytroblasty a myelocyty (Schmid, 1975). Při testování je důležité, aby v těchto buňkách ošetřených testovanou látkou proběhlo buněčné dělení. Pokud má testovaná látka klastogenní účinky, jejím vlivem dochází v buňce např. ke zlomům chromozómů a vznikají fragmenty. Následkem působení aneugenní látky je ztráta celých chromozómů, která vede k aneuploidii (Doherty, 2012). Na vzniklé fragmenty nebo opožděné chromozomy se neupíná dělicí vřeténko a nejsou tak taženy k opačným pólům buňky. Následně se v telofázi buněčného cyklu vytvoří okolo fragmentů bez centromery (acentrických chromozómů) nebo celých opožděných chromozómů membrána a vznikne útvar, který je menší než hlavní jádro tzv. mikrojádru. Mikrojádru je viditelné v interfázi a je přenášeno do dceřiných buněk (viz obr. 3 a) (Fenech, 2000). Tyto útvary mají oválný nebo kulatý tvar, jejich průměr se pohybuje v rozmezí 1/16-1/3 průměru hlavního jádra a intenzita zbarvení mikrojader je většinou podobná jako u jádra. Mikrojádru nesmí být spojena s hlavním

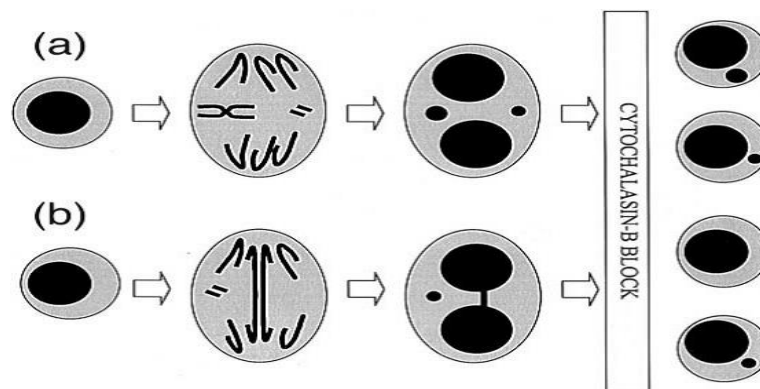
jádrem a v případě, že se dotýkají, musí být mezi nimi zřetelná hranice (Fenech *et al.*, 2003). V erythrocytech jsou mikrojádra známa pod názvem Howell-Jollyho tělíska (Doherty, 2012).

Test může probíhat i v přítomnosti cytochalasinu-B (Cyt-B), tzv. cytokinezi blokující mikrojaderný test (cytokinesis-blok micronucleus assay; Fenech, 2000). Cyt-B je inhibitor cytokineze, tj. cytoplazmatického dělení (Estensen, 1971). U buněk, které prošly jaderným dělením, inhibuje polymeraci aktinu, který je potřebný k vytvoření kontraktálního prstence mezi sesterskými jádry. Neproběhne tak rozdělení buněk a vznikají dvoujaderné buňky. V těchto buňkách mohou být někdy kromě mikrojadra pozorovány mezi jádry nukleoplazmatické mosty (NPB, viz obr. 3 b). NPB vznikají z dicentrických chromozómů, jejichž centromery byly v anafázi taženy k opačným pólům buňky (Fenech, 2000).



Obr. 3: (a) Dvoujaderná buňka s mikrojádro, (b) dvoujaderná buňka s mikrojádro a nukleoplazmatickým mostem (převzato z: Fenech *et al.*, 2003).

Schematicky je vznik mikrojadra a NPB znázorněn na obr. 4.



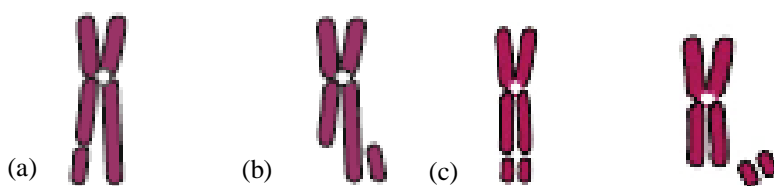
Obr. 4: (a) Opožděný chromozom nebo fragment lze v interfázi pozorovat jako mikrojádra v případě, že neproběhl standardní rozchod chromozómů k pólům buňky, (b) tvorba NPB z dicentrického chromozomu, jehož centromery byly taženy k opačným pólům buňky (převzato z: Fenech, 2000).



Vyhodnocení mikrojader se provádí pomocí mikroskopu, automatické obrazové analýzy nebo průtokového cytometru (Varga *et al.*, 2004). K identifikaci klastogenního nebo aneugenního účinku testované látky se používá metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Pomocí značené sondy lze zjistit, zda mikrojádra obsahují pouze fragmenty chromozomů nebo celý chromozom (Migliore *et al.*, 1996).

### 3.2.4 Chromozomový aberační test (Chromosome Aberration Test)

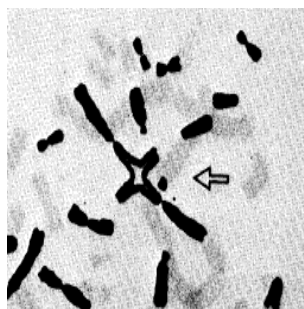
Ke zjištění, zda testovaná látka způsobuje strukturní aberace chromozomů, se používá *in vitro* chromozomový aberační test (Clare, 2012). Látky způsobující poškození chromozomů se nazývají klastogeny. Vlivem klastogenů mohou vznikat chromatidové nebo chromozomové aberace (Savage 1976). Častěji se vyskytuje chromatidový typ aberace (OECD, 2016b), pro který je charakteristické poškození pouze jedné chromatidy na konci S nebo v G<sub>2</sub> fázi buněčného cyklu. Sleduje se vytvoření mezer („gaps“, viz obr. 5 a), nebo zlomu a vzniku acentrického fragmentu (viz obr. 5 b). Naopak chromozomový typ aberace vzniká v průběhu G<sub>1</sub> fáze buněčného cyklu. V S fázi je poškození přeneseno na druhé nově vzniklé vlákno (viz obr. 5 c). Kromě zlomů mohou být pozorovány také translokace, tvorba prstencových nebo dicentrických chromozomů (Savage, 1976). Chromozomové mutace jsou spojovány se značným množstvím genetických onemocnění. Mohou způsobovat změny v onkogenech nebo tumor supresorových genech a mohou být příčinou vzniku rakoviny (OECD, 2016b).



Obr. 5: Vznik chromatidových aberací (a) mezery, (b) zlomu a (c) chromozomové aberace (převzato z: Clare, 2012 a upraveno).

Chromozomový aberační test se provádí na savcích lymfocytech periferní krve, také mohou být použity buněčné linie CHO, V79, TK6 aj. (OECD, 2016b). Lymfocyty se v *in vivo* podmínkách nedělí. Z tohoto důvodu se ke stimulaci dělení lymfocytů v *in vitro* podmínkách používá mitogen fytohemaglutinin (Clare, 2012). Buňky jsou ošetřeny testovanou látkou a následně je zastaveno buněčné dělení v metafázi pomocí kolcemidu nebo kolchicinu. Metafázní chromozomy obarvené Giemsou jsou vyhodnoceny pomocí mikroskopu. Počítají se

chromatidové nebo chromozomové zlomy, ale také další vzniklé útvary (viz obr. 6) (OECD, 2016b).



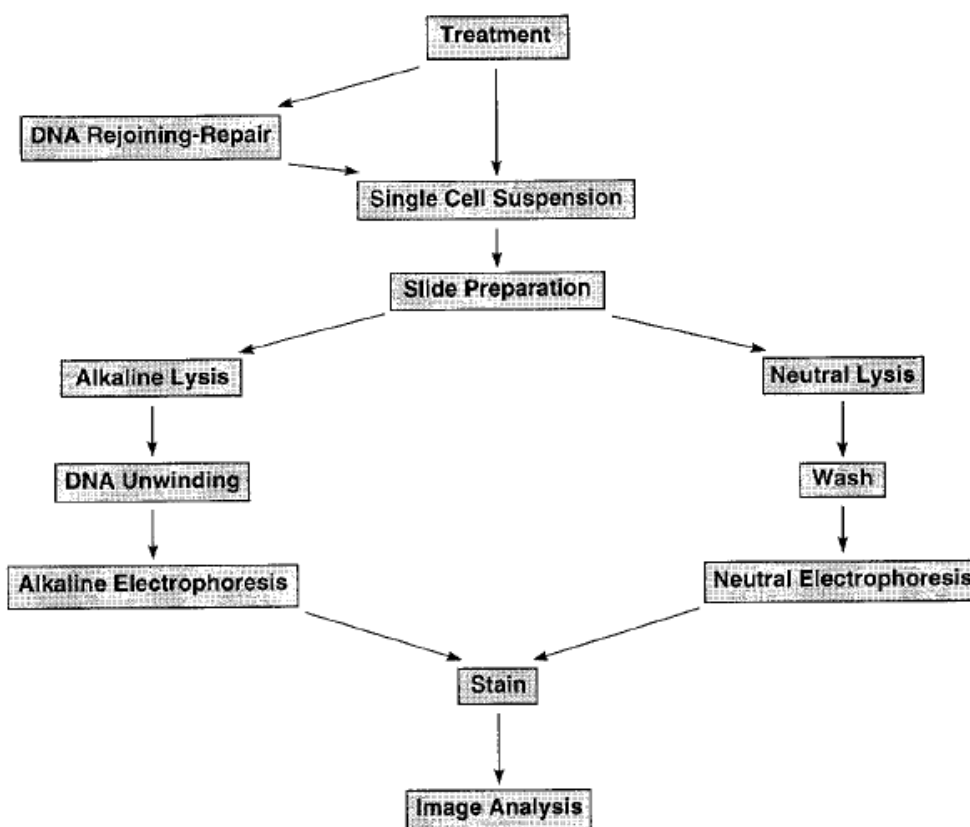
Obr. 6: Spojení chromozomů vzniklé po 24 h od ošetření sacharinem sodným o koncentraci 4 mg/ml (Ishidate *et* Odashima, 1977).

