



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

**Optimalizace pozitivních kontrol a určení
genotoxického potenciálu vzorku s použitím testu
reverzní mutace na bakteriích**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Lenka Marvanová

Vedoucí práce: Ing. Anna Kryszcuková

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Optimalizace pozitivních kontrol a určení genotoxického potenciálu vzorku s použitím testu reverzní mutace na bakteriích“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 1. června 2020

.....

Lenka Marvanová

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala paní Ing. Anně Kryszczukové a paní Bc. Kláře Gruzovské za jejich odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovaly. Zároveň bych ráda poděkovala firmě MediTox s.r.o. za poskytnutí dat, materiálu a prostoru k vypracování bakalářské práce. A dále bych ráda poděkovala rodině a přátelům za podporu a trpělivost.

Optimalizace pozitivních kontrol a určení genotoxického potenciálu vzorku s použitím testu reverzní mutace na bakteriích

Abstrakt

Využití Amesova testu k určení mutagenního a tím i karcinogenního potenciálu chemických látek, léčiv a zdravotnických prostředků je v současné době velmi oblíbené díky jeho jednoduchosti, rychlosti a finanční nenáročnosti provedení. Cílem této práce je statisticky zhodnotit historická data pozitivních a negativních kontrol získaných ve firmě MediTox s.r.o., dále pak na základě těchto dat navrhnout a provést optimalizaci pozitivních kontrol a poznatky z optimalizace ověřit a aplikovat v praxi na několika vzorcích. Na základě vyhodnocení historických dat firmy MediTox s.r.o. jsem usoudila, že je potřeba optimalizovat práci s *E. coli*. Bylo provedeno testování tří šarží pozitivních kontrol v provedení bez S9 a dvou šarží v provedení s S9. Kontroly poskytly konzistentní výsledky, na jejichž základě bylo možné vyhodnotit výsledky testu. Ze 3 testovaných vzorků vyplynulo, že je vhodné vyměnit *E. coli* Combo míchanou ve firmě MediTox s.r.o. ze dvou bakteriálních kmenů za dodanou a již připravenou směs těchto kmenů od firmy Xenometrix. Práci s ostatními kmeny a pozitivními kontrolami nebylo potřeba optimalizovat.

Klíčová slova

Amesův test; pozitivní kontrola; optimalizace; MPF Penta; genotoxicita; mutagenita

Optimization of positive controls and determination of genotoxic potential of the sample using reverse mutation test on bacteria

Abstract

The use of the Ames test to determine the mutagenic and therefore carcinogenic potential of chemicals is currently very popular due to its simplicity, speed and cost-effectiveness. The aim of this work is to statistically evaluate the historical data of positive and negative controls obtained in the company MediTox s.r.o., based on this data, to design and execute the optimization of positive controls and to verify and apply the findings from the optimization in practice on several samples. Based on the evaluation of historical data of MediTox s.r.o. I concluded that it is necessary to optimize the work with *E. coli*. I performed the testing of three batches of positive controls, they were carried out without S9 and two batches were carried out with S9. According to the consistent results provided by the controls, it was possible to evaluate the results of the test. As emerged from three tested samples, it is appropriate to replace the *E. coli* Combo prepared from two bacteria strains by MediTox s.r.o. by a mixture of the above mentioned strains prepared by Xenometrix. It was not necessary to optimize the work with the other strains and positive controls.

Key Words

Ames test; positive control; optimization; MPF Penta; genotoxicity; mutagenicity

Obsah

1	ÚVOD	8
1.1	Význam testování	8
1.2	Mutagenita	9
1.3	Genotoxicita	10
1.3.1	Testovací systémy	10
1.3.2	Způsob výběru a podmínky testování genotoxicity	11
1.4	Legislativa	12
1.4.1	OECD 471 - Bacterial Reverse Mutation Test.....	13
1.4.2	EMA ICH M7 Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk.....	14
1.4.3	EMA Guideline on assessment and control of mutagenic impurities in veterinary medicinal products	14
1.5	Současný stav	14
2	TEORETICKÁ ČÁST	16
2.1	Ames test	16
2.2	Princip testu	16
2.3	Testovací systémy	17
2.4	Možnosti testování	18
2.5	Porovnání klasické a mikroflukтуаční metody	18
2.6	Hodnocení Ames MPF testu	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Cíle práce	21
3.2	Hypotézy	21
3.3	Metodika	21
3.3.1	Chemikálie a roztoky	22
3.3.2	Přístrojová technika.....	23
3.3.3	Biologický materiál.....	23
3.3.4	Pracovní postup.....	23

3.4	Výsledky.....	31
3.4.1	Veškerá data nasbíraná ve firmě MediTox s.r.o. v letech 2017-2019.....	31
3.4.2	Výsledky optimalizace	37
3.4.3	Test vlivu předtestu na kulturu.....	38
3.4.4	Vlastní testování 3 vzorků.....	40
4	DISKUSE	58
5	ZÁVĚR.....	61
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	62
	SEZNAM E-ZDROJŮ	67
	SEZNAM PŘÍLOH.....	68
	SEZNAM ZKRATEK	70

1 Úvod

Určení mutagenního a genotoxického potenciálu vzorku je nedílnou součástí hodnocení léčiv, zdravotnických prostředků, průmyslových chemikálií, pesticidů, biocidů, potravinářských přídatných látek, kosmetických přísad, veterinárních léčiv a všech látek v kontextu mezinárodních právních předpisů o ochraně člověka. Amesův test je v současné době jeden z nejvíce rozšířených a užívaných screeningových testů na bakteriích, který slouží k vyloučení mutagenních účinků testovaných látek. Tak velkou rozšířenost mu zajišťuje jednoduchost, rychlost a finanční nenáročnost užití v praxi. Jedná se o test první volby, v případě negativního výsledku je testovaný materiál podroben dalšímu testování. Amesův test nelze provést u látek toxických pro bakterie, např. antibiotika.

V této práci budu provádět vyhodnocení veškerých dat nasbíraných ve firmě MediTox s.r.o. za období let od roku 2017 do současnosti. Firma MediTox s.r.o. provádí test mikrofluktuační metodou pomocí kitů dodávaných firmou Xenometrix. Tento typ testu v naší republice probíhá v režimu SLP jen ve firmě Meditox s.r.o. Další dvě instituce jsou ve fázi zavádění tohoto testu.

Protože je tento typ metody zatím v počátcích, budeme optimalizovat pracovní postup v souladu s doporučeními, která vzešla v roce 2017 z Mezinárodního semináře o testování genotoxicity (IWGT) v Tokiu, kde odborníci vytvořili seznam doporučení pro laboratoře, v nichž se tento typ testování zavádí. Všechna tato doporučení jsou v souladu s normou OECD 471 (Elespuru, 2019).

1.1 Význam testování

V současné době vědeckého pokroku v syntéze nových chemických látek je moderní společnost exponována denně stovkám látek, z nichž některé mohou být pro lidský organismus nebezpečné. Již Paracelsus v 15. století vyjádřil myšlenku „Pouze dávka určuje, že věc není jed“ (Borzelleca, 2000). Karcinogeny jsou v současné době rozděleny do dvou tříd, genotoxických a negenotoxických karcinogenů. Genotoxické karcinogeny jsou chemické látky vyvolávající karcinogenitu indukci mutací. Vzhledem k jejich interakcím s DNA se předpokládá, že neexistuje žádný bezpečný expoziční práh nebo dávka. Proto se očekává, že budou představovat genotoxická a karcinogenní rizika pro člověka, a to i při velmi nízkých koncentracích. Genotoxické karcinogeny jsou

regulovány v případě, že představují riziko vzniku rakoviny pro člověka i při velmi nízkých dávkách (Aardema, 2000, Lowel, 2000). U negenotoxických karcinogenů, které indukují rakovinu jinými mechanismy než mutacemi, jako jsou hormonální účinky, cytotoxicita, buněčná proliferace nebo epigenetické změny, se předpokládá, že mají bezpečný expoziční práh nebo dávku; jejich použití ve společnosti je tedy povoleno, pokud by úroveň expozice nebo příjmu nepřekročila limit. Například chemikálie vyvinuté pro potravinářské přídatné látky, pesticidy nebo veterinární léčiva podléhají před uvedením na trh toxikologickým testům, stanovuje se limit, tj. přijatelný denní příjem - Acceptable Daily Intake (Lu, 1988), na základě nepozorované úrovně nepříznivých účinků (NOAEL) a bezpečnostního faktoru. Testy genotoxicity jsou důležitou metodou pro rozlišení dvou tříd karcinogenů (Nohmi, 2018).

1.2 Mutagenita

Mutagenita je schopnost vyvolat trvalé přenosné změny v množství nebo struktuře genetického materiálu buněk nebo organismů. Tyto změny mohou probíhat na úrovni jediného genu, bloku více genů nebo chromozomů. Genetická změna je označována jako mutace a agens způsobující změnu jako mutagen (chemsafetypro).

Mutace

Podle vzniku dělíme mutace na spontánní a indukované. Spontánní mutace vznikají samovolně. Indukované mutace se objevují v důsledku působení fyzikálních či chemických faktorů.

Podle úrovně, na které genetickou informaci ovlivňují, dělíme mutace na genové, chromozomové a genomové. Genové mutace jsou změny, které proběhly v rámci jednoho genu, tedy nenarušily integritu celého chromozomu. Chromozomové mutace jsou změny způsobující zlomy či chromozomální přestavby. Jedná se o změny postihující několik genů najednou. Jsou rozpoznatelné i mikroskopem. U genomových mutací dochází ke změně počtu celých chromozomů.

Podle buněk, které postihují, dělíme mutace na somatické a gametické. Somatické mutace se nepřenášejí na potomky, projevují se pouze na dané buněčné linii. Způsobují změny v růstu, funkci buněk či smrti buňky. Gametické mutace se přenášejí z rodičů na potomky, postihují zárodečné buňky, účinek je dědičný.

1.3 Genotoxicita

Genotoxicita popisuje schopnost látek poškodit genetickou informaci v buňce.

Genotoxické látky jsou látky, jež jsou schopny interagovat a poškozovat buněčnou DNA, mají schopnost způsobovat poškození genetické informace uvnitř buňky, mutace a jsou základem pro vývoj vrozených vývojových vad.

Všechny mutageny jsou genotoxické, ale ne všechny genotoxické látky jsou mutagenní (chemsafetypro).

Mezi genotoxiny můžeme řadit jak chemické látky, tak záření (Mohamed, 2017), dále pak i zdravotnické prostředky posuzované v souladu s Nařízením evropského parlamentu a rady (EU) 2017/745 ze dne 5. dubna 2017 a léčiva v souladu s nařízeními Mezinárodní rady pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva ICH Q1-Q14.

1.3.1 Testovací systémy

Stále se usiluje o vývoj a zdokonalování společné strategie pro testování genotoxicity, rizik s tím spojených a výběrem vhodných testovacích systémů. Mezi dohodnuté pokyny a doporučení pro testování patří protokoly Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) k jednotlivým testům a pokyny Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků na registraci léčiv pro lidské použití (ICH) a strategické pokyny pro léčiva (ICH S2, 2011).

V souladu s principy 3R – Reduction, Replacement, Refinement (Burch, Russel, 1959) je usilováno a etickými komisemi kontrolováno užívání metod *in vivo* v souladu se směrnicemi Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely ze dne 22. září 2010.

Při všech snahách o zdokonalení postupů je potřeba zahrnout rozdílnost v metabolismu testovacích systémů *in vivo* a *in vitro* ve srovnání s relevantností užití u lidského organismu (Bigger et al., 2007). Jako řešení vlivu metabolismu u *in vitro* testů byl navrhnout exogenní metabolický aktivátor jaterní homogenizát z potkanů (Ames, 1973, Cantelli-Forti, 1997). I přesto však mohou současné testovací systémy *in vitro* generovat jak falešně negativní, tak falešně pozitivní výsledky ve vztahu k predikci karcinogenity hlodavců (Bigger et al., 1980).

1.3.2 Způsob výběru a podmínky testování genotoxicity

Výběr vhodného testu pro konkrétní látky je založen na chemických a fyzikálních vlastnostech zkoumané látky. Omezujícím kritériem může být u pevných látek například jejich rozpustnost, u kapalných jejich mísitelnost s vodou, neboť v testech bývá většinou, pro snadnost aplikace, testovací systém vystaven vodnímu roztoku (Knejzlík, Ruml, 1999).

Testovaná látka by neměla reagovat s vodou ani s ní vytvářet pěny, gely a emulze. Nesplňuje-li tuto podmínku, je nutno použít jiné rozpouštědlo ve vhodné koncentraci pro daný testovací systém, v koncentraci, která testovací systém nijak neovlivní (Knejzlík, Ruml, 1999).

Při testování pevných nerozpustných látek je nutné z testovaného materiálu udělat výluh. Musí se dodržet standardizované podmínky, a to extrakce při $37 \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu $72 \pm 2\text{h}$. Teploty vyšší než doporučené rozmezí mohou nepříznivě ovlivňovat chemické vlastnosti látky, případně složky média. K určení množství extrakčního činidla se používá extrakční poměr, tedy standardní plocha povrchu nebo hmotnost dělená objemem. Extrakci je nutné provádět s použitím polárních (např. voda, fyziologický roztok) i nepolárních extrakčních médií (např. čerstvě rafinovaný rostlinný olej). Extrakce se musí provádět za míchání či cirkulace. Extrakt se nesmí zpracovávat filtrací, odstředěním či jinými metodami k odstranění suspendovaných částic, dále pH extraktu se nesmí nijak upravovat, pokud to není opodstatněno (ČSN EN ISO 10993-12).

Některé látky mají schopnost extrahovat jak polární, tak i nepolární látky (např. DMSO, kultivační médium bez séra). Jako rozpouštědlo se v Amesově testu musí používat látky, které nejsou toxické pro daný testovací systém. Stejná rozpouštědla se používají v testech jako negativní kontrola.

DMSO je nejužívanějším rozpouštědlem pro testy mutagenity a je využíván i přes malé riziko cytotoxicity pro testovací systémy *Salmonella* (Aoki, 2010). Využívá se díky svým vlastnostem, jež umožňují rozpouštět chemikálie, které nejsou rozpustné ve vodě. Je schopný rozpouštět širokou škálu polárních i nepolárních chemikálií a je mísitelný s agarem či tekutým médiem.

Dále bylo pro použití v testu testováno několik desítek dalších rozpouštědel různých chemických tříd (amidy, nitrily, ketony, uhlovodíky, ethery, alkoholy, hydroxyethery, atd.) a vlastností schopných rozpustit širokou škálu chemikálií, u nichž bylo použití DMSO z nějakého důvodu nemožné - silná alkylační nebo acylační činidla, látka nerozpustná v DMSO nebo DMSO interferovalo s procesem metabolické aktivace (Ames, 1981).

Míra, do jaké jsou tato alternativní rozpouštědla toxická, závisí na dávce a metodě stanovení. Jako projev toxicity rozpouštědla můžeme pozorovat např. snížení mutagenní odpovědi a rychlosti spontánních mutací (Ames, 1981).

V praxi se nejčastěji využívají tyto genotoxické *in vitro* testy:

- Test reverzní mutace bakterií - Amesův test (OECD 471)
- Test chromozomových aberací savců *in vitro* (OECD 473)
- Test mutace genů savčích buněk *in vitro*, např. MLA test (OECD 476, OECD 490)
- *In vitro* savčí mikronukleus test (OECD 487)

A následující *in vivo* genotoxické testy:

- *In vivo* savčí alkalický kometový test (Comet Assay) (OECD 489)
- Savčí erytrocytární mikrojaderný test (Mikronukleus test *in vivo*) (OECD 474)
- Test chromozomových aberací savců *in vivo* (OECD 475)

1.4 Legislativa

Firma MediTox s.r.o. se zabývá preklinickým testováním v terapeutických oblastech jak veterinární, tak humánní medicíny, biotechnologii, chemickém a agrochemickém průmyslu a spolupráci ve výzkumu s univerzitami a výzkumnými institucemi. Pro účely této bakalářské práce budou detailněji rozebrány jen normy vztahující se přímo k testování veterinárních a humánních léčiv a zdravotnických prostředků.

Norma 471 pro testování chemických látek vydaná Organizací pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Organisation for Economic Co-Operation and Development – OECD 471) se týká přímo testu reverzní mutace bakterií.

Další normy se zabývají bezpečností a řízením rizik kvality při stanovení úrovní mutagenního potenciálu. Poskytují doporučení pro hodnocení a kontrolu mutagenních znečištění, které zůstává nebo se důvodně očekává, že zůstane v konkrétní látce.