### 3.2.5 Kometový test (Comet assay, Single cell gel electrophoresis, SCGE)

Dalším testem ke stanovení genotoxicity je kometový test, který umožňuje detekovat jednořetězcové nebo dvouřetězcové zlomy DNA na úrovni jednotlivých buněk (Collins *et al.*, 2008). Metoda byla poprvé publikována v roce 1984 dvojicí vědců Östlingem a Johansonem (Ostling *et* Johanson, 1984). V roce 1988 Singh *et al.* představili alkalickou SCGE (Singh *et al.*, 1988). Přestože od zavedení tohoto testu uběhlo mnoho let, je stále ve fázi růstu a zdokonalování (Collins *et al.*, 2008). Testování se provádí např. na buněčných liniích L5178Y, TK6 nebo lymfocytech periferní krve (Burlinson, 2012) za alkalických nebo neutrálních podmínek (Collins *et al.*, 2008). Schéma obou variant provedení je znázorněno na obr. 7. Výhodou alkalické SCGE je možnost detekovat i jednořetězcové zlomy a alkalilabilní místa (Burlinson, 2012).

Buňky ošetřené studovanou látkou jsou během tohoto testu opatrně sklizeny pomocí trypsinu, následně smíchány s nízkotuhnoucí agarózou a přeneseny na mikroskopické sklíčko. Poté jsou buňky vystaveny lyzačnímu roztoku, který způsobí lýzi membrán a také musí být odstraněny proteiny ve vzorku. Na sklíčku pak zůstane pouze DNA (Fairbairn *et al.*, 1995). Následuje elektroforéza, která se provádí přímo na podložním sklíčku obsahujícím vzorek. U alkalické varianty kometového testu bývá DNA před elektroforézou denaturována. Pokud je ve vzorcích přítomna poškozená DNA, pak může být pod mikroskopem pozorován útvar podobný kometě, odtud pochází název této metody (Klaude *et al.*, 1996). DNA poškozená testovanou látkou migruje v elektroforetickém gelu směrem k anodě a tvoří tak útvar podobný „ocasů“ komety, zatímco „hlava“ komety je tvořena nepoškozenou DNA (Collins *et al.*, 1997). Po proběhnutí elektroforézy jsou vzorky obarveny fluorescenčním barvivem např. ethidium

bromidem (Ostling *et al.*, 1984), DAPI (Gedik *et al.*, 1992) aj. a výsledky jsou vyhodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu (Tice *et al.*, 2000).



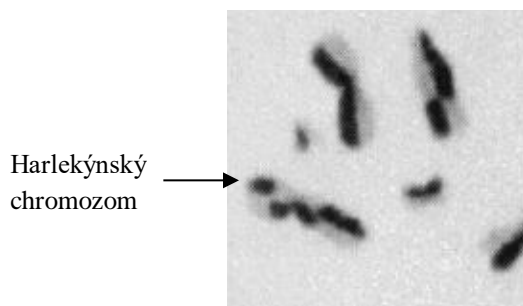
Obr. 7: Základní kroky kometového testu v alkalických i neutrálních podmínkách (převzato z: Fairbairn *et al.*, 1995).

Tato metoda má mnoho výhod. Především vykazuje citlivost i při nízkých hladinách poškození DNA, je rychlá na provedení a výhodou je i nízká cena. K testování není potřeba velkého množství buněk a celý experiment probíhá v krátkém časovém období (Tice *et al.*, 2000). Kometový test může být proveden také *in vivo* (Burlinson, 2012).

### 3.2.6 Výměna sesterských chromatid (Sister Chromatid Exchange, SCE)

V průběhu replikace DNA dochází k výměně částí DNA mezi sesterskými chromatidami (Wilson *et al.*, 2007). K výměnám může docházet spontánně, ale zvýšená frekvence SCE může být spojená s působením genotoxických látek. Analog thymidinu, 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), je přidán do média po dobu dvou buněčných cyklů. BrdU je v S fázi inkorporován do nově syntetizovaných vláken DNA. Poté jsou metafázní chromozomy přeneseny na mikroskopické sklíčko a obarveny např. fluorescenčním barvivem

a vizualizovány pomocí mikroskopu. Části chromozomu, kde je inkorporován BrdU, se barví světleji než ostatní části chromozomu (Latt, 1974). Takový chromozom bývá často označován jako harlekýnský (viz obr. 8) (Perry *et* Wolff, 1974). SCE je velmi citlivá metoda k identifikaci chemických mutagenů (Wolff, 1977).



Obr. 8: Harlekýnský chromozom vzniklý výměnami sesterských chromatid po ošetření buněk sacharinem (převzato z: Wolff *et* Rodin, 1978).

### 3.3 Další testy

Kromě výše zmíněných existují i další testy využívané k hodnocení genotoxického potenciálu chemických látek. Tato bakalářská práce je zaměřena především na testy využívající savčí buňky. I přesto bych však dále zmínila také Amesův test, protože se jedná o jeden z nejrozšířenějších bakteriálních testů ke zjišťování genotoxického potenciálu látek.

#### **Amesův test** (Salmonella test, Ames test)

B. N. Ames poprvé popsal tento jednoduchý bakteriální test založený na schopnosti testovaných látek vyvolat reverzní (zpětné) mutace u mutantního kmene *Salmonella typhimurium* s defektní biosyntézou histidinu (his<sup>-</sup>). Z toho vyplývá, že tento bakteriální kmen není schopen růst na médiu bez obsahu histidinu. V případě, že bude testovaná látka mutagenní, dojde k reverzní mutaci a mutované bakterie budou schopny si samy syntetizovat histidin, a tudíž tvořit kolonie na médiu bez přídavku histidinu (Mortelmans *et* Zeiger, 2000). Pomocí testu lze určit látky, které způsobují bodové mutace např. delece, substituce a adice (OECD, 1997).

### 3.4 Umělá sladidla

V této kapitole jsou popsány látky, které patří do první generace umělých sladidel. V experimentální části bakalářské práce byla použita sladidla aspartam a sacharin k testování genotoxicity pomocí HPRT mutačního experimentu.

Umělá sladidla jsou syntetické sloučeniny, které mají sladkou chuť (Vrbová, 2001). Patří mezi potravinářské přídatné látky neboli aditiva (Klescht *et al.*, 2006). Lze je rozdělit na kalorická a nízkokalorická sladidla. Mezi kalorická sladidla patří zejména polyalkoholy jako jsou sorbitol, mannitol a xylitol, které mají podobnou sladivost jako cukr (Whitehouse *et al.*, 2008). Nízkokalorická sladidla jsou několikanásobně sladší než cukr, ale bez kalorií, proto se využívají hlavně v potravinářském průmyslu jako levnější náhražka cukru. Nezpůsobují tvorbu zubního kazu a jsou vhodná pro lidi trpící nadváhou nebo diabetiky (Vrbová, 2001). Jejich spotřeba celosvětově stoupá (Čopíková *et al.*, 2013) a o případných negativních účincích umělých sladidel na lidský organismus je vedeno mnoho spekulací. Někteří vědci upozorňují na to, že umělá sladidla mohou být příčinou celé řady onemocnění jako je např. leukemie, lymfomy a další typy rakovinových onemocnění, Parkinsonova a Alzheimerova choroba, autismus nebo systémový lupus erythematosus (Whitehouse *et al.*, 2008).

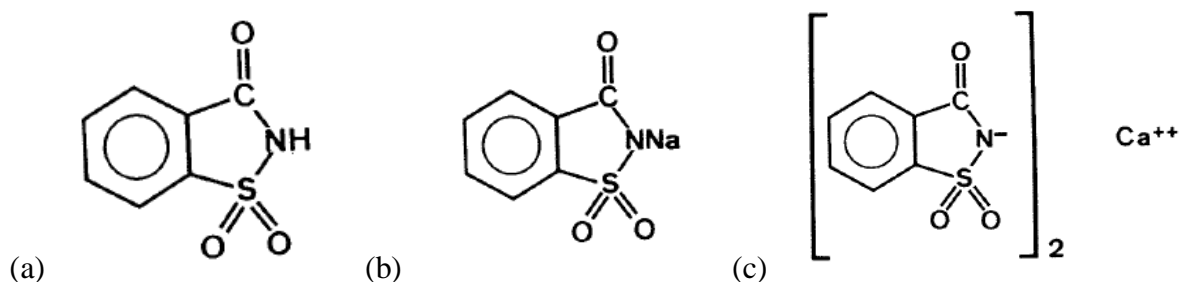
Můžeme se setkat i s rozdělením umělých sladidel na sladidla první generace, kam se řadí aspartam (E951), cyklamát (E952) a sacharin (E954). Druhou skupinou jsou sladidla druhé generace, kam patří acesulfam-K (E950), sukralosa (E955) a mnoho dalších (Vrbová, 2001; Weihrauch *et Diehl*, 2004). Některé zmíněné látky jsou podrobněji popsány v následujících třech podkapitolách.

#### 3.4.1 Sacharin

Sacharin je prvním objeveným umělým sladidlem. Byl objeven dvěma vědci: Constantinem Fahlbergem a Ira Remsenem v roce 1879 (Remsen *et Fahlberg*, 1879). Sacharin je nahořklá látka bez kalorií a je 200-700x sladší než cukr (Whitehouse *et al.*, 2008). Z důvodu jeho nahořklé chuti se sacharin kombinuje s jinými sladidly. Výsledkem je potlačení nežádoucí chuti a směs má také vyšší sladivost (Vrbová, 2001). Po chemické stránce je sacharin imid 2-sulfobenzoové kyseliny (Doležal, 2009) a synteticky se vyrábí z toluenu. Nejčastěji se používají jeho sodné, vápenaté nebo draselné soli, které jsou označeny mezinárodním kódem E954 (Vrbová, 2001). Jejich strukturní vzorce jsou znázorněny na obr. 9. V těle není sacharin vstřebáván a je vylučován v nezměněné podobě (Whitehouse *et al.*, 2008). Sacharin je součástí nealkoholických nápojů, cukrovinek, nízkokalorických potravin, žvýkaček, omáček,

marmelád, vitamínových přípravků, ale vyskytuje se také v hygienických potřebách, jako jsou zubní pasty nebo ústní vody (Arnold, 1984). Přijatelná denní dávka (ADI) je 5 mg na kg tělesné hmotnosti (Whitehouse *et al.*, 2008).

Genotoxické účinky sacharinu na člověka nebyly zcela prokázány. Byla však provedena řada studií, při kterých bylo zjištěno, že tato látka způsobuje rakovinu u pokusných zvířat, zejména pak rakovinu močového měchýře. Další studie, ale tato tvrzení vyvracejí. Přesto americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v roce 1977 doporučil zákaz používání sacharinu, jelikož může způsobovat rakovinu. Sacharin nebyl úplně zakázán, pouze potraviny obsahující sacharin musely být označeny nápisem, že obsahují dané umělé sladidlo. Jelikož nebyl negativní vliv sacharinu zcela potvrzen, americké Ministerstvo zdravotnictví v květnu roku 2000 odstranilo sacharin ze seznamu karcinogenů. V České republice je povoleno používat sacharin v omezeném množství (Vrbová, 2001), ale např. v Kanadě je sacharin úplně zakázán (Arnold, 1983).