Tyto normy jsou vydané Mezinárodní radou pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva (ICH), která sdružuje regulační orgány a farmaceutický průmysl za účelem diskuse o vědeckých a technických aspektech vývoje a registrace farmaceutických výrobků. ICH podporuje veřejné zdraví dosažením většího sjednocení prostřednictvím vypracování technických pokynů a požadavků na registraci farmaceutických výrobků (ICH, 2019). Mikrofluktuační Amesův test je doporučen normou ICH M7.

Normy Evropské lékové agentury (EMA) podporují vědeckou dokonalost při hodnocení a dohledu nad léčivy ve prospěch zdraví lidí a zvířat v Evropské unii. EMA se snaží usnadnit vývoj a přístup k lékům, vyhodnotit žádosti o registraci, sleduje bezpečnost léčiv po celou dobu jejich životního cyklu, poskytuje informace zdravotnickým pracovníkům a pacientům.

Z těchto a dalších mezinárodních norem vychází nařízení, předpisy a vyhlášky České republiky. Pro každou oblast lidského života konkrétní zákony a s nimi související vyhlášky zabývající se danou oblastí např. Zákon o omamných a psychotropních látkách, o léčivech, o krmivech, o potravinách, o tabákových výrobcích, o odpadech, o ochraně veřejného zdraví.

1.4.1 OECD 471 - Bacterial Reverse Mutation Test

Norma se zaměřuje především na standardizaci podmínek provádění testu. Popisuje využití těchto testů, upozorňuje na nevhodnost užití při testování vysoce baktericidních látek, jistých tříd chemikálií, dále pak na to, že nesmí být opomenut rozdíl metabolismu mezi prokaryotickou buňkou testovaného kmenu a savčími buňkami. Vysvětluje principy metod testování, popisuje postup přípravy, užití bakterií, médií, pozitivních a negativních kontrol a přístrojové techniky. Popisuje, jak správně odečíst a vyhodnotit výsledky. Dále obsahuje soupis informací, které musí obsahovat Protokol o zkoušce (OECD 471).

1.4.2 EMA ICH M7 Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk

Směrnice, jež má za úkol regulovat posouzení a kontrolu reaktivních (mutagenních) znečištění ve farmaceutických přípravcích. Tato směrnice slouží ke standardizování postupu, který lze použít pro identifikaci, kategorizaci, kvalifikaci a ke kontrole mutagenního znečištění za účelem omezení potenciálního karcinogenního rizika (EMA, 2018).

1.4.3 EMA Guideline on assessment and control of mutagenic impurities in veterinary medicinal products

Syntéza léčivých látek zahrnuje použití velkého množství chemických látek, jež v důsledku chemické syntézy nebo následné degradace nečistot může zůstat v léčivých látkách a veterinárních léčivých přípravcích. Tato směrnice poskytuje pokyny pro kvalifikaci a kontrolu většiny léčivých přípravků a jejich znečištění, které mohou být reaktivní vůči DNA. Dále smyslem této směrnice je poskytnout praktický rámec, který je použitelný pro identifikaci, kategorizaci, kvalifikaci a kontrolu těchto mutagenních nečistot, aby se omezilo potenciální karcinogenní riziko spojené s expozicí potenciálně mutagenními nečistotami. Tato směrnice doplňuje směrnice Evropské agentury pro léčivé přípravky VICH GL10 a VICH GL11. Směrnice je založena na přístupu ICH směrnice M7. I tato směrnice má za úkol regulovat posouzení a kontrolu reaktivních (mutagenních) znečištění ve veterinárních léčivých přípravcích.

1.5 Současný stav

Prvním z důvodů pro používání Amesova testu byla potenciální přenositelnost výsledků při následné registraci zdravotního prostředku v souladu s REACH (test první volby) a metodickým doporučením (OECD 471), tj. v souladu s požadavky EPA a ECHA. Dalším důvodem byla budoucí použitelnost testu pro HTS kandidátních léčiv a jejich nečistot, kterým se naše pracoviště zabývá, přičemž Ames MPF je zahrnut do požadavků EMEA. (ICH S2R1, M7 i Federální agentury pro léčiva (FDA) Dalším důvodem pro výběr tohoto testu bylo jeho relativně jednoduché provedení a rychlost (obzvláště v případě MPF varianty), zejména v porovnání s většinou eukaryotických systémů. V neposlední řadě Ames MPF metoda splňuje podmínky 3R strategie. Tyto podmínky jsou splněny tím, že nahrazují genotoxické testy *in vivo* (Replacement), dle

deklarace výrobce, která byla ověřena, snižují spotřebu živočišného materiálu (jaterního extraktu z hlodavců; Reduction) a jedná se o kvalitativně vylepšený test (Refinement) (Boroň, Kačer, 2016).

2 Teoretická část

2.1 Ames test

Roku 1975 Bruce Ames a jeho spolupracovníci na University of California v Berkeley navrhli test pro detekci mutageny indukované chemikáliemi (Ames, et al., 1974) a dále jako screenig genotoxicity, tedy zda má studovaná látka potenciál indukovat poškození DNA (Ames, McCann, 1976). Amesův test je stále jedním z nejčastěji používaných krátkodobých testů pro testování mutagenity chemických látek. Test je nutný ke schválení a uvedení nových léčiv, zdravotnických přípravků a dalších chemických látek v mnoha státech světa. V normách REACH, EPA, OECD, EMA, FDA je stanoven jako test první volby. Dle EMA ICH M7 je pozitivní AMES dostatečný důkaz genotoxicity. Pokud je test negativní, je třeba provést další genotoxické testy dle bakterie pro potvrzení negenotoxické látky (EMA ICH M7).

Testuje se několik koncentrací pro přesnou představu o komplexní odezvě dávka-odpověď. Tento typ testování nám poskytuje informace o mutagením potenciálu testované látky, o druhu mutace, jež látka způsobuje, o minimální cytotoxické koncentraci. Je ovšem důležité mít na paměti, že míra mutagenity je ovlivňovaná absorpcí látky buňkami a odlišností v metabolizaci látek (Boroň, Kačer, 2016). Díky tomuto je test stále považován za jednu z nejcitlivějších metod testování genetické toxicity na predikci karcinogenity u zvířat. Ames test je rychlá, levná in vitro metoda, s vysokou shodou predikce u hlodavčí karcinogenity (Mortelmans, Zeiger, 2000).

2.2 Princip testu

Na testovacích systémech byly provedeny bodové mutace v genech pro schopnost syntézy aminokyselin histidinu u bakterií *Salmonella typhimurium* nebo tryptofanu u bakterií *Escherichia coli*. Výsledkem jsou bakterie, které nejsou životaschopné v prostředí bez přítomnosti dependentních aminokyselin. V testu se histidin a tryptofan dependentní kmeny bakterií vystaví různým koncentracím testované látky v prostředí média postrádající danou aminokyselinu. Tato média umožňují přežít a růst pouze těm bakteriím, které prošly reverzí na histidinovou/tryptofanovou prototrofii. Genotoxická látka způsobí novou mutaci na místě předchozí mutace. Reverzní mutace, která proběhne, způsobí substituce bází nebo posuny v rámci genu. Mutací dojde ke změně v genotypu a dále ke změně fenotypu bakterie. Změna se projeví obnovením schopnosti

syntézy aminokyselin. Tyto revertantní bakterie poté budou moci růst v médiu s nedostatkem histidinu nebo tryptofanu, zatímco bakterie bez reverzní mutace nebudou schopny růst (Xenometrix, 2019).

2.3 Testovací systémy

V Ames testu se využívají kmeny *Salmonella enterica* sérotyp *Typhimurium* (*S. typhimurium*) LT2 a / nebo *Escherichia coli*. Kmeny *Salmonella* TA1535, TA1537, TA98, TA100 poskytují výbornou mezilaboratorní opakovatelnost. Kmeny *E. coli* WP2 se využívají v testu pro možnou detekci některých mutagenů působících oxidačním mechanismem. Obecně se používají kmeny WP2 jako doplněk nebo přímo jako náhrada za kmen *Salmonella typhimurium* TA102, který také nese pár bází AT v místě mutace (Mortelmans, Riccio, 2000).

Testovací kmeny jsou mutované několika mechanismy tak, aby zpětné mutace probíhaly různými mechanismy, a tím byla úplně pokryta detekce vzniku mutací na všech úrovních. Kmeny *Salmonella* pocházející ze *Salmonella typhimurium* LT2 jsou histidinové auxotrofy.

Kmeny jsou vylepšeny mutací *rfa* a *uvrB*. Mutace *rfa* vede k defektní lipopolysacharidové (LPS) vrstvě, která pokrývá buněčný povrch, čímž se bakterie stávají nepatogenní a propustnější pro velké molekuly látek (Mortelmans and Zeiger, 2000). Deleční mutace *uvrB* eliminuje mechanismus opravy excize, což umožňuje opravit více lézí DNA pomocí opravných mechanismů DNA náchylných k chybám. Takto upravené kmeny se doporučují pro obecné testování mutagenů a karcinogenů *in vitro*, protože jsou nejcitlivější na mutagenezi (Ames at all, 1973).

Kmeny byly vylepšeny plazmidem pKM101. Plazmid pKM101 je zařazen do skupiny plazmidů rezistence neboli R plazmidům, které obsahují geny, jejichž produkty nesou rezistenci proti jednomu či více druhům antibiotik (Mortemans,2006). Rodičovským plazmidem pro plazmid pKM101 je plazmid R46, tento rodičovský plazmid způsobuje rezistenci na ampicilin, streptomycin, sulfonamid a tetracyklin. Plazmid pKM101 způsobuje odolnost už pouze proti ampicilinu. Dále obsahuje R faktor, který zvyšuje chemické mutageneze a mutageneze vyvolané UV prostřednictvím opravné dráhy rekombinační DNA mající sklon k chybám.

Deleční mutace *uvrA* eliminuje přesný mechanismus opravy excize, což umožňuje opravit více lézí DNA pomocí opravných mechanismů DNA náchylných k chybám.

Konkrétní genotypy kmenů jsou uvedeny v Tabulka 1.

Tabulka 1. Genotypy testovaných kmenů (Xenometrix)

Kmen	Mutace	Typ mutace	Cílové báze	Mutace buněčné stěny	Mechanismus opravy	pKM101
<i>S. typhimurium</i>						
TA 98	hisD3052	Posun rámce	GCGCGCGC	rfa	uvrB	ano
TA 100	hisG46	Substituce páru bazí	GGG	rfa	uvrB	ano
TA 1535	hisG46	Substituce páru bazí	GGG	rfa	uvrB	ne
TA 1537	hisC3056	Posun rámce	+ 1 posun	rfa	uvrB	ne
<i>E. coli</i> WP2						
uvrA	trpE65	Substituce páru bazí	A:T	n/a	uvrA	ne
pKM101	trpE65	Substituce páru bazí	A:T	n/a	n/a	ano

Zdroj: Xenometrix

2.4 Možnosti testování

Pro provedení Amesova testu bylo popsáno hned několik přístupů, z nichž je většina zahrnuta v OECD 471. Jedná se o testy na agarových plotnách (Spot test, Plate Incorporation Assay, Preincubation assay) a Mikrofluktuační metoda (MPF). Každá z použitých metod musí zahrnovat negativní a pozitivní kontrolu.

2.5 Porovnání klasické a mikrofluktuační metody

Obě metody jsou založeny na stejném principu. U klasického Amesova testu se používají sterilní Petriho misky, u MPF metody se využívají mikrotitrační destičky, čímž se sníží spotřeba plastů, dále došlo ke zmenšení testovacího prostoru, tudíž MPF využívá menší množství použitého kultivačního média, které je na rozdíl, od na agaru prováděného klasického testu, kapalné. Dále se liší ve způsobu vyhodnocení výsledků. Klasický Amesův test se hodnotí počítáním kolonií vyrostlých na miskách, u MPF metody se kolorimetricky vyhodnocují pozitivní jamky. Vzhledem k menšímu množství používaného kultivačního média se až 14 x snižuje spotřeba frakce S9. Na MPF test se spotřebuje až 4x méně testované látky, což je výhodou zejména u látek s obtížnou

syntézou a nízkou výtěžností. Díky nízké náročnosti na spotřebu testované látky je tato metoda doporučena směrnicí ICH M7 a hojně využívaná pro screening léčiv a jejich nečistot, především ve fázi vývoje, při němž je relativní nedostatek testované látky (Boroň, Kačer, 2016).

Při porovnávání klasického Amesova testu a testu MPF došlo v 84,2 % ke shodě, a v porovnání mezilaboratorním dokonce 89,5 % shodě. Vzhledem k vysoké shodě mezi oběma testovacími systémy a nízké mezilaboratorní variabilitě ve výsledcích testu MPF je MPF účinnou alternativou screeningu ke klasickému Amesovu testu (Baumeister, 2004). Při přímém porovnání MPF testu a preincubation assay byla shoda 87 % (Flückiger-Isler, Kamber, 2012). V porovnání mezi přístupy *in vitro* a *in vivo* je 84% shoda v identifikaci mutagenů a nemutagenů. Porovnáváno je s použitím předpovědi hlodavčí karcinogenity (Engelhard et al., 2009).

2.6 Hodnocení Ames MPF testu

Výsledky MPF testu se vyhodnocují kolorimetricky, na základě změny barvy indikačního média z fialové na žlutou. K této změně dochází na základě poklesu pH v indikačním médiu, díky metabolické aktivitě přeživších bakterií.

V každém testu je použita negativní (NK) a pozitivní kontrola (PK). Jako NK se v testech používá rozpouštědlo, PK jsou použity pro konkrétní kmeny a konkrétní provedení – s metabolickým aktivačním systémem (MAS) nebo bez něj.

Pro provedení bez MAS se jako PK používá pro kmen *Salmonella* TA98 2-nitrofluorene (2-NF), pro kmen TA100 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO), pro kmen TA1535 N⁴-aminocitidine (N⁴-ACT), pro kmen TA1537 9-aminoacridine (9-AA) a pro *Escherichia coli* Combo se jako PK používá 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO).

Pro provedení s MAS se pro všechny kmeny *Salmonella* používá jako PK 2-aminoanthracene (2-AA) v rozdílných koncentracích a pro *Escherichia coli* Combo se jako PK používá 2-aminofluorene (2-AF).

Aby byl test platný, musí pozitivní a negativní kontrola splnit následující kritéria:

Hodnoty negativní kontroly (rozpouštědla) pro kmeny TA98, TA1535 a TA1537 by v ideálním případě měly být ≤ 8 pozitivních jamek, a pro kmeny TA100 a *E. coli* Combo ≤ 12 pozitivních jamek.

Hodnoty pozitivní kontroly:

- 1) Počet revertantních kolonií pozitivních kontrol musí být výrazně zvýšen nad počet spontánních kontrol, aby byl test považován za platný.
- 2) Dodavatel kitu, firma Xenometrix doporučuje nastavit prahovou hodnotu > 3násobku základní hodnoty pro TA98, TA1535 a TA1537 a > 2násobku základní hodnoty pro TA100 a *E. coli* Combo.
- 3) Počet revertantů pro pozitivní kontrolní chemikálie pro každý kmen by měl odpovídat historickému rozsahu.

Tabulka 2. Historická data firmy Xenometrix

Bakterie	TA98	TA100	TA1535	TA1537	<i>E. coli</i> Combo
Počet pozitivních jamek bez S9					
Negativní kontrola	0-5	1-9	0-6	0-3	1-11
2-NF (2.0 µg/ml)	40-48				
4-NQO (0.1 µg/ml)		40-48			
N ⁴ -ACT (100 µg/ml)			40-48		
9-AAc (15 µg/ml)				40-48	
4-NQO (2 µg/ml)					30-44
Počet pozitivních jamek s S9					
Negativní kontrola	0-6	0-6	0-4	0-2	1-7
2-AA (1.25µg/ml)					
2-AA (1-2 µg/ml)	40-48				
2-AA (2.5µg/ml)					
2-AA (5µg/ml)		33-48	20-42	20-42	
2-AF (400 µg/ml)					35-45

Zdroj: Xenometrix

3 Experimentální část

3.1 Cíle práce

Cílem mé práce je vyhodnocení veškerých historických dat pozitivních a negativních kontrol ve firmě Meditox s.r.o. Na základě vyhodnocení výsledků navrhnout kritické body v průběhu testu, během nichž by mohlo dojít k ovlivnění výsledků. Dále pak vyhodnotit faktory, které mohou způsobit ovlivnění jakýmkoli způsobem a optimalizací postupů zjistit, jestli dané faktory opravdu ovlivnily průběh testu. Na závěr práce zjištěné poznatky aplikovat při samostatném testování 3 vzorků.

3.2 Hypotézy

Genotoxická či mutagenní testovaná látka vyvolá zpětnou mutaci revertantních kmenů bakterií.

Koncentrace pozitivních kontrol doporučená firmou Xenometrix je nastavená vypovídajícím způsobem.