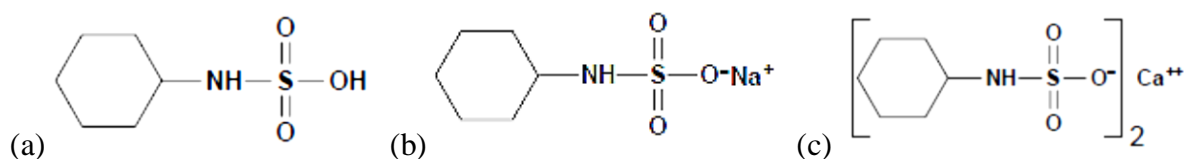
Obr. 9: Strukturní vzorce (a) sacharinu, (b) sacharinu sodného, (c) sacharinu vápenatého (převzato z: International Agency for Research on Cancer, 1980).

### 3.4.2 Cyklamát

Michael Sveda, student Univerzity Illinois, objevil cyklamát v roce 1937 (Hunt *et al.*, 2011). Cyklamát je společné označení pro kyselinu cyklamovou nebo její sodnou či vápenatou sůl. Strukturní vzorce kyseliny cyklamové a jejích solí jsou znázorněny na obr. 10. FDA v roce 1951 schválil uvedení cyklamátu sodného na americký trh (Bopp *et al.*, 1986). Tato látka je označena mezinárodním kódem E952. Má slabě chemicky sladkou chuť a je 30-60x sladší než cukr. Většinou se používá cyklamát v kombinaci se sacharinem a výsledkem je směs s vyšší sladivostí (Vrbová, 2001). ADI cyklamátu bylo stanoveno na 0-7 mg na kg tělesné hmotnosti (European Commission, 2000).

V roce 1970 byla zjištěna spojitost mezi konzumací cyklamátu a zvýšením výskytu rakoviny močového měchýře u myši (Price *et al.*, 1970). Od tohoto roku je používání této látky

ve Spojených státech amerických a v dalších zemích světa zakázáno (Takayama *et al.*, 2000). Kromě samotného cyklamátu byly studovány i jeho metabolity. Cyklamát je v těle přeměňován na cyklohexylamin, který je toxický a může tak způsobovat nežádoucí účinky (Renwick, 1986). Nebylo však přímo prokázáno, že cyklamát nebo jeho metabolity by mohly být příčinou nádorového bujení. Uvádí se, že spíše může zvyšovat sílu jiných karcinogenů. V České republice je podle vyhlášky č. 4/2008 Sb. použití kyseliny cyklamové a její sodné nebo vápenaté soli jako přídatných látek v potravinách povoleno.

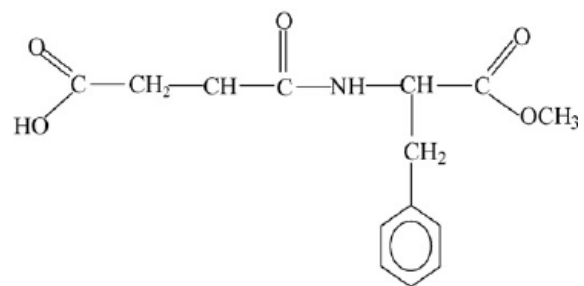


Obr. 10: Strukturní vzorce: (a) kyseliny cyklamové, (b) cyklamátu sodného, (c) cyklamátu vápenatého (převzato z: International Agency for Research on Cancer, 1999).

### 3.4.3 Aspartam

Aspartam byl objeven v roce 1965, je to dipeptid s chemickým názvem  $\alpha$ -L-aspartyl-L-fenylalanin 1-methylester (Rencüzoğulları *et al.*, 2004). Jeho strukturní vzorec je znázorněn na obr. 11. V roce 1981 FDA schválil aspartam jako stolní sladidlo a byl uveden na trh pod názvem NutraSweet (Weihrauch *et Diehl*, 2004). Je 200x sladší než sacharóza (Whitehouse *et al.*, 2008) a používá se jako sladidlo při výrobě žvýkaček, pudinků, jogurtů, želatin, nápojů, léků atd. (Rencüzoğulları *et al.*, 2004) nebo jako látka pro zvýraznění chuti. Nevýhodou je, že aspartam zvyšuje chuť k jídlu. Je dostupný v tabletách nebo sypkých směsích a má mezinárodní označení E951 (Vrbová, 2001). ADI aspartamu bylo stanoveno na 50 mg na kg tělesné hmotnosti (Whitehouse *et al.*, 2008).

Stejně jako u výše zmíněných umělých sladidel nebyla genotoxicita aspartamu jednoznačně prokázána. Pomocí řady studií na myších, psech a králících bylo zjištěno, že je genotoxicita velmi nízká. Při zahřívání na vysokou teplotu je aspartam rozkládán na fenylalanin, methanol a kyselinu asparagovou, případně může vznikat diketopiperazin. Při testování tohoto metabolitu nebyla pozorovaná zvýšená toxicita (Ishii *et al.*, 1981). Vzniklý fenylalanin může vyvolat problémy u lidí, kteří mají poruchu metabolismu fenylalaninu tzv. fenylketonurii. Z tohoto důvodu potraviny obsahující aspartam musí být speciálně označeny (Marinovich *et al.*, 2013). Dalším metabolitem je metanol, který se rozkládá na formaldehyd. Ten podle některých studií může být příčinou vzniku rakoviny (Schwartz, 1999).



Obr. 11: Strukturní vzorec aspartamu (převzato z: Medeiros *et al.*, 2008).



## 4 Materiál a metody

### 4.1 Chemikálie

- Médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biosera) s přidavkem 10% fetálního bovinního séra (FBS) a antibiotik: 10 U/ml penicilinu a 10 µg/ml streptomycinu (Sigma-Aldrich)
- Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich)
- Ethylmethansulfonát (Fluka)
- Chlorid sodný (Sigma-Aldrich)
- Chlorid draselný (Sigma-Aldrich)
- Hydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich)
- Trypanová modř (Duchefa)
- Uhličitan sodný (Sigma-Aldrich)
- Methanol (Penta)
- 6-thioguanin (Sigma-Aldrich)
- Tablety aspartamu (IRBIS, spol. s.r.o)
- Tablety sacharinu (FAN sladidla, Česká republika)

### 4.2 Použité roztoky

- Zásobní roztok fosfátového pufru (PBS) 10x pH 7,4:
  - 150mmol/l chlorid sodný
  - 2mmol/l chlorid draselný
  - 10mmol/l hydrogenfosforečnan sodný
  - 2 mmol/l dihydrogenfosforečnan draselný
- 1% roztok methylenové modři:
  - 1 g modři rozpustit ve 100 ml 50% methanolu
- 0,5% roztok uhličitanu sodného:
  - 0,1 g uhličitanu sodného rozpustit ve 20 ml dH<sub>2</sub>O
- Zásobní roztok 6-thioguaninu  $c = 500 \mu\text{g/ml}$ :
  - rozpustit 2,5 mg v 5 ml 0,5% roztoku uhličitanu sodného
  - zásobní roztok přefiltrovat

### **4.3 Biologický materiál**

K provedení HPRT mutačního experimentu byla použita buněčná linie V79-4 odvozená od fibroblastů křečička čínského (ATCC, CCL-93). Tato buněčná linie byla zvolena na základě informací získaných z odborných publikací. Další typy buněčných linií, které lze použít k HPRT mutačnímu experimentu, jsou uvedeny v příloze č. 2.

### **4.4 Kultivace buněk**

Buňky V79-4 byly kultivovány v médiu DMEM s přidavkem 10% FBS, 10 U/ml penicilinu a 10 µg/ml streptomycinu. Buňky byly drženy v inkubátoru při teplotě 37 °C a atmosféře s 5% obsahem CO<sub>2</sub>. Při práci s buňkami bylo nutné dodržovat aseptické podmínky. Po dosažení 85-95% konfluency byly tyto adherentní buňky pasážovány za pomoci trypsinu dle standardního protokolu. Kultivační médium a fosfátový pufr (PBS) byly před začátkem práce předeřhřaty na 37 °C. Buňky v plastové kultivační láhvi T75 (plocha dna 75 cm<sup>2</sup>, TPP) byly zkontrolovány pod mikroskopem a přeneseny do laminárního boxu. Z láhve bylo odstraněno staré médium a buňky byly opláchnuty 2 ml PBS, který byl hned odsát. K buňkám byl přidán 1 ml roztoku trypsin-EDTA a kultivační láhev byla vložena na 4-5 min do inkubátoru. Po uplynulé době byly buňky opatrně sklepany z kultivačního povrchu a bylo přidáno 5 ml média s obsahem séra, aby byl zastaven účinek roztoku trypsinu. Opětovným nasáváním a vysáváním buněk došlo k rozvolnění buněčných shluků a vzniku buněčné suspenze. Do nové kultivační láhve bylo pipetováno 13 ml čerstvého média a 1 ml buněčné suspenze s obsahem 10<sup>6</sup> buněk. Kultivační láhev byla poté uložena do inkubátoru.

### **4.5 Počítání buněk**

K vyšetí přesného počtu buněk potřebných pro provedení experimentů bylo nezbytné dané buňky nejprve spočítat. Odebraný vzorek buněk byl obarven trypanovou modří v poměru 1:1 (buněčná suspenze : trypanová modř) a pipetován na speciální sklíčko, které bylo poté vloženo do automatické počítačky (TC20 automated cell counter, Bio-Rad Laboratories, USA). Celkový počet buněk a procento živých buněk bylo vyhodnoceno přístrojem automaticky na základě analýzy obrazu. Živé buňky nemají porušenou cytoplazmatickou membránu a barvivo tak neproniká do buňky, případně je z intracelulárního prostoru aktivně transportováno ven. Naopak mrtvé buňky mají cytoplazmatickou membránu poškozenou, barvivo proniká

a hromadí se v buňce. Pod mikroskopem lze tyto buňky vidět intenzivně modře zbarvené (Freshney, 2005).

#### **4.6 Optimalizace počtu buněk**

Na tři Petriho misky ( $\emptyset$  6 cm) bylo vyseto 100, 200 a 300 buněk v 5 ml média. Buňky byly inkubovány sedm dnů, během kterých nebyly pasážovány. Následně byly vzniklé kolonie obarveny, spočítány a byla určena schopnost buněk tvořit kolonie („Plating efficiency“, PE).