Výsledky testů pozitivních a negativních kontrol závisí na bezchybnosti provedení testů v laboratoři.

3.3 Metodika

Využili jsme komerčně vyráběný test Ames MPFTM Penta I, dodávaný firmou Xenometrix. Bakterie v Ames MPFTM testu jsou vystaveny působení 6 koncentracím zkušební vzorku, negativní a pozitivní kontrole. Po dobu 90 minut jsou bakterie pomnoženy v expozičním médiu obsahujícím dostatek histidinu (*Salmonella typhimurium*) nebo tryptofanu (*Escherichia coli*) pro přibližně dvě buněčná dělení. Po namnožení bakterií v každé koncentraci (negativní kontrola, různé koncentrace testovaného vzorku, pozitivní kontrola) se bakterie zředí v pH indikačním médiu, jež postrádá histidin/tryptofan a rozpípetují se z 24jamkové destičky na destičku 384jamkovou. Takto připravené destičky s exponovanými buňkami se nechají kultivovat 48 hodin. Během této doby vyrostou bakterie, které prošly zpětnou mutací na aminokyselinovou prototrofii. Metabolismus revertantních bakterií snižuje pH indikačního média, a tím se mění jeho barva z fialové barvy na žlutou.

Po 48hodinové kultivaci se vyhodnotí počet pozitivních jamek. Počet pozitivních jamek se hodnotí pro každou koncentraci testovaného vzorku a porovnává se s počtem pozitivních jamek negativní kontroly. Každá koncentrace se testuje ve trojím provedení, aby bylo možné statistické zhodnocení dat. Funkčnost testu musí být potvrzena pozitivní kontrolou.

Zda je vzorek mutagenní v Ames MPF testu či nikoli, se vyhodnocuje v závislosti na dávce a zvýšení počtu revertantních bakterií ve vztahu k negativní kontrole.

Mutagenní potenciál vzorku se hodnotí přímo a také po metabolické aktivaci, která je zajišťována jaterním homogenátem S9.

3.3.1 Chemikálie a roztoky

2-aminoanthracene

2-nitrofluorene

4-nitroquinoline- N-oxide

9-aminoacridine

Ampicilin 50 mg/ml

Booster Solution

Dimethylsulfoxid (DMSO)

E. coli Exposure Medium

E. coli Indicator Medium

Glukózo-6-fosfát sodná sůl

Growth Medium

KCl

MgCl₂ x 6H₂O

N⁴-aminocytidine

Sodná sůl nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADP)

NaH₂PO₄ pufr

S9 frakce indukovaná Aroclorem

Salmonella Exposure Medium

Salmonella Indicator Medium

Voda na injekce

3.3.2 *Přístrojová technika*

Environmentální třepačka schopná inkubace při 37 ± 1 °C, 250 ot./min. Amplituda 2,5–3 cm (protože firma MediTox disponuje třepačkou s amplitudou 1,9 cm, bylo firmě doporučeno firmou Xenometrix nastavení otáček na 300 ot./min), inkubátor 37 ± 1 °C, spektrofotometr pro měření optické hustoty při 600 nm, automatické jednonanálové pipety (20 µl, 200 µl a 1000 µl), 8kanálové automatické pipety (5–50 µl a 50–200 µl), 8kanálový opakovací dávkovač, dispenzer, light box pro lepší odečítání výsledků, mrazicí box (-20 °C a méně), hluboko mrazicí box (-70 °C a méně), UV zářič, laminární box, laboratorní plasty (24jamkové mikrotitrační destičky, 384jamkové mikrotitrační destičky, 96jamkové mikrotitrační destičky, spektrofotometrické kyvety, sterilní pipetovací špičky, sérologické pipety, uzavíratelné zkumavky o objemu 50 ml atd.), počítač s programem Excel Calculation Sheet pro vyhodnocení výsledků.

3.3.3 *Biologický materiál*

Salmonella typhimurium (TA98, TA100, TA1535, TA1537)

Escherichia coli (WP2 [pKM101], WP2 uvrA)

3.3.4 *Pracovní postup*

3.3.4.1 *Amesův mikrofluktuační test*

Příprava metabolického aktivačního systému (30% frakce S9)

Pro přípravu metabolického aktivačního systému je potřeba smíchat dodanou lyofilizovanou frakci S9 s kofaktory, které jsme připravili přímo v testovací laboratoři. Kofaktory se připravují rozpuštěním daných chemikálií v deionizované nebo destilované vodě. Pro zajištění sterility se připravené roztoky 1M KCl (3,728 g / 50 ml), 0,25M MgCl₂·6H₂O (2,541 g / 50 ml) a 0,2M NaH₂PO₄ (31,200 g / 1 l) sterilizují v autoklávu při 121°C po dobu 20 min. Roztoky 0,2M glukozo-6-fosfát sodné soli (0,564 g / 10 ml) a 0,04M NADP sodné soli (0,306 g / 10 ml) se sterilizují filtrací přes sterilní filtr 0,45 µm. Zmražené reagenty se nechají rozmrazit, všechny rozmražené reagenty se před a během používání uchovávají na ledu. Frakce S9 je indukována pomocí Arocloru 1254 nebo fenobarbital/p-naftoflavonu. V tomto testu jsme používali frakci S9 indukovanou Aroclorem 1254. Lyofilizovaná S9 se smíchá s *Aqua pro injectione* v množství uvedeném na vialce, ve které je S9 dodávána. Takto připravenou

S9 lze znovu 1 x zamrazit na -20 a méně °C a znovu použít. Finální koncentrace S9 v kultuře je 4,5 % (SOP STU-41-18 Mikrofluktuační Amesův Test).

Tabulka 3. Množství použitých kofaktorů frakce S9

Roztok	Objem pro 5 kmenů bakterií
1M KCl	0,179 ml
0,25M MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,172 ml
0,2M glukóza-6-fosfát sodná sůl	0,136 ml
0,04M NADP sodná sůl	0,540 ml
0,2M NaH ₂ PO ₄ pufr	2,754 ml
S9 frakce	1,620 ml

Zdroj: Xenometrix

Pozitivní kontroly

Připravíme si zásobní roztoky PK, ty napipetujeme do pozitivních kontrolních jamek ve trojím provedení na odpovídající 24jankové expoziční destičky (pozice A+, B+, C+ viz Obrázek 2).

Tabulka 4. Pozitivní kontroly pro testování bez frakce S9 (Xenometrix)

Kmen	PK	Zásobní roztok (25x)	Konečná koncentrace
TA98	2-NF	50 µg/ml	2 µg/ml
TA100	4-NQO	2,5 µg/ml	0,1 µg/ml
TA1535	N4-ACT	2,5 mg/ml	100 µg/ml
TA1537	9-AA	375 µg/ml	15 µg/ml
<i>E. coli</i> Combo	4-NQO	50 µg/ml	2 µg/ml

Zdroj: Xenometrix

Tabulka 5. Pozitivní kontroly pro testování s frakcí S9

Kmen	PK	Zásobní roztok	Konečná koncentrace
TA98	2-AA	25 µg/ml	1 µg/ml
TA100	2-AA	62,5 µg/ml	2,5 µg/ml
TA1535	2-AA	62,5 µg/ml	2,5 µg/ml
TA1537	2-AA	62,5 µg/ml	2,5 µg/ml
<i>E. coli</i> Combo	2-AF	10 mg/ml	400 µg/ml

Zdroj: Xenometrix

Den 1

V den 1 se připraví Overnight kultury. Bakteriální kmeny a ampicilin se nechají rozmrazit při pokojové teplotě. Do 50ml zkumavek se přidá 10 ml Growth Media. Do zkumavek s kmeny TA98, TA100 a WP2 pKM101 (případně WP2 uvrA[pKM101]) se přidá 10 μ l ampicilinu (50mg/ml). Ampicilin se nepřidává ke kmenům TA1535, TA1537 a WP2 uvrA, protože tyto tři kmeny neobsahují R-faktor plazmid pKM101 nesoucí rezistenci na ampicilin. Do zkumavek s bakteriálními kmeny se přidá 200 μ l Growth Media a mechanicky se naruší polotuhý obsah vialky, dokud nevznikne homogenní suspenze. 25 μ l suspenze se přenesse do připravených 50ml zkumavek. Pro zajištění dostatečného provzdušnění kultur pro správný noční růst se zkumavky přiklopí víčkem, které se zajistí lepicí páskou proti odpadnutí. Zkumavky se nesmí zašroubovat. Kultury mohou růst nedostatečně, pokud není zajištěno orbitální prostředí třepačky s třepací frekvencí 300 ot/min na 14 – 16 hodin při 37 °C.

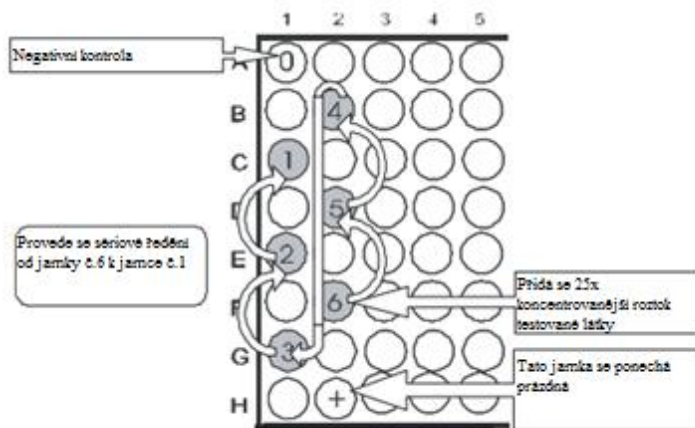
Den 2

Po kultivaci kultur přes noc se změří optická denzita vzorku při vlnové délce 600 nm (OD_{600}). Optická denzita vyjadřuje koncentraci bakterií v médiu. Měření OD může indikovat, ve které fázi růstu se bakterie nacházejí (Stevenson, 2016).

Pro další použití kultur musejí být hodnoty optické denzity negativní kontroly $\leq 0,05$ a hodnoty bakteriálních kultur $> 2,0$. Pokud hodnoty OD_{600} u bakterií jsou nižší, znamená to, že kultury přes noc nenarostly dostatečně, což může být způsobeno nedostatečným provzdušněním, nedostatečným třepáním, neoptimální teplotou nebo špatným skladováním kultur před použitím v testu. Je možné v kultivaci kultur pokračovat, výrobce však nedoporučuje celkovou dobu kultivace delší než 24 hodin. Pokud je hodnota OD_{600} negativní kontroly vyšší než $\leq 0,05$, došlo ke kontaminaci a nelze tedy v testování s danými kulturami pokračovat.

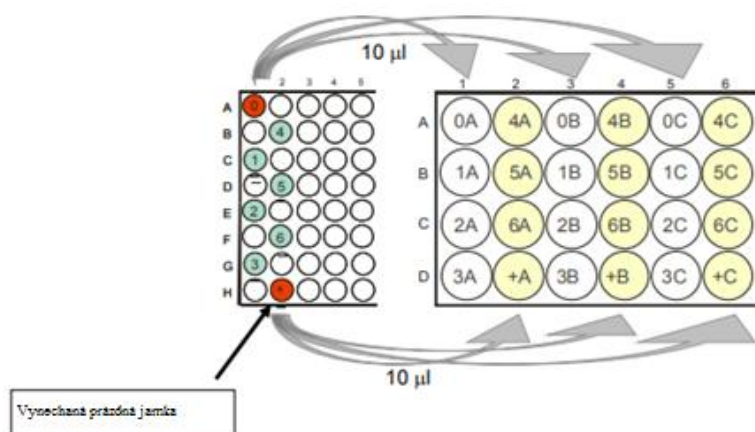
Provede se preexperiment pro vyloučení spontánních mutací bakteriálních kmenů TA100 a *E.coli*.*

V hlavním experimentu se připraví zásobní roztok testované látky (25x koncentrovanější než nejvyšší koncentrace, která bude v testu použita). Koncentrační řada se připraví postupným ředěním testované látky viz Obrázek 1.



Obrázek 1. Příprava koncentrační řady (Xenometrix)

Připravená koncentrační řada se přenese na 24jamkové destičky dle schématu viz Obrázek 2.



Obrázek 2. Přesun vzorků látky na expoziční destičky (Xenometrix)

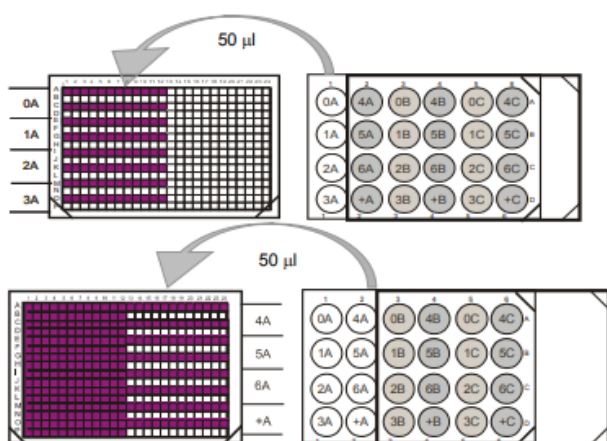
Následuje příprava expoziční kultury. Pro každý kmen bez MAS se připraví směs odpovídající Overnight kultury a odpovídajícího expozičního média (Salmonella Exposure Medium nebo E.coli Exposure Medium). Výsledné směsi se nalijí do pipetovací vaničky, ze které se přenese 240 µl na každou jamku připravené 24jamkové expoziční destičky.

Pro každý kmen s MAS se do zkumavky připraví odpovídající expoziční médium (Salmonella Exposure Medium nebo E.coli Exposure Medium). MAS může mít toxický efekt na kmeny TA1537 a TA100, jako ochrana se použije S9 100/1537 Booster Solution (směs Booster Solution se Salmonella Exposure Medium v poměru 1:667). K expozičnímu médiu se přidá odpovídající Overnight kultura a 30% S9 mix. Výsledné

směsi se nalijí do pipetovací vaničky, ze které se přenesse 240 µl na každou jamku připravené 24jamkové expoziční destičky.

24jamkové destičky se inkubují v inkubátoru s třepáním při 37 °C a 250 ot/min po dobu 90 minut. Po inkubaci se sensoricky zhodnotí vzhled kultur ve všech jamkách. Kontroluje se zakalení, jež signalizuje, že kultury žijí, tedy látka není v dané koncentraci cytotoxická. Po sensorické kontrole se do každé jamky nadávkuje 2,6 ml správného indikačního média (Salmonella Indicator Medium nebo E.coli Indicator Medium).

Následuje přesun kultur z 24jamkové destičky na 38jamkovou destičku podle schématu viz Obrázek 3.



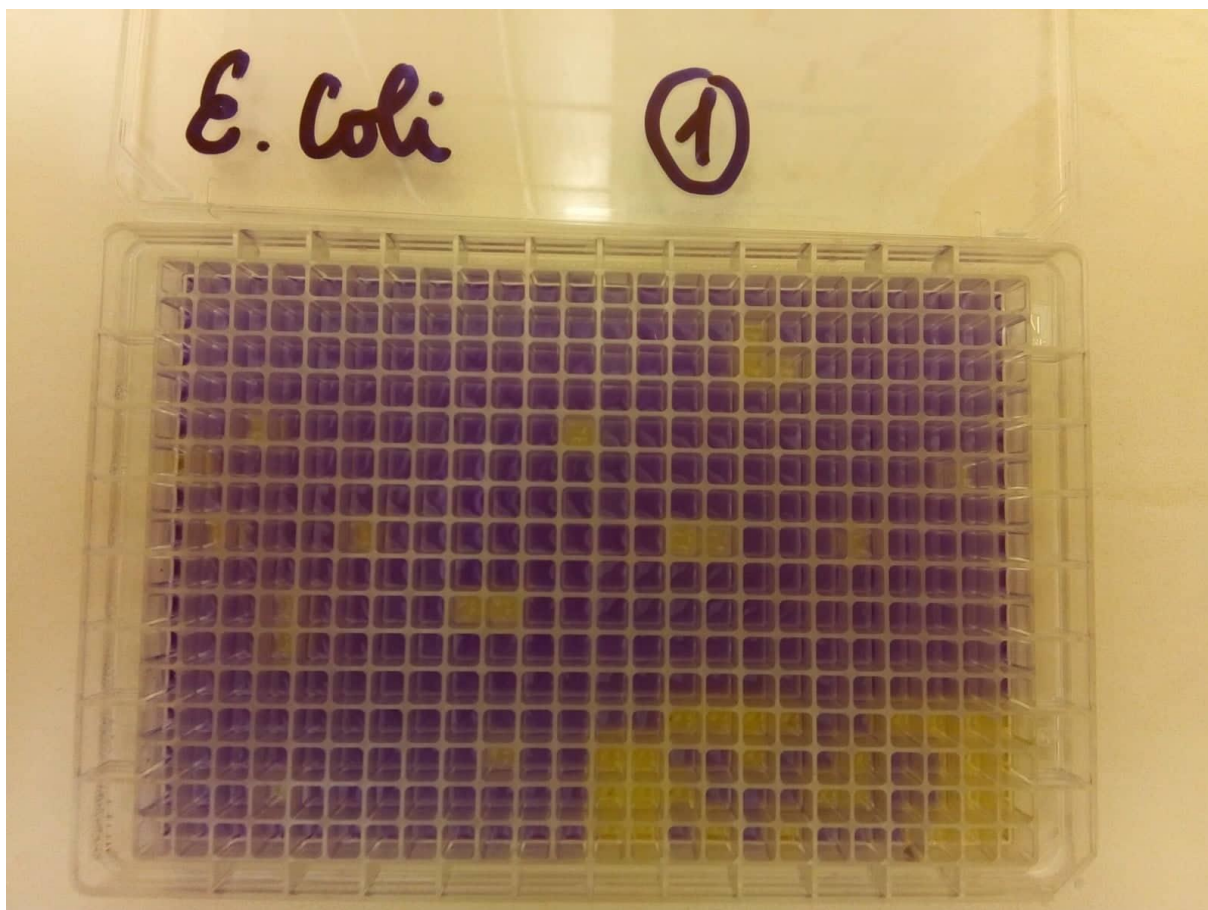
Obrázek 3. Přesun kultur z 24jamkové destičky na 384jamkovou destičku (Xenometrix)

Připravené 384jamkové destičky se vloží na 48 hodin v plastovém sáčku bránícím odpařování do inkubátoru nastaveného na 37 °C.

Den 4 - vyhodnocení testu

Po 48 hodinách se 384jamkové destičky vyhodnotí. Pomocí šablony rozdělíme destičku na 8 stejných sekcí po 48 jamkách. Každá sekce odpovídá jedné koncentraci, NK a PK. Spočítají se počty jamek s pozitivními výsledky (žlutě zbarvený obsah) v každé sekci. Výpočet se provede na všech třech destičkách pro každý kmen bakterií. Spočítané výsledky se zadají do výpočetní tabulky v MS Excel – do souboru Calculation Sheet Ames MPF, který vyhodnotí nejen mutagenní potenciál, ale také cytotoxicitu vzorku.

Pokud ve vyšších koncentracích testované látky (případně výluhu testované látky) klesá počet pozitivních jamek, zejména pokud jde o pokles závislý na koncentraci nebo je počet pozitivních jamek výrazně nižší než u NK, je testovaná látka pravděpodobně cytotoxická.



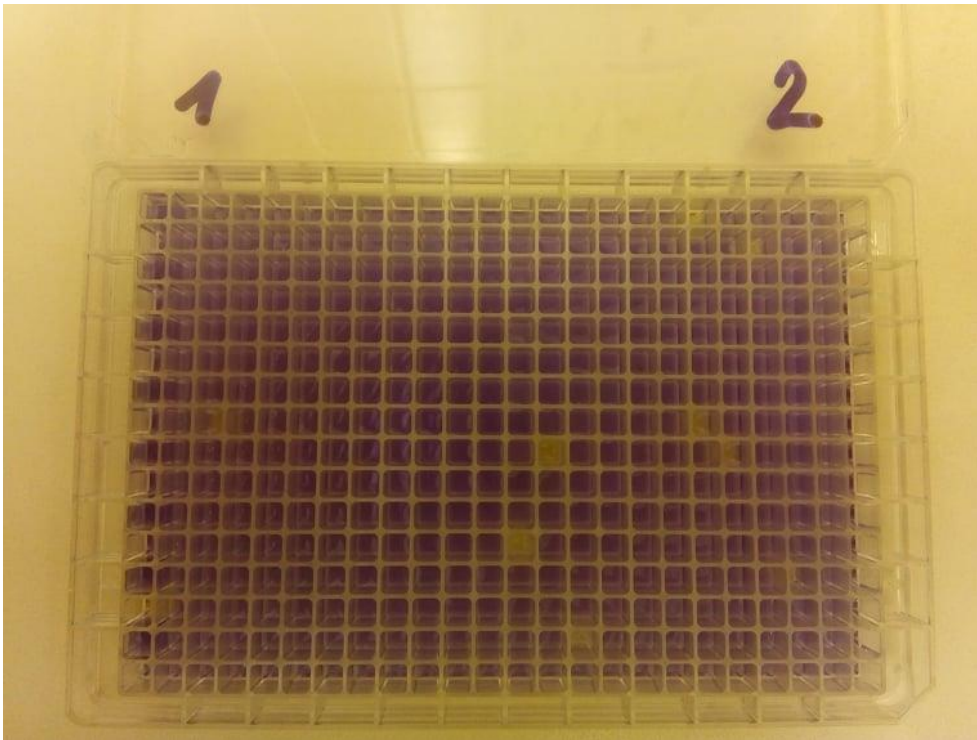
Obrázek 4. Pozitivní jamky kmene *E. coli* Combo (vlastní)

*Preexperiment pro vyloučení spontánních mutací bakteriálních kmenů

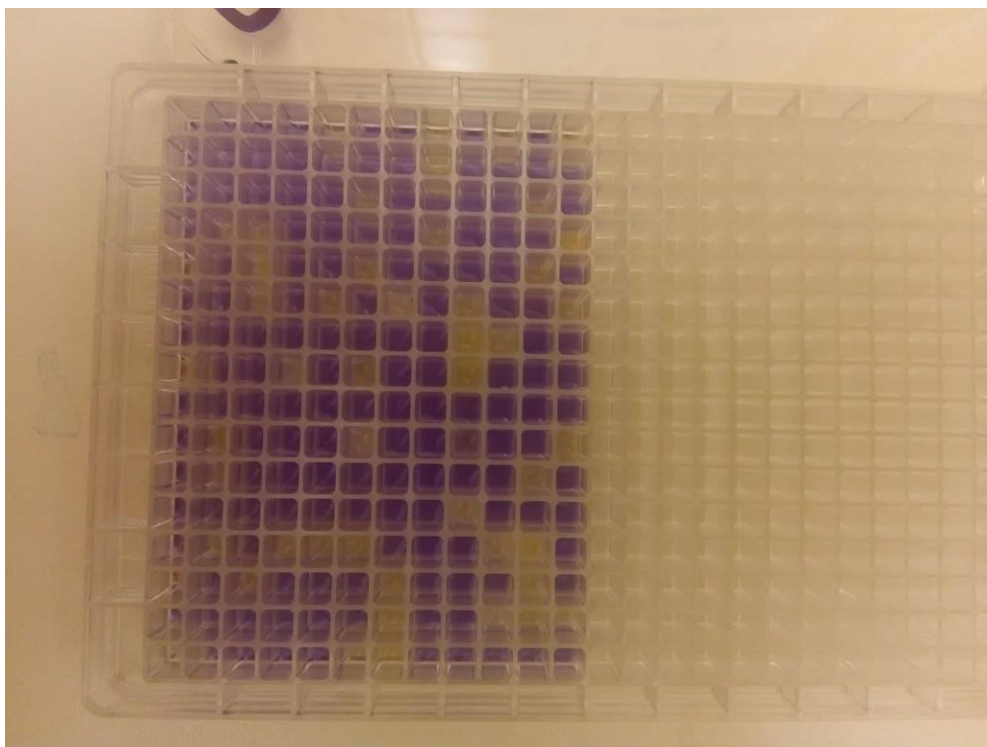
Protože kmeny *Salmonella typhimurium* TA100 a *E. coli* WP2 [pKM101] mají vyšší míru vzniku spontánních mutací, je doporučeno před hlavním testem provést preexperiment pro výběr kultury, která spontánně nejméně mutuje. Vyšší počet spontánně revertantních bakterií vede k falešně pozitivnímu výsledku. Kultury s vyšším počtem spontánních mutací se vyskytují s frekvencí 5-10 % v závislosti na šarži, podmínkách skladování a manipulaci.

Příprava Overnight (ON) kultur proběhne v Den 1. Z bakteriálních kmenů TA100 a WP2 pKM101 (případně pro WP2 *uvrA* [pKM101]) se připraví tři ON kultury z jedné

vialky s bakteriemi. V Den 2 se část dostatečně narostlých ON kultur smíchá v poměru 1:1 s Growth Médium a uloží do lednice (vybrané kultury se po ukončení preexperimentu použijí v hlavním testu, před kterým se provede inkubace při 37 °C a 300 ot/min pro restartování kultur, během kterého musí dosáhnout cca 75 % původní hodnoty OD). Samotný preexperiment se provede stejně jako hlavní test. Nepoužije se testovaná látka ani PK. Preexperiment se neprovádí v tripletech, ale na každé třetině 24jamkové destičky je použita jiná Overnight kultura stejného kmene bakterií. Pro kultivaci na 384jamkových destičkách (změnu barvy indikačního média pro identifikaci spontánních mutantů) je potřeba minimálně 48 hodin. Pokud preexperiment probíhá přes víkend, trvá kultivace cca 68 hodin. Po ukončení kultivace se destičky vyhodnotí a vyberou se kultury s nejmenším počtem pozitivních jamek.



Obrázek 5. Předtest 1. a 2. kultury *E. coli* Combo (vlastní)



Obrázek 6. Předtest 3. kultury *E. coli* Combo (vlastní)

3.3.4.2 Postup optimalizace

Z registratury firmy MediTox s.r.o. se shromáždí veškerá data získaná v letech 2017-2019. Tato data se uspořádají do tabulek a na jejich základě se určí kritické body, které budou následně optimalizovány, aby byl personál laboratoře schopen na základě získaných výsledků s jistotou hodnotit mutagenní a genotoxický potenciál látek. Výsledky a závěry optimalizace budou ověřeny na 3 vzorcích zdravotnických prostředků, 1 rozpustný ve vodě a 2 výluhy.

3.4 Výsledky

3.4.1 Veškerá data nasbíraná ve firmě MediTox s.r.o. v letech 2017-2019

Výsledné počty pozitivních jamek negativních i pozitivních kontrol nashromážděné ve firmě MediTox s.r.o. jsem rozdělila podle kmenů do Tabulek 6 - 11

Tabulka 6. Pozitivní jamky kontrol bakterií *Salmonella typhimurium* kmen TA98

Číslo vzorku	TA 98 bez S9									
	NK (vehikulum)			Průměr	SD	PK (2-NF 2.0 µg/ml)			Průměr	SD
1	1	1	0	0,7	0,6	48	48	48	48,0	0,0
2	0	3	6	3,0	3,0	47	47	46	46,7	0,6
3	0	0	1	0,3	0,6	41	45	38	41,3	3,5
4	0	0	1	0,3	0,6	48	45	46	46,3	1,5
5	1	1	0	0,7	0,6	48	47	48	47,7	0,6
6	5	1	2	2,7	2,1	48	48	48	48,0	0,0
7	1	2	1	1,3	0,6	48	48	48	48,0	0,0
8	0	1	1	0,7	0,6	48	48	48	48,0	0,0
9	1	3	1	1,7	1,2	48	48	48	48,0	0,0
10	2	1	3	2,0	1,0	48	48	48	48,0	0,0
11	5	4	3	4,0	1,0	48	48	48	48,0	0,0
12	2	1	0	1,0	1,0	48	48	48	48,0	0,0
Číslo vzorku	TA98 s S9									
	NK (vehikulum)			Průměr	SD	PK (2-AA 1-2 µg/ml)			Průměr	SD
1	0	1	1	0,7	0,6	48	48	48	48	0
2	1	3	0	1,3	1,5	48	48	48	48	0
3	3	2	1	2,0	1,0	48	48	48	48	0
4	0	0	0	0,0	0,0	48	48	48	48	0
5	1	3	4	2,7	1,5	48	48	48	48	0
6	4	1	0	1,7	2,1	48	48	48	48	0
7	0	0	0	0,0	0,0	48	48	48	48	0
8	1	0	1	0,7	0,6	48	48	48	48	0
9	0	2	1	1,0	1,0	48	48	48	48	0
10	1	0	1	0,7	0,6	48	48	48	48	0
11	2	0	1	1,0	1,0	48	48	48	48	0
12	1	1	0	0,7	0,6	48	48	48	48	0

Zdroj: vlastní

Tabulka 7. Pozitivní jamky kontrol bakterií *Salmonella typhimurium* kmen TA100

Číslo vzorku	TA100 bez S9									
	NK (vehikulum)			Průměr	SD	PK (2-NF 2.0 µg/ml)			Průměr	SD
1	10	15	3	9,3	6,0	47	48	47	47,3	0,6
2	1	2	2	1,7	0,6	48	48	47	47,7	0,6
3	4	2	4	3,3	1,2	48	48	48	48,0	0,0
4	0	5	4	3,0	2,6	47	48	48	47,7	0,6
5	2	1	1	1,3	0,6	47	45	46	46,0	1,0
6	4	8	2	4,7	3,1	47	47	48	47,3	0,6
7	4	3	4	3,7	0,6	45	47	47	46,3	1,2
8	5	5	2	4,0	1,7	48	44	43	45,0	2,6
9	6	6	3	5,0	1,7	43	47	47	45,7	2,3
10	41	45	46	44,0	2,6	42	41	41	41,3	0,6
	5*	3*	7*	5,0	2,0	39*	46*	45*	43,3	3,8
11	10	12	14	12,0	2,0	45	42	47	44,7	2,5
12	8	6	7	7,0	1,0	44	47	46	45,7	1,5
Číslo vzorku	TA100 s S9									
	NK (vehikulum)			Průměr	SD	PK (2-AA 1-2 µg/ml)			Průměr	SD
1	3	5	1	3,0	2,0	46	48	43	45,7	2,5
2	2	1	3	2,0	1,0	48	46	48	47,3	1,2
3	5	3	5	4,3	1,2	48	48	48	48,0	0,0
4	4	8	2	4,7	3,1	47	48	48	47,7	0,6
	2*	1*	1*	1,3	0,6	48*	48*	48*	48,0	0,0
	1*	6*	2*	3,0	2,6					
	5*	5*	2	4,0	1,7					
	8*	6*	3	5,7	2,5					
	3*	3*	2	2,7	0,6					
	3*	6*	5	4,7	1,5					
	4*	1*	3	2,7	1,5					
5	5	6	1	4,0	2,6	48	48	48	48,0	0,0
6	9	9	4	7,3	2,9	48	48	48	48,0	0,0
7	1	2	3	2,0	1,0	45	46	46	45,7	0,6
8	1	7	1	3,0	3,5	46	47	48	47,0	1,0
9	4	6	2	4,0	2,0	47	48	47	47,3	0,6
10	4	1	0	1,7	2,1	47	47	48	47,3	0,6
	1*	1*	0*	0,7	0,6	45*	46*	46*	45,7	0,6
	1*	0*	1*	0,7	0,6	47*	47*	48*	47,3	0,6
11	2	1	3	2,0	1,0	46	47	47	46,7	0,6
12	2	5	1	2,7	2,1	44	44	43	43,7	0,6

Zdroj: vlastní

* Opakované testování z důvodu nemožného vyhodnocení dat z předchozího testu

Tabulka 8. Pozitivní jamky kontrol bakterií *Salmonella typhimurium* kmen**TA1535**

Číslo vzorku	TA1535 bez S9									
	NK (vehikulum)			Průměr	SD	PK (N4-ACT100 µg/ml)			Průměr	SD
1	1	0	1	0,7	0,6	48	48	48	48,0	0,0
2	3	0	4	2,3	2,1	48	48	48	48,0	0,0
3	0	1	2	1,0	1,0	48	48	47	47,7	0,6
4	0	1	0	0,3	0,6	48	48	48	48,0	0,0
5	1	1	2	1,3	0,6	48	48	48	48,0	0,0
6	1	0	0	0,3	0,6	48	48	48	48,0	0,0
7	1	2	1	1,3	0,6	48	48	48	48,0	0,0
8	0	1	0	0,3	0,6	48	48	48	48,0	0,0
9	0	2	0	0,7	1,2	48	48	48	48,0	0,0
10	2	1	3	2,0	1,0	48	48	48	48,0	0,0
11	2	2	2	2,0	0,0	48	48	48	48,0	0,0
12	2	1	0	1,0	1,0	48	48	48	48,0	0,0
Číslo vzorku	TA1535 s S9									
	NK (vehikulum)			Průměr	SD	PK (2-AA 5µg/ml)			Průměr	SD
1	0	0	0	0,0	0,0	24	17	20	20,3	3,5
2	1	2	1	1,3	0,6	45	47	43	45,0	2,0
3	0	4	2	2,0	2,0	22	20	29	23,7	4,7
4	0	1	1	0,7	0,6	47	46	45	46,0	1,0
5	1	1	0	0,7	0,6	39	41	44	41,3	2,5
6	0	0	1	0,3	0,6	27	33	25	28,3	4,2
7	0	2	2	1,3	1,2	40	41	42	41,0	1,0
8	0	2	1	1,0	1,0	25	26	24	25,0	1,0
9	3	0	1	1,3	1,5	22	26	16	21,3	5,0
10	0	1	1	0,7	0,6	41	36	40	39,0	2,6
11	0	1	2	1,0	1,0	29	28	29	28,7	0,6
12	2	0	0	0,7	1,2	38	43	39	40,0	2,6