#### **4.7 HPRT mutační experiment na buněčné linii V79-4**

Buňky z druhé pasáže byly po dosažení 90% konfluency opláchnuty 2 ml PBS a byl přidán 1 ml trypsinu. Kultivační láhev byla vložena na 4-5 min do inkubátoru. Poté bylo k buňkám přidáno 5 ml média a buňky byly spočítány pomocí automatické počítačky. Do tří Petriho misek ( $\emptyset$  10 cm) bylo vyseto  $1 \times 10^6$  buněk v 8 ml média. Buňky byly kultivovány 48 h. Po uplynutí této doby byly buňky na jedné misce ošetřeny umělým sladidlem (aspartamem s koncentrací 2 mg/ml nebo sacharinem o koncentraci 1,8 mg/ml). K buňkám pozitivní kontroly na další misce byl přidán  $5 \mu\text{mol/l}$  ethylmethansulfonát (EMS). Buňky negativní kontroly na třetí misce byly drženy pouze v růstovém médiu. Ošetřené buňky byly kultivovány při  $37^\circ\text{C}$  v 5% atmosféře  $\text{CO}_2$  po dobu 2 hod. Poté byly buňky uvolněny od kultivačního povrchu za použití trypsinu a spočítány. Následně bylo do tří Petriho misek ( $\emptyset$  10 cm) vyseto  $3,5 \times 10^5$  buněk v 8 ml média pro každou testovanou látku. Buňky byly inkubovány po dobu sedmi dnů a pasážovány dle potřeby. Dále bylo pro každou testovanou látku vyseto 100 buněk na tři Petriho misky ( $\emptyset$  6 cm) v 5 ml média pro stanovení PE buněk („plating“ I). Buňky na Petriho miskách ( $\emptyset$  6 cm) byly inkubovány sedm dnů, během kterých nebyly pasážovány. Den, kdy byly provedeny tyto kroky, je považován za den první.

Šestý den byly buňky jedné kvality na Petriho miskách ( $\emptyset$  10 cm) smíchány a spočítány. Následně bylo do tří Petriho misek ( $\emptyset$  10 cm) vyseto  $3,5 \times 10^5$  buněk v 8 ml média pro další kultivaci. Tyto buňky byly inkubovány po dobu sedmi dnů a pasážovány dle potřeby. Dále bylo do tří Petriho misek ( $\emptyset$  6 cm) vyseto 100 buněk v 5 ml média pro stanovení PE po sedmi dnech kultivace („plating“ II). Pro detekci mutací bylo do pěti Petriho misek ( $\emptyset$  10 cm) vyseto  $2 \times 10^5$  buněk v 8 ml média. Tyto buňky byly inkubovány 2 h a poté byl přidán  $37 \mu\text{mol/l}$  6-TG. Po ošetření toxickým analogem purinových nukleotidů 6-TG byly buňky inkubovány deset dnů.

Osmý den byl vyhodnocen „plating“ I a Petriho misky (Ø 10 cm) s buňkami určené pro další kultivaci z šestého dne byly využity k další části experimentu. Na tři Petriho misky (Ø 6 cm) bylo vyseto 100 buněk v 5 ml média pro stanovení PE po sedmi dnech kultivace („plating“ III). Pro detekci mutací bylo na pět Petriho misek (Ø 10 cm) vyseto  $2 \times 10^5$  buněk v 8 ml média. Buňky byly inkubovány 2 h a poté byl přidán  $37 \mu\text{mol/l}$  6-TG. Po ošetření 6-TG byly buňky kultivovány deset dnů.

Třináctý den byl vyhodnocen „plating“ II a patnáctý den byl vyhodnocen „plating“ III. Šestnáctý den byly vyhodnoceny kolonie na Petriho miskách (Ø 10 cm) z šestého dne. Osmnáctý den byly vyhodnoceny kolonie na Petriho miskách (Ø 10 cm) z osmého dne.

#### 4.8 Stanovení schopnosti buněk tvořit kolonie a hladiny mutací

Po provedení experimentu byla u buněk nejdříve zjištěna jejich schopnost tvořit kolonie po ošetření testovanou látkou. PE byla stanovena i u neošetřených kontrolních buněk. Sedm dnů od ošetření buněk testovanou látkou byly vzniklé kolonie na Petriho miskách (Ø 6 cm) obarveny 1% roztokem methylenové modři v 50% methanolu. Do každé misky bylo přidáno 250  $\mu\text{l}$  roztoku barviva. Po 30 min bylo barvivo odstraněno a miska byla opatrně vypláchnuta vodou pomocí stříčky. Poté byly spočítány vytvořené kolonie. Na základě počtu vzniklých kolonií byla vypočítána schopnost buněk tvořit kolonie podle následujícího vzorce. Hodnota PE je vyjádřena v procentech.

$$PE = \frac{\text{počet vytvořených kolonií}}{\text{počet vysetých buněk}} \times 100$$

Z hodnot PE byl vypočítán faktor R jako podíl PE ošetřených a PE neošetřených buněk vynásobeno sto. Hodnota faktoru R se uvádí v procentech.

$$R = \frac{PE \text{ ošetřených buněk}}{PE \text{ neošetřených buněk}} \times 100$$

Kolonie buněk na Petriho miskách (Ø 10 cm) pro detekci mutací byly obarveny 400  $\mu\text{l}$  1% roztoku methylenové modři v 50% methanolu a postupovalo se stejně jako bylo popsáno výše. Kolonie byly spočítány a podle následujícího vzorce byla stanovena hladina 6-TG rezistentních a spontánních mutací na  $1 \times 10^5$  buněk. Čím je výsledné číslo hladiny mutací u buněk ošetřených testovanou látkou vyšší ve srovnání s pozitivní kontrolou, tím více je látka mutagenní.

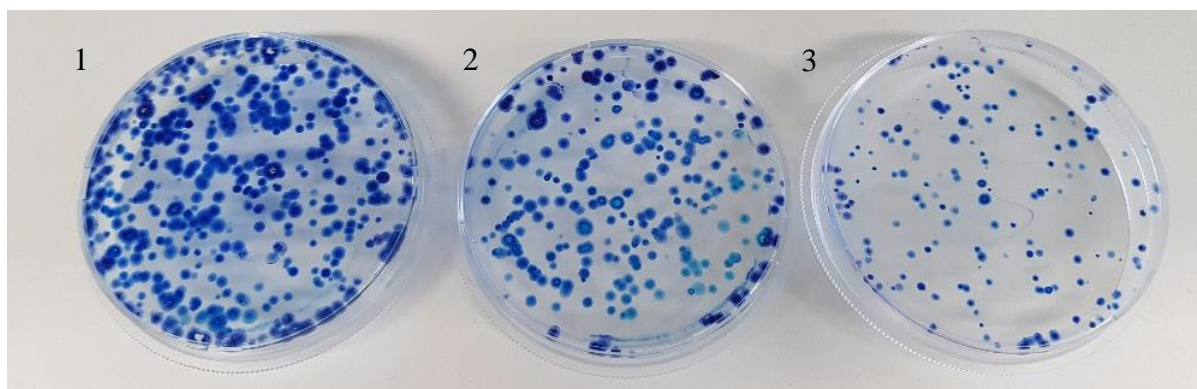
$$\text{hladina mutací} = \frac{\text{počet kolonií vytvořených po ošetření} \times 100 \%}{1 \times 10^6 (\text{počet vyšetých buněk}) \times PE} \times 10^5$$

Následně byla vypočítána frekvence mutací jako podíl hladiny mutací ošetřených a kontrolních buněk neboli také podíl indukovaných a spontánních mutací.

$$\text{frekvence mutací} = \frac{\text{hladina mutací ošetřených buněk}}{\text{hladina mutací kontrolních buněk}}$$

## 5 Výsledky

Počet buněk určených ke stanovení schopnosti buněk tvořit kolonie („Plating efficiency“, PE) se v různých publikacích lišil i s ohledem na použitou buněčnou linii. Ve většině případů bylo použito 300 buněk. Z těchto důvodů byla před samotným HPRT mutačním experimentem provedena optimalizace počtu buněk. Na tři Petriho misky (Ø 6 cm) bylo vyseto 100, 200 a 300 buněk. V případě, že bylo použito 300 buněk, buňky začaly přerůstat a kolonie byly těžko počítatelné (viz obr. 12, miska 1). Na základě této optimalizace bylo v dalších experimentech pro stanovení PE použito 100 buněk.



Obr. 12: Optimalizace počtu buněk ke stanovení schopnosti buněk tvořit kolonie.

Legenda:

1. 300 vysetých buněk.
2. 200 vysetých buněk.
3. 100 vysetých buněk.

Pomocí HPRT mutačního experimentu byl studován genotoxický potenciál aspartamu a sacharinu na buněčné linii V79-4 odvozené od fibroblastů křečička čínského. Buňky byly ošetřeny aspartamem o koncentraci 2 mg/ml nebo sacharinem o koncentraci 1,8 mg/ml. Jako pozitivní kontrola byl použit 5  $\mu\text{mol/l}$  ethylmethansulfonát (EMS). EMS je silný mutagen, a tudíž byl v použité koncentraci efektivní. K selekci 6-thioguanin (6-TG) rezistentních mutací byl použit toxický analog guaninu 37  $\mu\text{mol/l}$  6-TG. U kontrolních buněk a buněk ošetřených testovanými látkami nebo EMS byla do sedmidenní kultivaci stanovena jejich schopnost tvořit kolonie (PE). To vedlo k zjištění, zdali testovaná látka tuto schopnost ovlivnila. Po desetidenní inkubaci buněk s testovanými látkami a 6-TG byla vyhodnocena hladina mutací. Schopnost buněk tvořit kolonie byla stanovena celkem třikrát a výsledná hodnota je průměrem tří nezávislých měření. Hladina mutací byla stanovena ve dvou opakováních a výsledek je rovněž průměrem hodnot dvou nezávislých měření.