Zdroj: vlastní

Tabulka 9. Pozitivní jamky kontrol bakterií *Salmonella typhimurium* kmen**TA1537**

Číslo vzorku	TA1537 bez S9									
	NK (vehikulum)			Průměr	SD	PK (9-AAc 15 µg/ml)			Průměr	SD
1	0	0	5	1,7	2,9	48	48	48	48,0	0,0
2	0	0	0	0,0	0,0	48	48	48	48,0	0,0
3	3	0	1	1,3	1,5	48	48	48	48,0	0,0
4	0	0	1	0,3	0,6	48	48	48	48,0	0,0
5	0	0	1	0,3	0,6	48	48	48	48,0	0,0
6	0	1	3	1,3	1,5	48	48	48	48,0	0,0
7	1	0	1	0,7	0,6	48	48	48	48,0	0,0
8	1	0	0	0,3	0,6	48	48	48	48,0	0,0
9	1	1	1	1,0	0,0	48	48	48	48,0	0,0
10	0	7	1	2,7	3,8	48	48	48	48,0	0,0
11	0	0	0	0,0	0,0	48	48	48	48,0	0,0
12	0	0	0	0,0	0,0	48	48	48	48,0	0,0
Číslo vzorku	TA1537 s S9									
	NK (vehikulum)			Průměr	SD	PK (2-AA 5µg/ml)			Průměr	SD
1	1	0	3	1,3	1,5	19	20	21	20,0	1,0
2	2	4	1	2,3	1,5	48	47	48	47,7	0,6
3	1	1	0	0,7	0,6	34	30	39	34,3	4,5
4	0	0	0	0,0	0,0	18	23	21	20,7	2,5
5	0	0	0	0,0	0,0	18	21	23	20,7	2,5
6	1	1	0	0,7	0,6	40	38	39	39,0	1,0
7	2	0	0	0,7	1,2	25	22	30	25,7	4,0
8	2	2	2	2,0	0,0	19	21	21	20,3	1,2
9	1	1	0	0,7	0,6	35	37	40	37,3	2,5
10	1	4	1	2,0	1,7	30	27	25	27,3	2,5
11	1	0	0	0,3	0,6	20	20	21	20,3	0,6
12	1	1	0	0,7	0,6	26	31	31	29,3	2,9

Zdroj: vlastní

Tabulka 10. Pozitivní jamky kontrol směsi bakterií *E. coli* Combo smíchané ve firmě MediTox s.r.o.

Číslo vzorku	<i>E. coli</i> Combo bez S9									
	NK (vehikulum)			Průměr	SD	PK (4-NQO 2 µg/ml)			Průměr	SD
1	1	2	4	2,3	1,5	34	27	29	30,0	3,6
2	3	4	3	3,3	0,6	48	48	48	48,0	0,0
3	3	1	12	5,3	5,9	41	40	36	39,0	2,6
	6*	2*	6*	4,7	2,3	35*	27*	28*	30,0	4,4
4	2	2	1	1,7	0,6	29	31	32	30,7	1,5
5	3	0	1	1,3	1,5	34	36	29	33,0	3,6
6	2	9	5	5,3	3,5	31	26	30	29,0	2,6
7	4	4	4	4,0	0,0	28	28	25	27,0	1,7
	5*	5*	38*	16,0	19,1					
8	4	1	3	2,7	1,5	30	25	28	27,7	2,5
9	2	4	10	5,3	4,2	8	7	4	6,3	2,1
	3*	6*	5*	4,7	1,5	48*	48*	48*	48,0	0,0
10	3	5	3	3,7	1,2	7	7	8	7,3	0,6
	1*	1*	1*	1,0	0,0	4*	9*	7*	6,7	2,5
11	3	2	2	2,3	0,6	11	17	7	11,7	5,0
Číslo vzorku	<i>E. coli</i> Combo s S9									
	NK (vehikulum)			Průměr	SD	PK (2-AF 400 µg/ml)			Průměr	SD
1	1	10	3	4,7	4,7	19	21	22	20,7	1,5
2	4	4	6	4,7	1,2	43	46	47	45,3	2,1
3	6	2	6	4,7	2,3	33	27	28	29,3	3,2
	5*	8*	12*	8,3	3,5	41*	40*	36*	39,0	2,6
4	1	3	0	1,3	1,5	16	17	15	16,0	1,0
5	0	5	5	3,3	2,9	21	13	18	17,3	4,0
6	17	6	8	10,3	5,9	28	36	34	32,7	4,2
7	0	5	2	2,3	2,5	36	40	33	36,3	3,5
8	1	5	3	3,0	2,0	43	38	29	36,7	7,1
9	4	2	7	4,3	2,5	29	28	26	27,7	1,5
10	1	0	1	0,7	0,6	25	20	17	20,7	4,0
11	4	3	5	4,0	1,0	24	22	18	21,3	3,1

Zdroj: vlastní

* Opakované testování z důvodu nemožného vyhodnocení dat z předchozího testu

Tabulka 11. Pozitivní jamky kontrol směsi bakterií *E. coli* Combo dodané firmou Xenometrix

Číslo vzorku	<i>E. coli</i> Combo bez S9									
	NK (vehikulum)			Průměr	SD	PK (4-NQO (2 µg/ml))			Průměr	SD
10	6	3	4	4,3	1,5	48	48	48	48,0	0,0
11	2	3	10	5,0	4,4	48	48	48	48,0	0,0
12	10	4	9	7,7	4,4	48	48	48	48,0	0,0
Číslo vzorku	<i>E. coli</i> Combo s S9									
	NK (vehikulum)			Průměr	SD	PK (2-AF (400 µg/ml))			Průměr	SD
12	5	6	5	5,3	0,6	39	41	37	39,0	2,0

Zdroj: vlastní

Dále jsem průměrné hodnoty tripletů všech kmenů rozdělila na průměry v limitu a mimo limit podle tabulky 2 a vypočítala procentuální zastoupení tripletů, které byly mimo limit.

Tabulka 12. Rozdělení průměrů tripletů bakterií *Salmonella typhimurium* TA98

TA98		Hodnota		%
		v limitu	mimo limit	mimo limit
bez S9	NK	12	0	0 %
	PK	12	0	0 %
s S9	NK	12	0	0 %
	PK	12	0	0 %

Zdroj: vlastní

Tabulka 13. Rozdělení průměrů tripletů bakterií *Salmonella typhimurium* TA100

TA100		Hodnota		%
		v limitu	mimo limit	mimo limit
bez S9	NK	10	3	23 %
	PK	13	0	0 %
s S9	NK	20	1	5 %
	PK	15	0	0 %

Zdroj: vlastní

Tabulka 14. Rozdělení průměrů tripletů bakterií *Salmonella typhimurium* TA1535

TA1535		Hodnota		%
		v limitu	mimo limit	mimo limit
bez S9	NK	12	0	0 %
	PK	12	0	0 %
s S9	NK	12	0	0 %
	PK	10	2	17 %

Zdroj: vlastní

Tabulka 15. Rozdělení průměrů tripletů bakterií *Salmonella typhimurium* TA1537

TA1537		Hodnota		%
		v limitu	mimo limit	mimo limit
bez S9	NK	12	0	0 %
	PK	12	0	0 %
s S9	NK	11	1	8 %
	PK	11	1	8 %

Zdroj: vlastní

Tabulka 16. Rozdělení průměrů tripletů bakterií *E. coli* Combo smíchané ve firmě MediTox s.r.o.

<i>E. coli</i> Combo MediTox s.r.o.		Hodnota		%
		v limitu	mimo limit	mimo limit
bez S9	NK	14	1	6,7 %
	PK	5	9	64,3 %
s S9	NK	10	2	16,7 %
	PK	3	9	75,0 %

Zdroj: vlastní

Tabulku Rozdělení průměrů tripletů směsi bakterií *E. coli* Combo dodaných firmou Xenometrix jsem nevytvářela, protože jsem neměla k dispozici žádná historická data firmy Xenometrix, tedy ani referenční data. Data získaná v této práci budou vyhodnocena v diskusi.

3.4.2 Výsledky optimalizace

3.4.2.1 Test šarží

Během testování všech 12 vzorků (9 vzorků bylo testováno v rámci předchozích studií ve firmě MediTox s.r.o. a 3 vzorky jsem testovala v rámci své práce) bylo použito několik rozdílných šarží pozitivních kontrol. Otestovala jsem proto vliv použití různých

šarží 3 šarže pozitivní kontroly 4-NQO a 2 šarže kontroly 2-AF. Počty pozitivních jamek jednotlivých šarží jsou uvedené v tabulce 17 a 18.

Tabulka 17. Testování pozitivní kontroly 4-NQO (2 µg/ml) dne 15. 9. 2019

NK	Nefunkční šarže připravená 14. 4. 2019		Nově připravená 15. 9. 2019		Šarže připravená 17. 6. 2019	
	8	32	35	29	40	41
2	33	35	31	32	32	26
10	32	35	29	28	32	24
4	34	33	24	34	40	29

Zdroj: vlastní

Tabulka 18. Testování pozitivní kontroly 2-AF (400 µg/ml) dne 15. 9. 2019

NK	Šarže připravená 14. 4. 2019		Jiná šarže připravená 17. 6. 2019	
	19	28	21	19
28	17	15	14	26
14	19	24	19	21
19	22	27	25	21

Zdroj: vlastní

3.4.3 Test vlivu předtestu na kulturu

V další části jsem testovala, zda má provedení předtestu vliv na testované kmeny, zda bude rozdíl ve výsledku čerstvé kultury a kultury uskladněné přes víkend v lednici. Připravila jsem si tři kultury *E. coli* Combo označené čísly 1, 2, 3. Náhodně jsem vybrala kulturu č. 1, jejíž část se použila v testu bez předtestu.

Tabulka 19. Testování kultury č. 1 bez předtestu

Kultura č. 1 bez předtestu <i>E. coli</i> bez MAS				Kultura č. 1 bez předtestu <i>E. coli</i> s MAS			
	D 1*	D 2*	D 3*		D 1*	D 2*	D 3*
NK	0	5	0	NK	8	6	3
	5	1	0		4	3	0
	4	3	1		11	1	3
	2	2	2		7	6	3
	3	1	1		9	6	3
	4	5	0		9	2	5
	0	0	2		1	5	1
4-NQO	28	27	26	2-AF	12	12	9

Zdroj: vlastní

* ve sloupci D1, D2 a D3 (destička 1, destička 2, destička 3) jsou uvedeny počty jamek s pozitivním výsledkem

Se zbytkem kultury č. 1 a s kulturami č. 2 a č. 3 jsem provedla předtest. Počty pozitivních jamek předtestu jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 20. Počty pozitivních jamek předtestu kultur č. 1-3

Kultura č. 1	Kultura č. 2	Kultura č. 3
0	2	11
1	1	15
0	3	7
1	2	17

Zdroj: vlastní

Pro další testování byla na základě nejmenšího počtu spontánních mutací vybrána kultura č. 1.

Tabulka 21. Výsledky testu s restartovanou kulturou č. 1

Kultura č. 1 bez MAS			Kultura č. 1 s MAS				
	D1	D 2	D 3		D 1	D 2	D 3
NK (vehikulum)	11	15	8	NK (vehikulum)	12	16	13
	7	7	10		20	13	15
	7	12	9		4	16	21
	15	12	11		13	11	16
	16	10	8		16	12	15
	11	10	9		17	17	21
	6	3	11		22	19	11
PK (4-NQO)	25	20	12	PK (2-AF)	33	37	36

Zdroj: vlastní

* ve sloupci D1, D2 a D3 (destička 1, destička 2, destička 3) jsou uvedeny počty jamek s pozitivním výsledkem

3.4.4 Vlastní testování 3 vzorků

Vzorek č 10

Kategorie vzorku	zdravotnický prostředek
Stabilita	5 – 40 °C
Barva	běžová
Forma	pevný kotouč - průměr 28 mm, tloušťka 3 mm
Užití	výplně zubů ve stomatologii
Příprava	bezprostředně před použitím extrakce 72±2 hodin při 37±1 °C extrakční činidlo DMSO

Tabulka 22. Stanovení optické denzity testovaných kmenů při testování vzorku č. 10

Stanovení OD	
Kultura	Hodnota OD
TA 98	6,16
TA1535	4,83
TA1537	6,42
NK	-0,01

Zdroj: vlastní

Kultury dosáhly hodnoty vyšší než 2, hodnota NK byla -0,01, byla nižší než 0,05. Podmínky pro zahájení testování byly splněny.

Tabulka 23. Počet pozitivních jamek kmenů TA98, TA1535 a TA1537 po 48 h kultivaci

TA98 bez S9						TA98 s S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD	Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	2	1	3	2	1	NK	1	0	1	0,67	0,58
0,13 %	1	1	0	0,67	0,6	0,13 %	1	1	2	1,33	0,58
0,25 %	0	0	1	0,33	0,6	0,25 %	2	1	2	1,67	0,58
0,50 %	0	2	0	0,67	1,2	0,50 %	2	2	2	2	0
1 %	1	1	1	1	0	1 %	0	1	1	0,67	0,58
2 %	3	2	3	2,67	0,6	2 %	0	0	2	0,67	1,15
4 %	1	1	0	0,67	0,6	4 %	2	4	1	2,33	1,53
PK (2-NF)	48	48	48	48	0	PK (2-AA)	48	48	48	48	0
TA1535 bez S9						TA1535 s S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD	Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	2	1	3	2	1	NK	0	1	1	0,67	0,58
0,13 %	2	0	1	1	1	0,13 %	2	2	0	1,33	1,15
0,25 %	4	1	1	2	1,7	0,25 %	1	2	2	1,67	0,58
0,50 %	1	2	0	1	1	0,50 %	0	1	1	0,67	0,58
1 %	1	1	3	1,67	1,2	1 %	1	0	1	0,67	0,58
2 %	4	1	2	2,33	1,5	2 %	0	0	1	0,33	0,58
4 %	1	1	1	1	0	4 %	1	1	3	1,67	1,15
PK (N ⁴ -ACT)	48	48	48	48	0	PK (2-AA)	41	36	40	39	2,65
TA1537 bez S9						TA1537 s S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD	Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	0	7	1	2,67	3,8	NK	1	4	0	1,67	2,08
0,13 %	2	2	0	1,33	1,2	0,13 %	1	3	3	2,33	1,15
0,25 %	2	3	3	2,67	0,6	0,25 %	3	1	2	2	1
0,50 %	2	7	1	3,33	3,2	0,50 %	2	1	3	2	1
1 %	4	2	2	2,67	1,2	1 %	2	0	23	8,33	12,7
2 %	1	6	1	2,67	2,9	2 %	5	1	1	2,33	2,31
4 %	2	2	4	2,67	1,2	4 %	4	6	2	4	2
PK (9-AA)	48	48	48	48	0	PK (2-AA)	30	27	25	27,33	2,52

Zdroj: vlastní

Tabulka 24. Předtest č. 1 pro TA100 a *E.coli* Combo připraveného smícháním WP2 pKM101 a WP2 uvrA ve firmě MediTox s.r.o.

Stanovení OD				Vyhodnocení předtestu				
Číslo kultury	1	2	3	Číslo kultury	1	2	3	Výběr kultury
TA100	3,4	3,6	3,4	TA100	38	44	31	3
WP2 pKM101	4,4	4	4,4	WP2 pKM101	30	1	4	2
WP2 uvrA	4,98							
NK	0,2							

Zdroj: vlastní

Z předtestu č. 1 jako nejméně spontánně mutující vyšla kultura č. 3 v případě kmenu TA100, kultura č. 2 v případě WP2 pKM101. Byla provedena rekultivace vybraných kultur uložených v lednici. Po dvou hodinách kultivace hodnota OD pro kulturu TA100 byla 3,37 a pro kulturu WP2 pKM101 2,99. Protože hodnota OD po dvou hodinách neodpovídala 75 % původní hodnoty OD, bylo rozhodnuto o prodloužení kultivace. Po 2h a 50 minutách se hodnota OD pro kmen TA100 zvýšila na 3,85 a pro kmen WP2 pKM101 na 4,06. Tyto hodnoty již dosahovaly cca 75 % původních hodnot a mohlo být pokračováno v testování. Hodnoty OD kmenu WP2 uvrA a NK byly v pořádku již při prvním měření.

Tabulka 25. Počet pozitivních jamek kmenu TA100 a *E. coli* Combo po 48 h kultivaci (hlavní test)

TA100 bez S9						TA100 s S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD	Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	41	46	45	44	2,65	NK	1	0	1	0,67	0,58
0,13 %	6	32	5	14,33	15,3	0,13 %	2	2	5	3	1,73
0,25 %	1	3	2	2	1	0,25 %	5	26	13	14,67	10,6
0,50 %	1	2	2	1,67	0,58	0,50 %	0	2	1	1	1
1 %	38	48	32	39,33	8,08	1 %	2	1	9	4	4,36
2 %	5	24	46	25	20,5	2 %	1	2	42	15	23,39
4 %	5	7	12	8	3,61	4 %	22	31	48	33,67	13,2
PK (4-NQO)	42	41	41	41,33	0,58	PK (2-AA)	47	47	48	47,33	0,58
<i>E. coli</i> Combo bez S9						<i>E. coli</i> Combo s S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD	Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	3	5	3	3,67	1,15	NK	1	0	1	0,67	0,58
0,13 %	4	0	2	2	2	0,13 %	6	1	5	4	2,65
0,25 %	0	3	6	3	3	0,25 %	2	3	2	2,33	0,58
0,50 %	1	0	0	0,33	0,58	0,50 %	1	1	2	1,33	0,58
1 %	0	1	2	1	1	1 %	3	0	3	2	1,73
2 %	0	4	1	1,67	2,08	2 %	0	1	1	0,67	0,58
4 %	4	0	1	1,67	2,08	4 %	5	1	1	2,33	2,31
PK (4-NQO)	7	7	8	7,33	0,58	PK (2-AF)	25	20	17	20,67	4,04

Zdroj: vlastní

Vzhledem k nejasným výsledkům v *E. coli* Combo (připravené smícháním WP2 pKM101 a WP2 uvrA ve firmě MediTox s.r.o.) bez S9 - pozitivní kontrola selhala a v kmeni *Salmonella typhimurium* TA100 – došlo ke kontaminaci neznámého původu, byly tyto části testu opakovány. *E. coli* Combo byla vystavena stejným šesti koncentracím extraktu vzorku č. 10 v nepřítomnosti MAS a kmen TA100 byl vystaven stejným šesti koncentracím extraktu vzorku č. 10 v přítomnosti i v nepřítomnosti MAS. Před zahájením testování vzorků byl proveden předtest pro výběr vhodné kultury (Předtest č. 2). Byla použita nová šarže 4-NQO a původní šarže kontroly 2-AA. Celý předtest i hlavní test jsem prováděla pod kontrolou vedoucí laboratoře. Pipety byly před začátkem opakování testu dezinfikovány 70% ethanolem a UV zářením.

Tabulka 26. Předtest č. 2 pro TA100 a *E.coli* Combo připraveného smícháním WP2 pKM101 a WP2 uvrA ve firmě MediTox s.r.o.

Stanovení OD				Vyhodnocení předtestu				
Číslo kultury	1	2	3	Číslo kultury	1	2	3	Výběr kultury
TA 100	7,03	5,33	4,29	TA 100	29	27	24	3
WP2 pKM101	5,17	6,64	5,26	WP2 pKM101	16	4	30	2
WP2 uvrA	5,15							
NK	-0,01							

Zdroj: vlastní

Z předtestu č. 2 jako nejméně mutující vyšla kultura č. 3 v případě kmenu TA100, v případě WP2 pKM101 kultura č. 2. Byla provedena rekultivace vybraných kultur. Po dvou hodinách kultivace byla hodnota OD pro kulturu TA100 1,89 a pro kulturu WP2 pKM101 2,39. Protože OD po dvou hodinách neodpovídalo 75 % původní hodnoty, bylo rozhodnuto o prodloužení kultivace. Po 3h a 30 minutách se hodnota OD pro kmen TA100 zvýšila na 4,52 a pro kmen WP2 pKM101 na 3,53. Tyto hodnoty již dosahovaly cca 75 % původních hodnot a mohlo být pokračováno v testování. Hodnoty OD kmenu WP2 uvrA a NK byly v pořádku již při prvním měření.

Tabulka 27. Počet pozitivních jamek TA100 a *E. coli* Combo po 48 h kultivaci (hlavní test č. 2)

TA100 bez S9						TA100 s S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD	Konc.	D1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	5	3	7	5	2	NK	1	1	0	0,67	0,58
0,13 %	0	6	9	5	4,6	0,13 %	0	0	1	0,33	0,58
0,25 %	4	12	4	6,67	4,6	0,25 %	1	1	3	1,67	1,15
0,50 %	1	5	4	3,33	2,1	0,50 %	2	4	1	2,33	1,53
1 %	8	7	3	6	2,7	1 %	0	1	3	1,33	1,53
2 %	9	5	5	6,33	2,3	2 %	7	5	24	12	10,4
4 %	9	3	4	5,33	3,2	4 %	3	1	45	16,33	24,9
(PK) 4-NQO	39	46	45	43,33	3,8	(PK) 2-AA	47	47	48	47,33	0,58
<i>E. coli</i> Combo bez S9											
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD						
NK	1	1	1	1	0						
0,13 %	2	2	2	2	0						
0,25 %	3	3	3	3	0						
0,50 %	0	1	0	0,33	0,6						
1 %	3	5	3	3,67	1,2						
2 %	6	0	6	4	3,5						
4 %	1	1	1	1	0						
(PK) 4-NQO	4	9	7	6,67	2,5						

Zdroj: vlastní

V opakovaném testu pro *E.coli* Combo, připravené smícháním WP2 pKM101 a WP2 uvrA ve firmě MediTox s.r.o. bez S9 - pozitivní kontrola opět selhala a vzhledem k nejasným výsledkům pro kmen *Salmonella typhimurium* TA100 s S9 (dva replikáty byly negativní a jeden byl pozitivní, což vypadalo jako falešně pozitivní výsledek), tyto dvě části byly znovu opakovány. Byla použita *E.Coli* Combo dodaná z Xenometrixu přímo jako už hotová směs WP2 pKM101 a WP2 uvrA. *E.coli* Combo byla vystavena stejným šesti koncentracím extraktu vzorku č. 10 v nepřítomnosti MAS a kmen TA100 byl opět vystaven stejným šesti koncentracím vzorku č. 10 extraktu v přítomnosti metabolické aktivace jako v původním testu. Před zahájením testování vzorků byl opět proveden předtest pro výběr vhodné kultury (Předtest č. 3). Byly použity stejné šarže

u obou pozitivních kontrol jako v prvním hlavním testu. Celý předtest i hlavní test jsem opět provedla pod kontrolou vedoucí laboratoře.

Tabulka 28. Předtest č. 3 pro TA100 a *E.coli* Combo (dodané z Xenometrixu přímo jako směs WP2 pKM101 a WP2 uvrA)

Stanovení optické hustoty				Vyhodnocení předtestu				
Číslo kultury	1	2	3	Číslo kultury	1	2	3	Výběr kultury
TA 100	2,79	3,23	2,32	TA 100	46	46	27	3
<i>E.coli</i> Combo	3,07	3,73	4,13	<i>E.coli</i> Combo	11	15	7	3
NK	-0,04							

Zdroj: vlastní

Z předtestu č. 3 jako nejméně spontánně mutující vyšla kultura č. 3 v případě kmenu TA100 i v případě *E. coli* Combo. Byla provedena rekultivace vybraných kultur. Po dvou hodinách kultivace hodnota OD pro kulturu TA100 byla 2,74, pro kulturu *E. coli* Combo 4,13 a pro NK -0,04, tedy dosáhly cca 75 % původní hodnoty a mohlo být pokračováno v testování.

Tabulka 29. Počet pozitivních jamek TA100 a *E. coli* Combo po 48 h kultivaci (hlavní test č. 3)

TA100 s S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	4	1	0	1,67	2,08
0,13 %	3	2	1	2	1
0,25 %	1	1	1	1	0
0,50 %	4	0	2	2	2
1 %	7	1	2	3,33	3,21
2 %	0	0	2	0,67	1,15
4 %	4	2	2	2,67	1,15
(PK) 2-AA	45	46	48	46,33	1,53
<i>E. coli</i> Combo bez S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	6	3	4	4,33	1,53
0,13 %	3	7	6	5,33	2,08
0,25 %	7	3	5	5	2
0,50 %	2	3	1	2	1
1 %	5	4	3	4	1
2 %	2	2	4	2,67	1,15
4 %	2	4	7	4,33	2,52
(PK) 4-NQO	48	48	48	48	0

Zdroj: vlastní

Na základě výsledku testu pro kmeny TA98, TA1535, TA1537, TA100 a *E. coli* Combo bylo možné vyhodnotit genotoxický a mutagenní potenciál látky pomocí programu Excel Calculation Sheet od firmy Xenometrix.

Podezřelý mutagenní potenciál byl pozorován v koncentraci 1 % extraktu testované látky u kmene *Salmonella typhimurium* TA1537 s MAS a v koncentraci 0,125 % extraktu testované položky v *Escherichia coli* Combo s MAS. Mutagenní potenciál nebyl pozorován v ostatních, tzn. ani ve vyšších koncentracích. Počet pozitivních jamek se výrazně nezvýšil v žádné z koncentrací testované položky a nebyla zjištěna závislost na dávce. Podezřelý mutagenní potenciál byl pouze náhodný, bez jakéhokoli spojení

s expozicí testované položce. Cytotoxický účinek na použité kmeny bakterií nebyl pozorován.

Vzorek č. 11

Kategorie vzorku	zdravotnický prostředek
Stabilita	5 – 40 °C
Barva	modrá
Forma	gel
Užití	Leptání zubů ve stomatologii
Hlavní složka	34-37 % kyselina fosforečná
Příprava vzorku	zásobní roztok o koncentraci 150 ug / ml testované položky v <i>Aqua pro injectione</i> , připravený rozpuštěním příslušného množství testované položky těsně před použitím

Tabulka 30. Stanovení optické denzity testovaných kmenů při testování vzorku č. 11

Stanovení OD	
Kultura	Hodnota OD
TA98	6,05
TA1535	3,49
TA1537	5,53
NK	0

Zdroj: vlastní

Kultury dosáhly hodnoty vyšší než 2, hodnota NK se rovnala 0, byla tedy nižší než 0,05. Podmínky pro zahájení testování byly splněny.

Tabulka 31. Počet pozitivních jamek kmenů TA98, TA1535 a TA1537 po 48h kultivaci

TA98 bez S9						TA98 s S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD	Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	5	4	3	4	1	NK	2	0	1	1	1
0.1875 µg/ml	5	2	4	3,67	1,5	0.1875 µg/ml	0	1	1	0,67	0,6
0.375 µg/ml	3	1	2	2	1	0.375 µg/ml	2	2	0	1,33	1,2
0.75 µg/ml	3	3	3	3	0	0.75 µg/ml	1	2	0	1	1
1.5 µg/ml	4	6	4	4,67	1,2	1.5 µg/ml	1	2	0	1	1
3 µg/ml	3	6	3	4	1,7	3 µg/ml	0	0	2	0,67	1,2
6 µg/ml	2	3	3	2,67	0,6	6 µg/ml	1	0	2	1	1
(PK) 2-NF	48	48	48	48	0	(PK) 2-AA	48	48	48	48	0
TA1535 bez S9						TA1535 s S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD	Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	2	2	2	2	0	NK	0	1	2	1	1
0.1875 µg/ml	3	1	2	2	1	0.1875 µg/ml	2	1	4	2,33	1,5
0.375 µg/ml	3	0	1	1,33	1,5	0.375 µg/ml	0	1	1	0,67	0,6
0.75 µg/ml	4	1	1	2	1,7	0.75 µg/ml	1	1	0	0,67	0,6
1.5 µg/ml	0	1	1	0,67	0,6	1.5 µg/ml	2	3	0	1,67	1,5
3 µg/ml	2	0	1	1	1	3 µg/ml	0	0	2	0,67	1,2
6 µg/ml	1	2	1	1,33	0,6	6 µg/ml	0	0	0	0	0
(PK) N ⁴ -ACT	48	48	48	48	0	(PK) 2-AA	29	28	29	28,67	0,6

Zdroj: vlastní

* ve sloupci D1, D2 a D3 (destička 1, destička 2, destička 3) jsou uvedeny počty jamek s pozitivním výsledkem

Pokračování tabulky č. 32

TA1537 bez S9						TA1537 s S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD	Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	0	0	0	0	0	NK	1	0	0	0,33	0,6
0.1875 µg/ml	0	6	1	2,33	3,2	0.1875 µg/ml	0	0	0	0	0
0.375 µg/ml	0	1	0	0,33	0,6	0.375 µg/ml	0	0	0	0	0
0.75 µg/ml	3	0	1	1,33	1,5	0.75 µg/ml	0	1	0	0,33	0,6
1.5 µg/ml	3	0	1	1,33	1,5	1.5 µg/ml	1	0	0	0,33	0,6
3 µg/ml	1	1	0	0,67	0,6	3 µg/ml	1	0	0	0,33	0,6
6 µg/ml	1	2	0	1	1	6 µg/ml	0	0	0	0	0
(PK) 9-AA	48	48	48	48	0	(PK) 2-AA	20	20	21	20,33	0,6

Zdroj: vlastní

* ve sloupci D1, D2 a D3 (destička 1, destička 2, destička 3) jsou uvedeny počty jamek s pozitivním výsledkem

Tabulka 32. Předtest č. 1 pro TA100 a *E.coli* Combo připraveným smícháním WP2 pKM101 a WP2 uvrA ve firmě MediTox s.r.o.

Stanovení OD			
Číslo kultury	1	2	3
TA 100	3,98	5,06	3,35
WP2 pKM101	4,73	4,3	4,6
WP2 uvrA	4,24		
NK	0		

Vyhodnocení předtestu				
Číslo kultury	1	2	3	Výběr kultury
TA 100	46	48	42	3
WP2 pKM101	35	41	29	3

Zdroj: vlastní

Z předtestu č. 1 jako nejméně spontánně mutující vyšla kultura č. 3 v případě kmenu TA100 i v případě WP2 pKM101. Byla provedena rekultivace vybraných kultur. Po 2 hodinách a 10 minutách kultivace byla hodnota OD pro kulturu TA100 3,03 a pro kulturu WP2 pKM101 2,58. Protože OD neodpovídala 75 % původní hodnoty, bylo rozhodnuto o prodloužení kultivace. Po 2 hodinách a 50 minutách se hodnota OD pro kmen TA100 zvýšila na 3,98 a pro kmen WP2 pKM101 na 3,38. Tyto hodnoty již

dosahovaly cca 75 % původních hodnot a mohlo být pokračováno v testování. Hodnoty OD kmenu WP2 uvrA a NK byly v pořádku již při prvním měření.

Tabulka 33. Počet pozitivních jamek pro TA100 a *E. coli* Combo (hlavní test)

TA100 bez S9						TA100 s S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD	Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	10	12	14	12	2	NK	2	1	3	2	1
0.1875 µg/ml	19	12	18	16,33	3,79	0.1875 µg/ml	1	1	1	1	0
0.375 µg/ml	19	19	16	18	1,73	0.375 µg/ml	0	1	1	0,67	0,58
0.75 µg/ml	20	15	14	16,33	3,21	0.75 µg/ml	2	2	2	2	0
1.5 µg/ml	20	15	20	18,33	2,89	1.5 µg/ml	2	0	1	1	1
3 µg/ml	13	18	18	16,33	2,89	3 µg/ml	1	3	3	2,33	1,15
6 µg/ml	12	15	18	15	3	6 µg/ml	5	3	2	3,33	1,53
(PK) 4-NQO	45	42	47	44,67	2,52	(PK) 2-AA	46	47	47	46,67	0,58
<i>E.coli</i> Combo bez S9						<i>E.coli</i> Combo s S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD	Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	3	2	2	2,33	0,58	NK	4	3	5	4	1
0.1875 µg/ml	3	6	6	5	1,73	0.1875 µg/ml	10	4	3	5,67	3,79
0.375 µg/ml	8	3	5	5,33	2,52	0.375 µg/ml	4	4	5	4,33	0,58
0.75 µg/ml	1	5	8	4,67	3,51	0.75 µg/ml	11	7	3	7	4
1.5 µg/ml	4	8	3	5	2,65	1.5 µg/ml	5	2	6	4,33	2,08
3 µg/ml	7	8	2	5,67	3,21	3 µg/ml	3	8	2	4,33	3,21
6 µg/ml	4	6	2	4	2	6 µg/ml	8	3	6	5,67	2,52
(PK) 4-NQO	11	14	7	10,67	3,51	(PK) 2-AF	24	22	18	21,33	3,06

Zdroj: vlastní

Vzhledem k nejasným výsledkům pro *Escherichia coli* Combo, připravenou smícháním WP2 pKM101 a WP2 uvrA ve firmě MediTox s.r.o., bez MAS - pozitivní kontrola selhala, byla tato část testu opakována. Byla použita směs *E.Coli* Combo (dodaná z Xenometrixu přímo jako směs WP2 pKM101 a WP2 uvrA). Směs *E.coli* Combo byla vystavena stejným šesti koncentracím leptacího gelu v nepřítomnosti systému

metabolické aktivace jako v původním testu. Před zahájením testování vzorků byl proveden předtest pro výběr vhodné kultury (Předtest č. 2). Byla použita stejná šarže pozitivní kontroly jako v prvním hlavním testu. Celé testování jsem opět provedla pod kontrolou vedoucí laboratoře.