Výsledky testování aspartamu na buněčné linii V79-4 byly zaznamenány do tab. 1. Schopnost neošetřených kontrolních buněk tvořit kolonie byla 89,8 %. Buňky ošetřené aspartamem měly PE 93,9 %. Srovnáním těchto hodnot bylo zjištěno, že použitá koncentrace aspartamu neovlivnila schopnost buněk tvořit kolonie. Buňky ošetřené 5 $\mu$ mol/l EMS vykazovaly podle očekávání nižší PE ve srovnání s neošetřenými buňkami kontroly. Po desetidenní inkubaci buněk byla vyhodnocena hladina 6-TG rezistentních a spontánních mutací, která byla stanovená na 1 x 10<sup>5</sup> buněk. U buněk ošetřených aspartamem byla hladina mutací přibližně dvakrát zvýšená (viz obr. 13, miska 3) oproti kontrolním neošetřeným buňkám. Frekvence mutací vyvolaných u buněk ošetřených aspartamem byla však nižší než u buněk ošetřených EMS. U těchto buněk byla podle očekávání hladina mutací vyšší (viz obr. 13, miska 2) ve srovnání s neošetřenými kontrolními buňkami i buňkami ošetřenými aspartamem. Ze získaných dat lze usoudit, že aspartam o koncentraci 2 mg/ml není tak výrazně genotoxický.

Tab. 1: Hodnoty získané při testování aspartamu na buněčné linii V79-4.

	<b>PE<sup>1</sup> [%]</b>	<b>R<sup>2</sup>[%]</b>	<b>Hladina mutací<sup>3</sup></b>	<b>Frekvence mutací<sup>4</sup></b>
<b>Kontrola</b>	89,8 ± 3,2	100	5,9 ± 1,8	1,0
<b>Ethylmethansulfonát (EMS)</b>	67,1 ± 8,6	75	27,7 ± 2,9	4,7
<b>Aspartam</b>	93,9 ± 3,7	100	12 ± 3	2,0

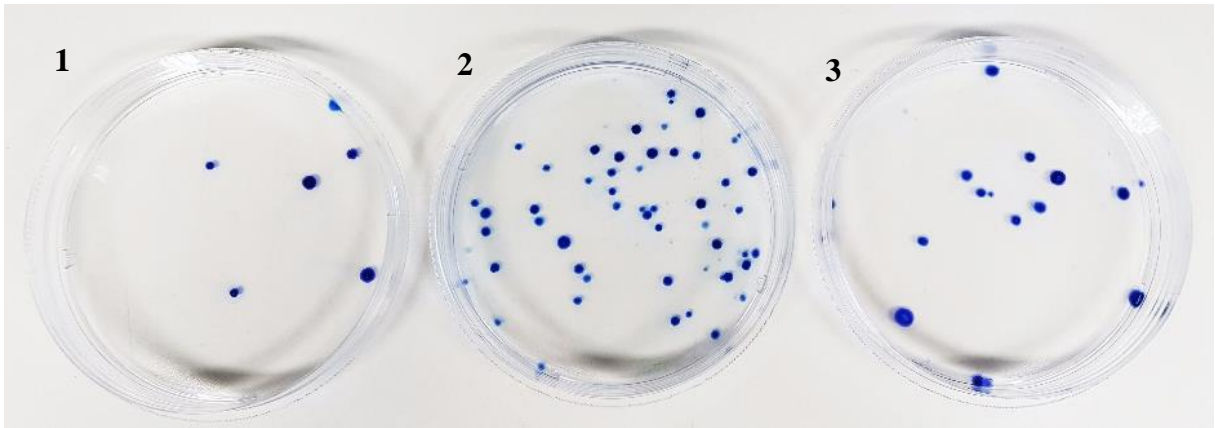
Legenda:

<sup>1</sup> „Plating efficiency“ – schopnost buněk tvořit kolonie v procentech.

<sup>2</sup> Podíl PE ošetřených a neošetřených buněk v procentech.

<sup>3</sup> Hladina 6-TG rezistentních a spontánních mutací stanovená na 1 x 10<sup>5</sup> buněk.

<sup>4</sup> Frekvence mutací, podíl indukovaných a spontánních mutací.



Obr. 13: Kolonie kontrolních buněk, buněk negativní kontroly a buněk ošetřených aspartamem, selektovaných v médiu obsahujícím 6-TG. Počet nasetých buněk byl  $2 \times 10^5$ .

Legenda:

1. Kontrolní buňky ošetřené 6-TG.
2. Buňky pozitivní kontroly ošetřené EMS a 6-TG.
3. Buňky ošetřené aspartamem a 6-TG.

Výsledky testování sacharinu na buněčné linii V79-4 byly zaznamenány do tab. 2. Kontrolní neošetřené buňky měly PE 78,2 %. PE buněk ošetřených sacharinem byla 53,2 %. Buňky ošetřené sacharinem vykazovaly nižší schopnost tvořit kolonie oproti buňkám pozitivní a negativní kontroly. Daná koncentrace sacharinu způsobila smrt některých vyšetých buněk. Hladina 6-TG rezistentních mutací a spontánních mutací, která byla stanovena po deseti dnech inkubace, byla u buněk ošetřených sacharinem (viz obr. 14, miska 3) přibližně 2,2x zvýšená oproti neošetřeným buňkám kontroly. Frekvence mutací vyvolaných u buněk ošetřených sacharinem byla ale nižší než u buněk pozitivní kontroly, které byly ošetřené EMS (viz obr. 14, miska 2). Tyto buňky podle očekávání vykazovaly vyšší hladinu mutací ve srovnání s neošetřenými buňkami kontroly. Na základě získaných dat lze říci, že sacharin o koncentraci 1,8 mg/ml způsobil mírné zvýšení hladiny mutací v *hprt* lokusu buněk V79-4.



Tab. 2: Hodnoty získané při testování sacharinu na buněčné linii V79-4.

	PE <sup>1</sup> [%]	R <sup>2</sup> [%]	Hladina mutací <sup>3</sup>	Frekvence mutací <sup>4</sup>
<b>Kontrola</b>	78,2 ± 18,6	100	8,6 ± 0,7	1,0
<b>Ethylmethansulfonát (EMS)</b>	67,1 ± 8,6	86	27,7 ± 3,0	3,2
<b>Sacharin</b>	53,2 ± 18,5	68	18,6 ± 8,0	2,2

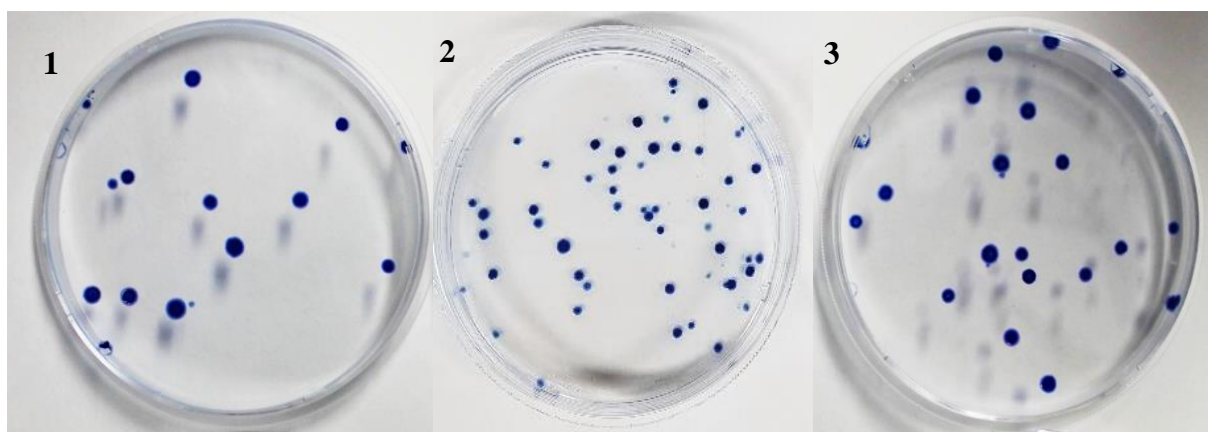
Legenda:

<sup>1</sup> „Plating efficiency“ – schopnost buněk tvořit kolonie v procentech.

<sup>2</sup> Podíl PE ošetřených a neošetřených buněk v procentech.

<sup>3</sup> Hladina 6-TG rezistentních a spontánních mutací stanovená na  $1 \times 10^5$  buněk.

<sup>4</sup> Frekvence mutací, podíl indukovaných a spontánních mutací.



Obr. 14: Kolonie kontrolních buněk, buněk negativní kontroly a buněk ošetřených sacharinem selektovaných v médiu obsahujícím 6-TG. Počet nasetých buněk byl  $2 \times 10^5$ .

Legenda:

1. Kontrolní buňky ošetřené 6-TG.

2. Buňky pozitivní kontroly ošetřené EMS a 6-TG.

3. Buňky ošetřené sacharinem a 6-TG.

Aspartam o koncentraci 2 mg/ml neovlivnil schopnost buněk tvořit kolonie. Buňky ošetřené sacharinem o koncentraci 1,8 mg/ml naopak vykazovali sníženou schopnost tvořit kolonie. Přestože byla v obou experimentech zjištěná zvýšená hladina mutací v *hprt* lokusu buněk, použité koncentrace umělých sladidel aspartamu a sacharinu nevykazovaly až tak výrazné genotoxické účinky ve srovnání s pozitivní kontrolou.

## 6 Diskuze

V experimentální části této bakalářské práce byl sledován genotoxický potenciál aspartamu a sacharinu na buněčnou linii V79-4. K testování byla zvolena koncentrace aspartamu 2 mg/ml a koncentrace použitého sacharinu byla 1,8 mg/ml. Pomocí HPRT mutačního experimentu bylo zjištěno, že použité koncentrace aspartamu neovlivnila schopnost buněk tvořit kolonie, ale indukovala mutace v *hprt* lokusu buněk V79-4. Zvýšení počtu mutací však nebylo nijak výrazné ve srovnání s buňkami pozitivní kontroly ošetřenými EMS, u kterých byla pozorována výrazně zvýšená hladina mutací. Ze získaných hodnot je patrné, že aspartam za testovacích podmínek nevyvolal u buněk výrazné zvýšení genotoxicity. Získané výsledky se shodují s některými daty dostupnými v odborné literatuře.