Tabulka 34. Předtest č. 2 pro *E.coli* Combo (dodané z Xenometrixu přímo jako směs WP2 pKM101 a WP2 uvrA)

Stanovení OD				Vyhodnocení předtestu				
Číslo kultury	1	2	3	Číslo kultury	1	2	3	Výběr kultury
<i>E. coli</i> Combo	3,07	3,73	4,13	<i>E. coli</i> Combo	11	15	7	3
NK	-0,04							

Zdroj: vlastní

Z předtestu č. 2 vyšla jako nejméně mutující kultura č. 3. Provedla jsem rekultivaci vybrané kultury. Po kultivaci 2 hodiny a 10 minut byla hodnota OD 2,31, proto bylo rozhodnuto o prodloužení kultivace. Po 3 hodinách a 19 minutách byla hodnota OD 4,48. Nárůst kultury byl dostatečný a bylo přistoupeno k vlastnímu testování.

Tabulka 35. Počet pozitivních jamek *E. coli* Combo po 48 h kultivaci (hlavní test č. 2)

<i>E.coli</i> Combo bez S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	2	3	10	5	4,36
0.1875 µg/ml	11	1	3	5	5,29
0.375 µg/ml	4	3	4	3,67	0,58
0.75 µg/ml	8	2	3	4,33	3,21
1.5 µg/ml	3	5	3	3,67	1,15
3 µg/ml	4	1	3	2,67	1,53
6 µg/ml	8	1	5	4,67	3,51
(PK) 4-NQO	48	48	48	48	0

Zdroj: vlastní

Na základě výsledku testu pro kmeny TA98, TA1535, TA1537, TA100 a *E. coli* Combo bylo možné vyhodnotit genotoxický a mutagenní potenciál látky pomocí programu Excel Calculation Sheet od firmy Xenometrix.

Podezřelý mutagenní potenciál byl pozorován v koncentraci 0,1875 ug / ml testované položky v kmeni *Salmonella typhimurium* TA1537 bez S9, což je nejnižší použitá koncentrace. Mutagenní potenciál nebyl pozorován v žádné další koncentraci. Podezřelý mutagenní potenciál byl pouze náhodný, bez jakéhokoli spojení s expozicí testované položky. Cytotoxický účinek na použité kmeny bakterií nebyl pozorován.

Vzorek č. 12

Kategorie vzorku	zdravotnický prostředek
Stabilita	5 – 40 °C
Barva	Béžová
Forma	pevný kotouč - průměr 28 mm, tloušťka 3 mm
Užití	výplně zubů ve stomatologii
Příprava vzorku	bezprostředně před použitím extrakce 72±2 hodin při 37±1 °C extrakční činidlo DMSO

Tabulka 36. Stanovení optické denzity testovaných kmenů při testování vzorku č. 12

Stanovení OD	
Kultura	Hodnota OD
TA 98	5,51
TA1535	5,66
TA1537	6,23
NK	-0,05

Zdroj: vlastní

Kultury dosáhly hodnoty vyšší než 2, hodnota NK se rovnala -0,05, byla nižší než 0,05. Podmínky pro zahájení testování byly splněny.

Tabulka 37. Počet pozitivních jamek kmenů TA98, TA1535 a TA1537 po 48 h kultivaci

TA98 bez S9						TA98 s S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD	Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	2	1	0	1	1	NK	1	1	0	0,67	0,6
0,13 %	0	1	3	1,33	1,5	0,13 %	0	1	2	1	1
0,25 %	3	1	1	1,67	1,2	0,25 %	1	1	0	0,67	0,6
0,50 %	1	1	1	1	0	0,50 %	1	3	0	1,33	1,5
1 %	2	0	0	0,67	1,2	1 %	0	0	1	0,33	0,6
2 %	2	2	5	3	1,7	2 %	3	1	2	2	1
4 %	9	3	4	5,33	3,2	4 %	0	5	1	2	2,7
(PK) 2-NF	48	48	48	48	0	(PK) 2-AA	48	48	48	48	0
TA1535 bez S9						TA1535 s S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD	Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	2	1	0	1	1	NK	2	0	0	0,67	1,2
0,13 %	0	2	1	1	1	0,13 %	1	0	1	0,67	0,6
0,25 %	1	0	1	0,67	0,6	0,25 %	0	4	2	2	2
0,50 %	0	1	0	0,33	0,6	0,50 %	1	2	0	1	1
1 %	2	0	2	1,33	1,2	1 %	2	0	1	1	1
2 %	0	0	2	0,67	1,2	2 %	1	1	1	1	0
4 %	1	0	0	0,33	0,6	4 %	2	0	0	0,67	1,2
(PK) N ⁴ -ACT	48	48	48	48	0	(PK) 2-AA	38	43	39	40	2,7
TA1537 bez S9						TA1537 s S9					
Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD	Konc.	D 1	D 2	D 3	Průměr D1-D3	SD
NK	0	0	0	0	0	NK	1	1	0	0,67	0,6
0,13 %	1	0	0	0,33	0,6	0,13 %	1	0	0	0,33	0,6
0,25 %	1	1	0	0,67	0,6	0,25 %	0	1	1	0,67	0,6
0,50 %	3	1	1	1,67	1,2	0,50 %	0	1	0	0,33	0,6
1 %	0	3	0	1	1,7	1 %	0	1	0	0,33	0,6
2 %	2	2	0	1,33	1,2	2 %	3	0	0	1	1,7
4 %	0	0	1	0,33	0,6	4 %	1	0	1	0,67	0,6
(PK) 9-AA	48	48	48	48	0	(PK) 2-AA	26	31	31	29,33	2,9

Zdroj: vlastní

Pro testování vzorku č. 12. byla s ohledem na předchozí výsledky testů použita rovnou směs *E.coli* Combo dodaná z Xenometrixu přímo jako směs WP2 pKM101 a WP2 uvrA.

Tabulka 38. Předtest kmenu TA100 a směsi *E.coli* Combo

Stanovení OD				Vyhodnocení předtestu				
Číslo kultury	1	2	3	Číslo kultury	1	2	3	Výběr kultury
TA 100	4,03	4,37	5,12	TA100	31	48	40	1
<i>E. coli</i> Combo	3,63	3,35	3,42	<i>E. coli</i> Combo	16	7	12	2
NK	-0,01							

Zdroj: vlastní

Z předtestu jako nejméně spontánně mutující vyšla kultura č. 1 v případě kmenu TA100 a kultura č. 2 v případě *E.coli* Combo. Byla provedena rekultivace vybraných kultur. Po 2 hodinách kultivace hodnota OD pro kulturu TA100 byla 2,33 a pro kulturu *E. coli* Combo byla 1,22. Protože hodnota OD neodpovídala 75 % původní hodnoty, bylo rozhodnuto o prodloužení kultivace. Po 4 hodinách a 20 minutách se hodnota OD pro kmen TA100 zvýšila na 4,58 a pro kmen *E. coli* Combo na 2,62. Tyto hodnoty již dosahovaly cca 75 % původních hodnot a mohlo být pokračováno v testování. Hodnota OD NK byla v pořádku již při prvním měření.

Tabulka 39. Počet pozitivních jamek kmenů TA100 a *E.coli* Combo

TA100 bez S9						TA100 s S9					
Konc.	D1	D 2	D 3	Průměr D1 - D3	SD	Konc.	D1	D 2	D 3	Průměr D1 - D3	SD
NK	8	6	7	7	1	NK	2	5	1	2,67	2,1
0,13 %	8	3	7	6	2,7	0,13 %	1	1	1	1	0
0,25 %	5	6	8	6,33	1,5	0,25 %	2	1	0	1	1
0,50 %	4	7	6	5,67	1,5	0,50 %	7	0	1	2,67	3,8
1 %	5	7	7	6,33	1,2	1 %	1	1	2	1,33	0,6
2 %	4	7	4	5	1,7	2 %	1	2	1	1,33	0,6
4 %	3	4	6	4,33	1,5	4 %	7	1	4	4	3
(PK) 4-NQO	44	47	46	45,67	1,5	(PK) 2-AA	44	44	43	43,67	0,6
<i>E. coli</i> Combo bez S9						<i>E. coli</i> Combo s S9					
Konc.	D1	D 2	D 3	Průměr D1 - D3	SD	Konc.	D1	D 2	D 3	Průměr D1 - D3	SD
NK	10	4	9	7,67	3,2	NK	5	6	5	5,33	0,6
0,13 %	5	5	5	5	0	0,13 %	10	17	4	10,33	6,5
0,25 %	5	4	6	5	1	0,25 %	9	11	7	9	2
0,50 %	4	6	5	5	1	0,50 %	10	7	6	7,67	2,1
1 %	6	15	6	9	5,2	1 %	16	6	2	8	7,2
2 %	3	4	9	5,33	3,2	2 %	12	9	9	10	1,7
4 %	9	2	4	5	3,6	4 %	12	11	12	11,67	0,6
(PK) 4-NQO	48	48	48	48	0	(PK) 2-AF	39	41	37	39	2

Zdroj: vlastní

Na základě výsledku testu pro kmeny TA98, TA1535, TA1537, TA100 a *E. coli* Combo bylo možné vyhodnotit genotoxický a mutagenní potenciál látky pomocí programu Excel Calculation Sheet od firmy Xenometrix.

Podezřelý mutagenní potenciál byl pozorován v koncentraci 4% extraktu testované položky v kmeni *Salmonella typhimurium* TA 98 bez MAS. Mutagenní potenciál nebyl pozorován ani u kmene *Salmonella typhimurium* TA 98 s MAS, ani u ostatních testovaných bakteriálních kmenů. Mutagenní potenciál byl pravděpodobně způsoben vyšším počtem spontánních mutací pouze na jedné destičce z tripletu, což je také patrné z vyšší standardní odchylky (3,21). Mutagenní potenciál nebyl pozorován v žádné další koncentraci. Podezřelý mutagenní potenciál byl pouze náhodný, bez jakéhokoli spojení s testovanou položkou. Cytotoxický účinek na použité kmeny bakterií nebyl pozorován.

Tabulka 40. Historická data firmy MediTox s.r.o.

Bakterie	TA98	TA100	TA1535	TA1537	<i>E. coli</i> Combo smíchaná v MediTox s.r.o.	<i>E. coli</i> Combo dodaná Xenometrixem
Počet pozitivních jamek bez S9						
Negativní kontrola	0-6	2-12	0-4	0-7	0-8	2-10
2-NF (2.0 µg/ml)	38-48					
4-NQO (0.1 µg/ml)		43-48				
N4-ACT (100 µg/ml)			48			
9-AAc (15 µg/ml)				48		
4-NQO (2 µg/ml)					27-48	48
Počet pozitivních jamek s S9						
Negativní kontrola	0-4	0-9	0-4	0-4	0-11	5-6
2-AA (1.25µg/ml)						
2-AA (1-2 µg/ml)	48					
2-AA (2.5µg/ml)						
2-AA (5µg/ml)		43-48	16-47	18-48		
2-AF (400 µg/ml)					16-48	37-41

Zdroj: vlastní

4 Diskuse

Z tabulek veškerých dat získaných ze studií provedených ve firmě MediTox s.r.o. v období let 2017 - 2019 vyplývá, že kmen *Salmonella typhimurium* TA98, společně s jeho kontrolami, poskytuje hodnoty korespondující s hodnotami získanými firmou Xenometrix.

V případě kmenů *Salmonella typhimurium* TA1535 a TA1537 došlo k minimálnímu mimolimitnímu výskytu pozitivních jamek. V případě kmene TA1535 se jednalo o vyšší počet pozitivních jamek u negativní kontroly a v případě kmene TA1537 v jednom případě byl mírně vyšší počet spontánních mutací v negativní kontrole a ve druhém případě vyšší počet pozitivních jamek u pozitivní kontroly. Odchytky se vyskytly v měření různých vzorků, tedy se jedná pouze o náhodné odchytky, které není nutné brát v úvahu.

Kmen *Salmonella typhimurium* TA100 vykazuje nadlimitní hodnoty pozitivních jamek při testování v provedení bez i s MAS. Tyto hodnoty jsou s největší pravděpodobností způsobeny zvýšeným sklonem kmene TA100 ke spontánním mutacím. Ve výsledcích předtestů pro kmen TA100 je jasně vidět, že kmen velmi snadno spontánně mutuje. Je tedy nutné tuto vlastnost brát v patrnost i při vyhodnocování testů.

Předtest pro vyloučení spontánních mutací se provádí také u bakteriální směsi *E. coli* Combo. I zde je z tabulky 16 vidět vysoký počet mimolimitních pozitivních jamek u negativních kontrol, jak v provedení s MAS, tak i bez MAS. To je způsobeno kmenem WP2 pKM101, který je součástí směsi a je rovněž velmi náchylný ke spontánním mutacím, což je vidět v tabulkách 24, 26 a 32, v nichž jsou výsledky předtestů. I v případě směsi *E. coli* Combo je nutné k této vlastnosti přihlídnout při vyhodnocení. Znepokojující jsou však velmi vysoké počty mimolimitních pozitivních jamek u pozitivních kontrol. V případě kontroly 4-NQO je to 64,3 % a v případě kontroly 2-AF dokonce 75 %. V souladu s doporučeními, která jsou uvedena v kapitole 2.6 Hodnocení Ames MPF testu, pozitivní kontrola 2-AF ve většině měření splnila podmínky pro možnost vyhodnocení testu, v případech, kdy podmínky splněny nebyly, byl proveden opakovaný test, ve kterém již podmínky splněny byly, a bylo možné vyhodnotit potenciál testovaného vzorku. Z tabulky 10 vyplývá, že hodnoty pozitivních jamek u kontroly 2-AF jsou sice nižší, ale poskytují výsledky konstantní, tudíž na jejich základě bylo možné testy vyhodnotit. Pozitivní kontrola 4-NQO ve většině

mimolimitních případů neodpovídala doporučením uvedeným v kapitole 2.6. Výsledky pozitivních jamek pro PK byly často srovnatelné, i nižší než výsledky NK, proto bylo nutné tuto část testu optimalizovat.

Výsledky kmenů TA98, TA1535 a 1537 byly ve 100 % případů možné použít pro hodnocení potenciální genotoxické a mutagenní schopnosti testovaných látek. Nebylo tedy třeba optimalizovat práci s těmito kmeny.

U kmene TA100 je vzhledem k jeho sklonu ke spontánním mutacím často nutné provést opakovaný test, pokud ale k rozsáhlému spontánnímu zmutování nedojde, jsou výsledky bez větších problémů použitelné pro vyhodnocení mutagenního a genotoxického potenciálu testovaných látek. Ani v tomto případě jsem proto k optimalizaci nepřistoupila. Sama jsem během testování musela několikrát opakovaný test provést. V jednom případě v provedení bez MAS a ve dvou případech v provedení s MAS – v prvním případě došlo pravděpodobně ke kontaminaci nejasného původu, ve druhém případě s největší pravděpodobností způsobily nejasný falešně pozitivní výsledek právě spontánní mutace.

Všechny kultury používané v Amesově testu jsou náchylné na kontaminaci. Tento kritický bod práce s bakteriemi je ve firmě MediTox s.r.o. ošetřen dle mého názoru dostatečně, a to neustálou výměnou sterilních špiček pipet, dezinfekcí pipet 70% ethanolem a sterilizací UV zářením.

Naše výsledky jsem konzultovala s dodavatelem testu, s firmou Xenometrix. Společně jsme vymezili kritické body, které bylo potřeba prověřit.

Prvním bodem bylo otestovat účinnost pozitivních kontrol, navrhla jsem úpravu koncentrace použitých kontrol, což mi bylo firmou Xenometrix silně nedoporučeno.