Durnev *et al.* (1995) testoval koncentraci aspartamu 40 a 400 mg/kg tělesné váhy na myších a neprokázal mutagenní ani klastogenní účinky. Ke stejnému závěru došli i Jeffrey *et Williams* (2000) při testování vlivu vybraných umělých sladidel včetně aspartamu na DNA. Podle Butchko *et al.* (2002) je aspartam bezpečný. Výsledky testování aspartamu se mohou lišit s ohledem na zvolený test genotoxicity. Každý genotoxický test je jinak citlivý, s jinou délkou provedení a rozdílnou specifitou. Některé genotoxické testy umožňují blíže specifikovat interakci testované látky s DNA, a tak přímo určit, jestli testovaná látka způsobuje např. bodové mutace. Naopak jiné testy toto neumožňují. Dalším faktorem jsou testovací podmínky, je rozdíl, zda testování probíhá *in vitro* nebo *in vivo*. Výsledky mohou být ovlivněny i vybranou buněčnou linií nebo organismem. V neposlední řadě je testování ovlivněno zvoleným umělým sladidlem. Používané směsi umělých sladidel obsahují i řadu příměsí, které mají zajistit vyšší sladivost a potlačit nepříjemné chuti sladidel, ale tyto příměsi mohou ovlivnit testování. Dále se mohou lišit umělá sladidla dodávaná různými výrobci. Z těchto důvodů mohou některé literární prameny naopak potvrzovat negativní účinky aspartamu. Rencüzoğulları *et al.* (2004) testovali aspartam ve třech koncentracích 500, 1000 a 2000 µg/ml na lidských lymfocytech po dobu 24 a 48 h. Aspartam indukoval chromozomové aberace v celém rozsahu koncentrací a mikrojádra byla pozorována pouze u buněk ošetřených nejvyšší koncentrací, nicméně aspartam nezpůsobil SCE. Soffritti *et al.* (2006) pozorovali karcinogenní účinky aspartamu u laboratorních potkanů, zejména vznik zhoubných nádorů, lymfomů, leukemie atd. už při použití denní dávky 20 mg aspartamu na kg tělesné váhy. AlSuhailani (2010) testoval koncentrace 3,5; 35 a 350 mg aspartamu na kg tělesné váhy na kostní dřeni myši. Koncentrace 35 a 350 mg/kg tělesné váhy způsobily chromatidové aberace, nicméně tyto koncentrace nezpůsobil vznik SCE po 24 hod. Kamant *et al.* (2010) sledovali vliv aspartamu o koncentraci

250, 455, 500 a 1000 mg/kg tělesné váhy na čtyřech různých skupinách zvířat. Při použití koncentrace aspartamu 455, 500 a 1000 mg/kg byl pozorován zvýšený výskyt mikrojader, chromozomových aberací a abnormálních spermií po 24, 48 a 72 h. Na základě těchto výsledků byl aspartam označen za klastogenní. Jelikož jsou jednotlivá umělá sladidla v metabolismu rozkládána, za genotoxický potenciál mohou být zodpovědné metabolity daného sladidla (Schwartz, 1999). Toto zjištění, ale nebylo dosud potvrzeno.

Stejně jako aspartam i sacharin je podezříván z nežádoucích účinků, a proto byl jeho genotoxický potenciál zjišťován pomocí odlišných testů. V rámci této bakalářské práce bylo pomocí HPRT mutačního experimentu zjištěno, že koncentrace 1,8 mg/ml běžně prodáváného sacharinu ovlivňuje schopnost buněčné linie V79-4 tvořit kolonie a způsobuje zvýšenou hladinu mutací v *hprt* lokusu. Hladina mutací byla 2,2x vyšší než u kontrolních neošetřených buněk. Zvýšená hladina mutací ale nebyla tak výrazná jako u buněk pozitivní kontroly ošetřené EMS. Jak již bylo zmíněno výše, testování genotoxického potenciálu umělých sladidel a chemických látek obecně je ovlivněno řadou faktorů. V některých odborných publikacích jsou genotoxické vlastnosti sacharinu vyvráceny, v dalších naopak potvrzeny.

Podle studie Ishidate *et* Odashima (1977) je sacharin sodný klastogenní. Po 48 hod byly pozorovány v buňkách, ošetřených koncentrací sacharinu větší než 1 mg/ml, translokace, mezery „gaps“, chromatidové a chromozomové zlomy. Stejně tak Abe *et* Sasaki (1977) pozorovali tvorbu chromozomových zlomů, dicentrických chromozomů a jiných aberací u CHO buněk po ošetření sacharinem sodným. Podle Ashby *et* Ishidate (1986) je sacharin a jeho sodné, vápenaté, draselné a další soli klastogenní pouze v rozsahu koncentrace 8-16 mg/ml. Studium genotoxického potenciálu sacharinu pomocí thymidinkinázového testu se zabývala vědecká skupina Clive *et al.* (1979). Bylo pozorováno zvýšení počtu mutací u myší lymfoidní buněčné linie L5178Y při použití rozsahu koncentrací 17-19 mg/ml. Tyto buňky vykazovaly i nižší životaschopnost oproti kontrolním buňkám, z čehož lze vyvodit, že sacharin je ve vyšších koncentracích pro buňky cytotoxický. Zhang *et al.* (1991) zjistili zvýšený počet SCE v lidských lymfocytech ošetřených 0,05–0,10% sacharinem sodným. Sasaki *et al.* (2002) sledovali pomocí kometového testu vliv sacharinu a jeho sodné soli na DNA z buněk osmi orgánů myši. Sacharin o koncentraci 1000 mg/kg tělesné váhy poškodil DNA buněk tlustého střeva. Při použití sacharinu sodného o koncentraci 2000 mg/kg bylo pozorováno poškození DNA u buněk tlustého střeva a žaludečních žláz. Kometový test použili také Bandyopadhyay *et al.* (2008) při testování vlivu sacharinu sodného na DNA. Buňky kostní dřeně *Mus musculus* byly ošetřeny třemi koncentracemi sacharinu sodného: 50, 100 a 200 mg/kg tělesné váhy. Tento rozsah koncentrací umělého sladidla způsobil poškození DNA.

Výše zmíněné výsledky genotoxických účinků aspartamu a sacharinu byly obecně získány pomocí krátkodobých testů. HPRT mutační experiment se řadí mezi dlouhodobé testy. Rozdíl byl také ve zvolené buněčné linii. Buňky mohly mít odlišnou citlivost k testovanému umělému sladidlu než buněčná linie V79-4 zvolená k HPRT mutačnímu experimentu. Testovací podmínky mohly ovlivnit výsledky, a proto se hodnoty získané pomocí HPRT mutačního experimentu provedeného v rámci této bakalářské práce liší od informací z některých literárních zdrojů.

Ačkoliv bylo provedeno velké množství ať už krátkodobých nebo dlouhodobých studií zabývajících se vlivem umělých sladidel, nelze zcela s jistotou říct, zda má jejich používání negativní vliv na organismus. Testování genotoxického potenciálu umělých sladidel je ovlivněno řadou faktorů, jak bylo zmíněno výše. Stanovení zdravotní nezávadnosti umělých sladidel nebo zjištění jejich nepříznivých účinků na lidský organismus je tedy velmi náročné. Přestože výsledky některých dosud provedených testů byly pozitivní, a tedy bylo potvrzeno, že aspartam a sacharin poškozují DNA a způsobují mutace, jsou tyto látky nadále využívány v potravinářském průmyslu při výrobě potravin.

## 7 Závěr

V teoretické části této bakalářské práce byly popsány nejběžnější metody genetické toxikologie využívané k testování genotoxického účinku chemických látek na savčích buňkách. Podrobněji byl popsán zejména hypoxantinguaninfosforibosyltransferázový mutační experiment, který byl dále využit v experimentální části této bakalářské práce. Okrajově byl zmíněn také bakteriální Amesův test, který je jedním z nejpoužívanějších testů obecně při studiu genotoxických účinků mnoha typů chemických látek. Druhá část teoretické práce byla věnována popisu často využívaných umělých sladidel a jejich možnému negativnímu vlivu na lidský organismus.

V rámci experimentální části této práce byl do Laboratoře molekulární biofyziky a farmakologie Katedry biofyziky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci úspěšně zaveden hypoxantinguaninfosforibosyltransferázový mutační experiment. Optimalizovaný postup tohoto experimentu byl následně použit pro studium genotoxického potenciálu umělých sladidel se zaměřením na běžně dostupné a široce používané látky především v potravinářském průmyslu. Umělá sladidla aspartam a sacharin byla testována na buněčné linii V79-4 odvozené od fibroblastů křečička čínského. Za testovacích podmínek aspartam ani sacharin nevyvolaly výrazné zvýšení hladiny mutací v *hprt* lokusu buněk ve srovnání s neošetřenými buňkami kontroly.

## 8 Seznam použité literatury

Abe, S., Sasaki, M. (1977): Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *Journal of the National Cancer Institute* 58(6): 1635-1641.

Albertini, R. J. (2001): HPRT mutations in humans: biomarkers for mechanistic studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 489 (1): 1-16.

AlSuhaibani, E. S. (2010): In vivo cytogenetic studies on aspartame. *Comparative and Functional Genomics* 2010: 1-4.

Anonymous 1: HPRT-Forward-mutation-Assay, dostupné online na: <http://www.genpharmtox.de/downloads/AssaySheetsHPRT.pdf>, navštíveno dne: 8. 9. 2016.

Anonymous 2: Mouse Lymphoma Assay, dostupné online na: <http://www.genpharmtox.de/downloads/AssaySheetMOLY.pdf>, navštíveno dne: 1. 8. 2016.

Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A., Juhn, G., Kasweck, K. L., Lin, P. F., Wadhams, A. Hozier, J. C. (1990): Molecular dissection of mutations at the heterozygous thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(1): 51-55.

Arnold, D. L. (1983): Two-generation saccharin bioassays. *Environmental health perspectives* 50: 27-36.

Arnold, D. L. (1984): Toxicology of saccharin. *Fundamental and Applied Toxicology* 4(5): 674-685.

Ashby, J., & Ishidate, M. (1986): Clastogenicity in vitro of the Na, K, Ca and Mg salts of saccharin; and of magnesium chloride; consideration of significance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 163(1): 63-73.

Bandyopadhyay, A., Ghoshal, S., Mukherjee, A. (2008): Genotoxicity testing of low-calorie sweeteners: aspartame, acesulfame-K, and saccharin. *Drug and chemical toxicology* 31(4), 447-457.

Bigda, J. J., Koszałka, P. (2013): Wacław Szybalski's contribution to immunotherapy: HGPRT mutation & HAT selection as first steps to gene therapy and hybrid techniques in mammalian cells. *Gene* 525(2): 158-161.

Bopp, B. A., Sonders, R. C., Kesterson, J. W., Renwick, A. G. (1986): Toxicological aspects of cyclamate and cyclohexylamine. *CRC critical reviews in toxicology* 16(3), 213-306.

Brusick, D. (1987): Principles of genetic toxicology, 2nd ed. Plenum Press, New York. ISBN: 0-306-42532-7.

Burlinson, B. (2012): The in vitro and in vivo comet assays. In: Parry, J. M., Parry, E. M., (ed.) Genetic Toxicology: Principles and Methods, Methods in Molecular Biology 817, pp. 143-163, Humana Press (Springer), New York.

Butchko, H. H., Stargel, W. W., Comer, C. P., Mayhew, D. A., Benninger, C., Blackburn, G. L., de Sonneville, L. M., Geha, R. S., Hertelendy, Z., Koestner, A., Leon, A. S., Liepa, G. U., McMartin, K. E., Mendenhall, C. L., Munro, I. C., Novotny, E. J., Renwick, A. G., Schiffman, S. S., Schomer, D. L., Shaywitz, B. A., Spiers, P. A., Tephly, T. R., Thomas, J. A., Trefz, F. K. (2002): Aspartame: review of safety. Regul. Toxicol. Pharmacol 35(2): 1-92.

Clare, G. (2012): The in vitro mammalian chromosome aberration test. In: Parry, J. M., Parry, E. M., (ed.) Genetic Toxicology: Principles and Methods, Methods in Molecular Biology 817, pp. 63-91, Humana Press (Springer), New York.

Clements, J. (2000): The mouse lymphoma assay. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 455(1): 97-110.

Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G., Brown, M. M. M. (1979): Validation and characterization of the L5178Y/TK<sup>±</sup>-mouse lymphoma mutagen assay system. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 59(1): 61-108.

Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., Štětina, R. (2008). The comet assay: topical issues. Mutagenesis 23(3):143-151.

Collins, A. R., Dobson, V. L., Dušinská, M., Kennedy, G., Štětina, R. (1997): The comet assay: what can it really tell us?. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 375(2): 183-193.

Čopíková, J., Moravcová, J., Wimmer, Z., Opletal, L., Lapčík, O., Drašar, P. (2013): Náhradní sladidla. Chem. Listy 107: 867-874.

Doherty, A. T. (2012): The in vitro micronucleus assay. In: Parry, J. M., Parry, E. M., (ed.) Genetic Toxicology: Principles and Methods, Methods in Molecular Biology 817, pp. 121-141, Humana Press (Springer), New York.

Doležal M. (2009): Sladidla používaná ve farmacii a potravinářství. 2. Syntetická sladidla. Prakt lékáren. 2009 5(1): 29-31.

Durnev, A. D., Oreshchenko, A. V., Kulakova, A. V., Beresten, N. F., Seredenin, S. B. (1995): Clastogenic activity of dietary sugar substitutes. Voprosy Meditsinskoj Khimii 41(4): 31-33.

Estensen, R. D. (1971): Cytochalasin B I. Effect on Cytokinesis of Novikoff Hepatoma Cells 1. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 136(4): 1256-1260.

European Commission, Directorate General for Health and Food Safety (2000): Revised opinion on cyclamic acid and its sodium and calcium salts. Scientific Committee on food.

Dostupné online na: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci\\_com\\_scf\\_out53\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci_com_scf_out53_en.pdf), navštíveno dne: 3. 3. 2017.

Fairbairn, D. W., Olive, P. L., O'Neill, K. L. (1995): The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 339(1): 37-59.

Fenech, M. (2000): The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 455(1): 81-95.

Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. (2003): HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 534(1): 65-75.

Freshney, R. I. (2005): *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Fifth Edition. John Wiley & Sons, New York. ISBN-10 0-471-45329-3.

Furth, E. E., Thilly, W. G., Penman, B. W., Liber, H. L., Rand W. M. (1981): Quantitative assay for mutation in diploid human lymphoblasts using microtiter plates. *Analytical biochemistry* 110(1): 1-8.

Gedik, C. M., Ewen, S. W. B., Collins, A. R. (1992): Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *International journal of radiation biology* 62(3): 313-320.

Hunt, F., Bopp, B. A., Price, P. (2011): Cyclamate. In: O'Brien-Nabors, L., (ed.): *Alternative Sweeteners*, Fourth Edition. pp. 93-116, CRC Press, New York.

International Agency for Research on Cancer (1980): *Some Non-Nutritive Sweetening Agents*. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. vol. 22. IARC, Lyon.

International Agency for Research on Cancer (1999): *Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances*. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. vol. 73. IARC, Lyon.

Ishidate, M., Odashima, S. (1977): Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro—a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 48(3): 337-354.

Ishii, H., Koshimizu, T., Usami, S., & Fujimoto, T. (1981). Toxicity of aspartame and its diketopiperazine for Wistar rats by dietary administration for 104 weeks. *Toxicology*, 21(2), 91-94.

Jeffrey, A. M., Williams, G. M. (2000): Lack of DNA-damaging activity of five non-nutritive sweeteners in the rat hepatocyte/DNA repair assay. *Food and chemical toxicology* 38(4): 335-338.



- Johnson, G. E. (2012): Mammalian cell HPRT gene mutation assay: test methods. In: Parry, J. M., Parry, E. M., (ed.) Genetic Toxicology: Principles and Methods, Methods in Molecular Biology 817, pp. 55-67, Humana Press (Springer), New York.
- Kamath, S., Vijaynarayana, K., Prashanth Shetty, D., Shetty, P. (2010): Evaluation of genotoxic potential of aspartame. *Pharmacologyonline* 1: 753-769.
- Keohavong, P., Xi, L., Grant, S. G. (2005): Molecular Analysis of Mutations in the Human HPRT Gene. *Molecular Toxicology Protocols, Methods in Molecular Biology* 291: 161-170.
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., Ahnström, G. (1996): The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research/DNA Repair* 363(2): 89-96.
- Klescht, V., Hrnčířiková, I., Mandelová, L. (2006): *Éčka v potravinách*. Computer Press, Brno. ISBN 80-251-1292-6.
- Latt, S. A. (1974): Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71(8): 3162-3166.
- Lesch, M., Nyhan, W. L. (1964): A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *The American journal of medicine* 36(4): 561-570.
- Lloyd, M., Kidd, D. (2012): The mouse lymphoma assay. In: Parry, J. M., Parry, E. M., (ed.) Genetic Toxicology: Principles and Methods, Methods in Molecular Biology 817, pp. 35-54, Humana Press (Springer), New York.
- Marinovich, M., Galli, C. L., Bosetti, C., Gallus, S., La Vecchia, C. (2013): Aspartame, low-calorie sweeteners and disease: regulatory safety and epidemiological issues. *Food and chemical toxicology* 60: 109-115.
- Medeiros, R. A., de Carvalho, A. E., Rocha-Filho, R. C., Fatibello-Filho, O. (2008): Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode. *Talanta* 76(3): 685-689.
- Migliore, L., Cocchi, L., Scarpato, R. (1996): Detection of the centromere in micronuclei by fluorescence in situ hybridization: its application to the human lymphocyte micronucleus assay after treatment with four suspected aneugens. *Mutagenesis*, 11(3): 285-290.
- Monnat, R. (2009): Protocol for HPRT mutagenesis analyses, dostupné online [http://depts.washington.edu/monnatws/pdf/HPRT\\_protocols\\_042009.pdf](http://depts.washington.edu/monnatws/pdf/HPRT_protocols_042009.pdf), navštíveno dne: 10. 9. 2016.
- Moore, M. M., Doerr, C. L. (1990): Comparison of chromosome aberration frequency and small-colony TK-deficient mutant frequency in L5178Y/TK+/-3.7. 2C mouse lymphoma cells. *Mutagenesis* 5(6): 609-614.

- Mortelmans, K., Zeiger, E. (2000): The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 455(1): 29-60.
- OECD (1997): Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Publishing, Paris.
- OECD (2015a): Test No. 476: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xprt genes, OECD Publishing, Paris.
- OECD (2015b): Test No. 490: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene, OECD Publishing, Paris.
- OECD (2016b): Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test, OECD Publishing, Paris.
- OECD (2016a): Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris.
- Ostling, O., Johanson, K. J. (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* 123(1): 291-298.
- Perry, P., Wolff, S. (1974): New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251(5471):156-158.
- Price, J. M., Biava, C. G., Oser, B. L., Vogin, E. E., Steinfeld, J., Ley, H. L. (1970): Bladder tumors in rats fed cyclohexylamine or high doses of a mixture of cyclamate and saccharin. *Science* 167(3921): 1131-1132.
- Proudlock, R. (Ed.). (2016): *Genetic Toxicology Testing: A Laboratory Manual*. Elsevier, Academic Press. ISBN: 978-0-12-800764-8
- Remsen, I., Fahlberg, C. (1879): On the oxidation of substitution products of aromatic hydrocarbons. IV. On the oxidation of orthotoluenesulphonamide. *Am. Chem. J.* 1: 426-438.
- Rencüzoğulları, E., Tüylü, B. A., Topaktaş, M., İla, H. B., Kayraldız, A., Arslan, M., Diler, S. B. (2004): Genotoxicity of aspartame. *Drug and chemical toxicology* 27(3): 257-268.
- Renwick, A. G. (1986): The metabolism of intense sweeteners. *Xenobiotica* 16(10-11): 1057-1071.
- Saigal, R., Chakraborty, A., Yadav, R. N., Prashant, R. K. (2006): Partial HPRT deficiency (Kelley-Seegmiller syndrome). *JAPI* 54: 49-52.
- Sasaki, Y. F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda, S. (2002): The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 519(1): 103-119.

- Savage, J. R. (1976): Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *Journal of medical genetics* 13(2): 103-122.
- Seegmiller, J. E., Rosenbloom, F. M., Kelley, W. N. (1967): Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. *Science* 155(3770): 1682-1684.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1): 184-191.
- Schmid, W. (1975): The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 31(1): 9-15.
- Schwartz, G. R. (1999): Aspartame and breast and other cancers. *Western Journal of Medicine* 71 (5-6): 300–301.
- Smart, R. C. (2004): Chemical Carcinogenesis. In: Hodgson E., (ed.) *A textbook of modern toxicology*, 3rd ed. pp. 225-250, John Wiley & Sons, New York.
- Soffritti, M., Belpoggi, F., Esposti, D. D., Lambertini, L., Tibaldi, E., Rigano, A. (2006): First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to Sprague-Dawley rats. *Environmental Health Perspectives*: 379-385.
- Stout, J. T., Caskey, C. T. (1985): HPRT: gene structure, expression, and mutation. *Annual review of genetics* 19: 127-148.
- Takayama, S., Renwick, A. G., Johansson, S. L., Thorgeirsson, U. P., Tsutsumi, M., Dalgard, D. W., Sieber, S. M. (2000): Long-term toxicity and carcinogenicity study of cyclamate in nonhuman primates. *Toxicological Sciences* 53(1): 33-39.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis* 35(3): 206-221.
- Timbrell, J. (2000): *Principles of biochemical toxicology*, 3rd ed. Taylor & Francis, UK. ISBN: 0-203-79241-6.
- Torres, R. J., Puig, J. G. (2007): Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet journal of rare diseases* 2(1), 48.
- Varga, D., Johannes, T., Jainta, S., Schuster, S., Schwarz-Boeger, U., Kiechle, M., Garcia, B. P., Vogel, W. (2004): An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis. *Mutagenesis* 19(5): 391-397.
- Vrbová, T. (2001): *Víme, co jíme?, aneb, Průvodce "Éčky" v potravinách*. EcoHouse, Praha. ISBN: 80-238-7504-3.

Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. Dostupné online na: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-4/zneni-20110601#p14>, navštíveno dne: 17. 2. 2017.

Weihrauch, M. R., Diehl, V. (2004): Artificial sweeteners-do they bear a carcinogenic risk?. *Annals of Oncology* 15(10): 1460-1465.

Whitehouse, C. R., Boullata, J., McCauley, L. A. (2008): The potential toxicity of artificial sweeteners. *Aaohn Journal* 56(6): 251-261.

Williams, G. M. (1989): Methods for evaluating chemical genotoxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology* 29: 189-211.

Wilson, D. M., Thompson, L. H. (2007): Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 616(1): 11-23.

Wolff, S. (1977): Sister chromatid exchange. *Annual review of genetics* 11(1): 183-201.

Wolff, S., Rodin, B. (1978): Saccharin-induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster and human cells. *Science*, 200(4341): 543-545.

Young, R. R. (2002): Genetic toxicology: web resources. *Toxicology* 173: 103-121.

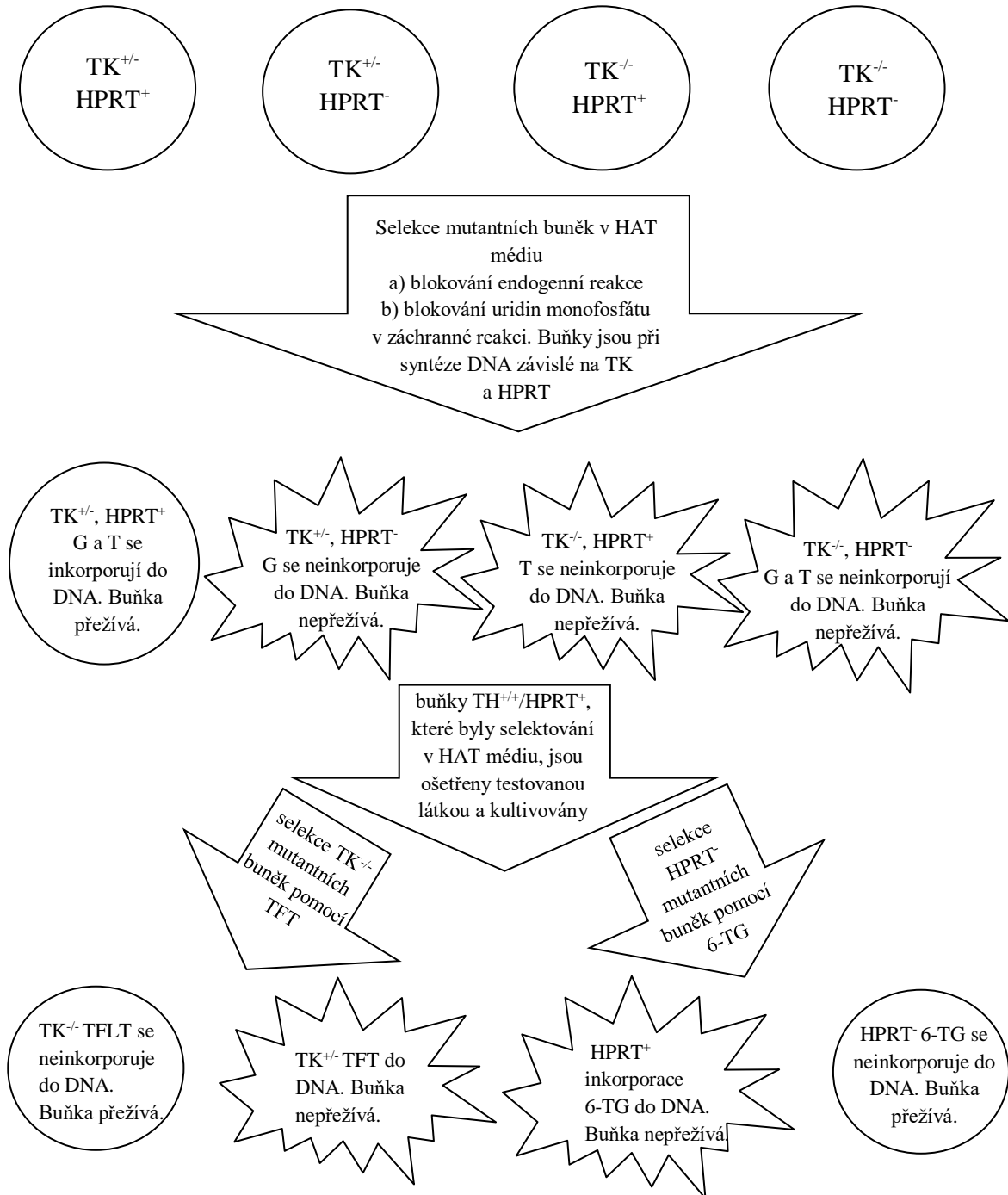
Zhang, Z., Yang, J., Zhang, Q., Cao, X. (1991): Studies on the utilization of a plant SCE test in detecting potential mutagenic agents. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 261(1): 69-73.

## 9 Seznam použitých zkratek

ADI	Acceptable Daily Intake (přijatelná denní dávka)
APRT	Adeninfosforibosyltransferáza
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
CHO	Chinese hamster ovary
Cyt-B	Cytochalsin-B
DAPI	4',6-diamino-2-fenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EFSA	European Food Safety Authority (Evropský úřad pro bezpečnost potravin)
EMS	Ethylmethansulfonát
FBS	Fetální bovinní sérum
FDA	Food and Drug Administration (americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
HAT	Médium obsahující hypoxantin, aminopterin a thymidin
HPRT/HGPRT	Hypoxantinguaninfosforibosyltransferáza
HPRT <sup>+</sup>	Buňky s funkčním genem pro HPRT
HPRT <sup>-</sup>	Buňky s nefunkčním genem pro HPRT
MLA	Mouse lymphoma assay
MN <sub>vit</sub>	<i>In vitro</i> micronucleus assay
NPB	Nucleoplasmic bridge (nukleoplazmatický most)
PE	Plating efficiency (schopnost buněk tvořit kolonie)
PRPP	5'-fosforibosyl-1-pyrofosfát
SCE	Sister chromatid exchange (výměna sesterských chromatid)
SCGE	Single cell gel electrophoresis
TFT	Trifluorothymidin
TK	Thymidinkináza
TK <sup>+/-</sup>	Buňky s jednou funkční kopií genu pro TK
TK <sup>-/-</sup>	Buňky s mutací v genu pro TK
6-TG	6-thioguanin
8-AG	8-azaguanin

## 10 Přílohy

Příloha 1: Schématické znázornění principu selekce buněk v HAT médiu, HPRT mutačního experimentu a thymidinkinázového testu (převzato: Johnson, 2012 a upraveno).



Legenda:

TK: gen kódující thymidinkinázu; HPRT: gen kódující hypoxantinguaninfosforibosyltransferázu; HAT médium: médium obsahující hypoxantin, thymidin a aminopterin; TK<sup>+/+</sup>: buňky obsahující pouze jednu funkční kopii genu pro thymidinkinázu; TK<sup>-/-</sup>: buňky se zmutovaným genem pro thymidinkinázu; HPRT<sup>+</sup>: buňky s funkčním HPRT genem; HPRT<sup>-</sup>: buňky s nefunkčním/zmutovaným HPRT genem; TFT: trifluorothymidin, toxický analog thymidinu; 6-TG: 6-thioguanin, toxický analog guaninu

Příloha 2: Typy buněčných linií, které lze použít k HPRT mutačnímu experimentu a jejich doporučené kultivační podmínky (převzato z: Johnson, 2012).

Cell line	L5178Y	CHO	AS52	V79	AHH-1	MCL-5	TK6
Media	DMEM	Ham's F12	Ham's F12	DMEM	RPMI 1640	RPMI 1640 without L-histidine	RPMI 1640
+L-Glutamine	4 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
+Serum	10% FBS	10% FBS	10% FBS	10% FBS	10% HS	10% HS	10% FBS
+ Other supplements	0.1% Pluronic; 1.5 g/L Sodium bicarbonate; 4.5 g/L Glucose				10 mM HEPES; 1 mM sodium pyruvate; 1.5 g/L Sodium bicarbonate; 4.5 g/L Glucose	0.1 mg/ml Hygromycin B <sup>2</sup> ; 0.03 mg/ml 50 Aminolevulinic acid; 2 mM L-histidinol	1 mM sodium pyruvate
Growth conditions	Suspension	Adherent	Adherent	Adherent	Suspension	Suspension	Suspension
Maintain between "Re-suspension density → confluence" (cells/ml)	$2 \times 10^5 \rightarrow 1 \times 10^6$	$1 \times 10^5 \rightarrow 4 \times 10^5$	$1 \times 10^5 \rightarrow 4 \times 10^5$	$1 \times 10^5 \rightarrow 4 \times 10^5$	$1 \times 10^5 \rightarrow 1 \times 10^6$	$1 \times 10^5 \rightarrow 1 \times 10^6$	$2 \times 10^5 \rightarrow 1 \times 10^6$
Trypsin EDTA or 0.25% trypsin used to subculture	No	Yes	Yes	Yes	No	No	No
Medium renewal	Two to three times a week	Two to three times a week	Two to three times a week	Two to three times a week	Two to three times a week	Two to three times a week	Two to three times a week
Preservation: Store in liquid nitrogen vapour phase	88% FBS and 12% DMSO	88% FBS and 12% DMSO	88% FBS and 12% DMSO	88% FBS and 12% DMSO	88% HS and 12% DMSO	88% HS and 12% DMSO	88% HS and 12% DMSO
References	<a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a>	HPAcutures.org.uk	Tindall and Stankowski Jr (13), Tindall et al. (14)	HPAcutures.org.uk	Crespi and Thilly (8) ( <a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a> )	Crespi et al. (7), Crespi and Thilly (8) ( <a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a> )	( <a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a> )