Rozhodla jsem se proto zjistit, zda a jak velký vliv mají rozdílné šarže pozitivních kontrol. Testovala jsem 3 šarže kontroly 4-NQO a 2 šarže 2-AF. Z tabulek 18 a 19 je vidět, že u obou kontrol je vysoký počet pozitivních jamek u negativních kontrol. To mohlo být dáno ochotou kmene WP2 pKM101 ze směsi *E. coli* Combo ke spontánním mutacím. Počty pozitivních jamek u kontroly 4-NQO u všech tří testovaných šarží poskytly konstantní výsledky, z nichž většina se pohybovala v limitech firmy Xenometrix. V případě kontroly 2-AF byly výsledky nižší, stejně jako se ukazovaly

v celém průběhu testování ve firmě MediTox s.r.o., avšak konstantní s minimálními náhodnými odchylkami, tudíž v souladu s doporučením v kapitole 2.6.

V dalším kroku jsem se rozhodla vyzkoušet vliv předtestu a uskladnění připravených kultur v lednici. Připravila jsem 3 zkumavky s *E.coli*. Náhodně jsem vybrala kulturu č. 1 a tu jsem otestovala bez předtestu. Tabulka 20 ukazuje výsledky tohoto pokusu bez předtestu. Se zbytkem kultury č. v1, č. v2 a č. v3 byl proveden předtest, jehož výsledky jsou v tabulce 21. Nejméně spontánně mutující kultura byla kultura č. 1. Výsledky testu po předchozím předtestu jsou v tabulce 22. V obou provedeních je vidět relativně vysoký počet spontánních mutací a minimální rozdíl ve výsledcích pozitivních kontrol.

Firma Xenometrix nabízí ještě druhý typ kitů Ames MPF™ Penta II, který neobsahuje 2 kmeny *E.coli*, které je nutné smíchat, ale již připravenou směs WP2 pKM101 a WP2 uvrA - *E. coli* Combo, jež je méně náchylná ke spontánním mutacím a má lepší výsledky. Bohužel pro tuto novou variantu neexistuje ještě dostatečné množství provedených testů a tím pádem chybí i dostatek historických dat. Rozhodla jsem se vyzkoušet ještě tuto možnost, a to na vzorcích č. 10 a č. 11, které jsem již testovala se směsí *E. coli* Combo smíchanou ve firmě MediTox s.r.o. Výsledkem testování bylo, že směs *E. coli* Combo dodaná firmou Xenometrix opravdu poskytuje lepší výsledky, na jejichž základě bylo možné vyhodnotit genotoxický a mutagenní potenciál vzorků bez jakýchkoliv problémů.

Získané informace jsem ještě ověřila v testování vzorku č. 12, který jsem testovala už jen na směsi *E. coli* Combo dodané z Xenometrixu. Veškeré výsledky *E. coli* Combo dodané firmou Xenometrix jsou v tabulce č. 11. Hodnoty negativních a pozitivních kontrol splňují kritéria uvedená v kapitole 2.6 a já jsem byla schopná bez komplikací vyhodnotit genotoxický a mutagenní potenciál vzorku.

Všechny výsledky pozitivních a negativních kontrol v provedení s MAS i bez MAS jsou konstantní a mají vypovídající hodnotu. Shrnula jsem je do tabulky č. 41 - Historická data firmy Meditox s.r.o., jež jsem vytvořila podle doporučení z návodu pro testování MPF firmy Xenometrix.

5 Závěr

Shromáždila jsem veškeré výsledky negativních a pozitivních kontrol Amesova MPF testu z firmy MediTox s.r.o. Na základě těchto dat jsem určila, že není potřeba optimalizovat práci s kmeny TA98, TA100, TA1535 a 1537. Dále vyplynula nutnost optimalizace práce se směsí bakteriálních kmenů *E. coli* Combo. Po konzultacích s firmou Xenometrix a po provedeném testování jsem zjistila, že ideálním řešením je používání směsi *E. coli* Combo dodané již jako směs WP2 pKM101 a WP2 uvrA přímo firmou Xenometrix.

Hypotéza, že genotoxická či mutagenní testovaná látka vyvolá zpětnou mutaci revertantních kmenů bakterií, byla potvrzena na základě výsledků všech provedených hlavních, případně opakovaných hlavních testů.

Hypotéza o koncentraci pozitivních kontrol nastavená firmou Xenometrix byla též potvrzena po provedení testů několika šarží negativních a pozitivních kontrol s odpovídajícími výsledky.

Hypotéza o tom, že vypovídající hodnoty závisí na bezchybnosti provedení v laboratoři, potvrzena nebyla. Z výsledků vyplývá, že ani po precizním provedení, při dodržení všech postupů, nemusíme získat výsledky, na jejichž základě jsme schopni vyhodnotit mutagenní a genotoxický potenciál. Největší vliv na neúspěšné provedení bude nadále mít spontánní mutace bakterií kmenu TA100 a *E.coli* WP2 pKM101. Největší problém – selhávání pozitivní kontroly 4-NQO při testování na *E.coli* Combo je možné řešit používáním kitu pro Ames MPF™ Penta II, ve kterém je dodávána směs *E.coli* Combo, jež je obecně odolnější.

Pro firmu MediTox z výsledků vyplývá doporučení používat v Amesově MPF testu směs *E. coli* Combo dodanou přímo firmou Xenometrix a v souladu s doporučeními firmy Xenometrix používat k hodnocení testů tabulku historických dat firmy MediTox s.r.o. vypracovanou v této práci.

Seznam použité literatury

1. AARDEMA, M., ELHAJOUJI, A., KIRSCH-VOLDERS, M., 2000. Concepts of threshold in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res.* 464(1) 3-11 doi: 10.1016/s1383-5718(99)00161-8
2. AMES, B. N., DURSTON W. D., LEE, F. D., 1973. *An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens.* *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70 (3): 782-786, doi: 10.1073/pnas.70.3.782
3. AMES, B. N., CHOI, E., MC CANN, J., YAMASAKI, E., 1975. *Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals.* *Proc Natl Acad Sci USA.* 72(12): 5135–5139, doi: 10.1073/pnas.72.12.5135
4. AMES, B. N., MARON, D. M., 1983. *Revised methods for the Salmonella mutagenicity test.* *Mut. Res.* 113(3-4), 173-215, doi: 10.1016/0165-1161(83)90010-9
5. AMES, B. N., MARTIN R. G., WHITFIELD, H. J., 1966. *Classification of Aminotransferase (C Gene) Mutants in the Histidine Operon.* *Journal of Molecular Biology* 21 (2) 335-355 doi: 10.1016/0022-2836(66)90103-3
6. AMES, B. N., Mc CANN, J., 1976. *Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion.* *Proc Natl Acad Sci USA.* 73 (3) 950-954 doi: /10.1073/pnas.73.3.950
7. AMES, B., N., 1973. Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70 (8) 2281-2285 doi: 10.1073/pnas.70.8.2281
8. AMES, B., N., MARON, D., KATZENELLENBOGEN, J., 1981. Compatibility of organic solvents with the Salmonella/microsome test. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 88(4), 343-350, doi: 10.1016/0165-1218(81)90025-2
9. ANTOINE, j., L., ARANY, J., DECAT, G., HENROTTE, J., JENARDUBUISSON, G., LÉONARD, A., 1983. Lack of mutagenic activity of dimethylformamide. *Toxicology* 26 (3-4), 207-212 doi: 10.1016/0300-483x(83)90082-3

10. AOKI T., HAKURA, A., HORI, Y., SAWADA S., SUGANUMA, A., SUGIHARA, T., TSUKIDATE, K., UCHIDA, K., 2010. Cytotoxic Effect of Dimethyl Sulfoxide in the Ames Test. *Genes and Environment*, 32 (1), 1-6 doi: 10.3123/jemsge.32.1
11. ASAKURA, S., HAKURA, A., KAWADE A., KOYAMA, N., SHIBATA, T., TORITSUKA, N., YAMAGATA, T., 2020. Evaluation of acetone as a solvent for the Ames test. *Genes and Environment* 42 (3) doi: 10.1186/s41021-020-0143-6
12. BAUMEISTER, M., BRAUN, K., ENGELHARDT, G., FLÜCKIGER-ISLER, S., GERVAIS, V., HASLER-NGUYEN, N., REIMANN, R., VAN GOMPEL, J., WUNDERLICH, H. G., 2004. *Assessment of the performance of the Ames II assay: a collaborative study with 19 coded compounds*. *Mutat Res.* 558(1-2): 181-197, doi: 10.1016/j.mrgentox.2003.12.001
13. BEERENDONK, E., F., HARMSSEN, D.,J.,H., HERINGA M.B., IPELAAR, G., F., KRUL, C., A., M., METZ, D., H., 2011. *Formation and removal of genotoxic activity during UV/H₂O₂-GAC treatment of drinking water*. *Water Res.* 45(1) 366-374, doi: 10.1016/j.watres.2010.08.008
14. BIGGER A., BRAMBILLA, G., GLATT, H., GOCKE, E., GUZZIE P., J., HAKURA, A., HONMA, M., KU, W., W., MARTUS, H.-J., OBACH., R., S., ROBERTS, S., 2007. Strategy for genotoxicity testing—Metabolic considerations. *Mutat. Res.* 627, 59-77
15. BIGGER, C., A., DIPLLE, A., Lake, R., S., TOMASZEWSKI, J., E., 1980. Limitations of metabolic activation systems used with in vitro tests for carcinogens. *Science* 209 (4455) 503-505 doi: 10.1126/science.6771871
16. BOROŇ J., KAČER P., 2016. *Určeni genotoxicity extraktů oxidované celulosy metodikou pro vysokokapacitní screening*. *Chem. Listy.* 110(11), 828-831. ISSN 1213-7103 (on-line), 0009-2770 (tištěné)
17. BORZELLECA, J., F., 2000. *Paracelsus: Herald of Modern Toxicology*. *Toxicol. Sci.* 53 (1) 2-4 doi: 10.1093/toxsci/53.1.2
18. BRUSICK, D. J., RAY, V. A, ROSENKRANZ, H. S., SIMMON V. F., STAFFORD, R. S., 1980. *An evaluation of the Escherichia coli WP2 and WP2uvrA reverse mutation assay*. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 76(2): 169-190, doi: 10.1016/0165-1110(80)90009-3

19. BURCH, R., L., RUSSEL W., M., S., 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*, Methuen, London. ISBN 0900767782
20. CANTELLI-FROTI, G., PAOLILI, M., 1997. On the metabolizing systems for short-term genotoxicity assays: a review. *Mutat. Res.* 387 (1) 17-34 doi: 10.1016/s1383-5742(97)00020-3
21. ELESPURU, R., K., ESCOBAR P., A., HAKURA, A., KATO, M., LEVY, D., D., M., LOTT, J., MOORE M., M., SUGIYAMA K., 2019. *Demonstrating laboratory proficiency in bacterial mutagenicity assays for regulatory submission.* *Mutat Res Gen Tox En*; 848: 1-10, doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.07.005
22. ENGELHARDT, G., FLUCKIGER-ISLER, S., JAECKH, R., KAMBER, M., ZEIGER, E., (2009). *Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity.* *Mutagenesis*, 24(4), 359-366, doi: /10.1093/mutage/gep017
23. EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2016. *Guideline on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in veterinary medicinal products.*
24. EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2017. *ICH M7(R1) Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk.* ICH Quality Guidelines, 667- 699, doi: 10.1002/9781118971147.ch24
25. FLÜCKIGER-ISLER, S., KAMBER, M., 2012. *Direct comparison of the Ames microplate format (MPF) test in liquid medium with the standard Ames pre-incubation assay on agar plates by use of equivocal to weakly positive test compounds.* *Mutat Res*; 747(1):36-45, doi: 10.1016/j.mrgentox.2012.03.014
26. GEE, P., GIDROL, X., M., MARGOLIN B., H., PIEGORSCH W., W., SIMMONS, S., J., ZEIGER, E., 2000. *Statistical modeling and analyses of a base-specific Salmonella mutagenicity assay.* *Mutation Res.* 467(1)11–9, doi: 10.1016/S1383-5718(00)00019-X
27. HAKURA, A., (2013) *Improved AMES Test for Genotoxicity Assessment of Drugs: Preincubation Assay Using a Low Concentration of Dimethyl Sulfoxide.* *Optimization in Drug Discovery*, 543-559, doi: 10.1007/978-1-62703-742-6_33

28. ICH S2 Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use (2011)
29. KNEJZLÍK, Z., RUML, T., 1999. *Nepříznivý vliv xenobiotik na lidský organismus a metody jeho testování*. Chem. listy 93,607-615
30. KOHOUTOVÁ M. Mutace jako zdroj genetických variací In: KOHOUTOVÁ M., at al, 2012. *Lékařská biologie a genetika II.díl. 1. vydání*. Praha: Karolinum, s. 48. ISBN 978-80-246-1873-9
31. LOVVEL, D., P., D., 2000. *Dose-response and threshold-mediated mechanisms in mutagenesis: statistical models and study design*. Mutat. Res., 464 (1) 87-95 doi: 10.1016/s1383-5718(99)00169-2
32. LU, F., C., 1988. Acceptable Daily Intake: Inception, Evolution, and Application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 8 (1) 45-60. doi: 10.1016/0273-2300(88)90006-2
33. MOHAMED, S., RAJENDA, S., RAMAN, D., SABITA, U., 2017. *Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods*. Glob J Pharmaceu Sci. 2017; 1(5) : 555575. DOI: 10.19080/GJPPS.2017.02.555575
34. MORTELMANS, K., 2006. *Isolation of plasmid pKM101 in the Stocker laboratory*. Mutat. Res. 612 (3): 151-164, doi: 10.1016/j.mrrev.2006.03.002
35. MORTELMANS, K., RICCIO, E. S., 2000. *The bacterial tryptophan reverse mutation assay with Escherichia coli WP2* Mutat. Res. 455 (1-2): 61-69, doi: 10.1016/s0027-5107(00)00076-2
36. MORTELMANS, K., ZIEGER, E., 2000. *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay*. Mutat. Res. 455(1-2):29-60, doi: 10.1016/s0027-5107(00)00064-6
37. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/745 OECD (1997), *Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, doi: 10.1787/9789264071247-en.
38. OECD (1997), *Test No. 476: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, doi: 10.1787/9789264071247-en. doi: 10.1787/9789264071322-en
39. OECD (2014), *Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*, OECD Publishing, Paris, doi: 10.1787/9789264224292-en.

40. OECD (2014), *Test No. TG 487: In vitro mammalian cell micronucleus test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, doi: 10.1787/9789264264861-en.
41. OECD (2016), *Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, doi: 10.1787/9789264071261-en.
42. OECD (2016), *Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, doi: 10.1787/20745788.
43. RAŠKOVÁ K., 2017. *Využití mikroorganismů k testování genotoxicity*. Ostrava. Bakalářská práce. VŠB-TUO HGF
44. STEVENSON, K. et al., 2016. *General calibration of microbial growth in microplate readers*. Sci. Rep. 6, 38828, doi: 10.1038/srep38828
45. XENOMETRICS (2019), *Ames MPF™ Penta 1 Microplate Format Mutagenicity Assay, Instruction for use*, Version 2.01

Seznam e-zdrojů

1. OECD (1997), Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>.
2. OECD (1997), Test No. 475: Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071308-en>.
3. OECD (2011), Test No. 488: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264122819-en>.
4. OECD (2016), Test No. 490: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264908-en>.
5. Web1: CHEMSAFETYPRO, 2016. *Mutagenicity and Genotoxicity* [online] . Dostupné z: https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Mutagenicity_and_Genotoxicity.html, [cit. 2019-08-25]
6. Web2: ICH,2019. *Mission* [online]. Dostupné z <https://www.ich.org/page/mission>, [cit. 2019-11-18]
7. Web3: EMA 1995-2019. *What we do* [online]. Dostupné z <https://www.ema.europa.eu/en/about-us/what-we-do>, [cit. 2019-11-19]

Seznam příloh

Tabulky

Tabulka 1. Genotypy testovaných kmenů (Xenometrix)

Tabulka 2. Historická data firmy Xenometrix

Tabulka 3. Množství použitých kofaktorů frakce S9

Tabulka 4. Pozitivní kontroly pro testování bez frakce S9 (Xenometrix)

Tabulka 5. Pozitivní kontroly v pro testování s frakcí S9

Tabulka 6. Pozitivní jamky kontrol bakterií *Salmonella typhimurium* kmen TA98

Tabulka 7. Pozitivní jamky kontrol bakterií *Salmonella typhimurium* kmen TA100

Tabulka 8. Pozitivní jamky kontrol bakterií *Salmonella typhimurium* kmen TA1535

Tabulka 9. Pozitivní jamky kontrol bakterií *Salmonella typhimurium* kmen TA1537

Tabulka 10. Pozitivní jamky kontrol směsi bakterií *E. coli* Combo smíchané ve firmě MediTox s.r.o.

Tabulka 11. Pozitivní jamky kontrol směsi bakterií *E. coli* Combo dodané firmou Xenometrix

Tabulka 12. Rozdělení průměrů tripletů bakterií *Salmonella typhimurium* TA98

Tabulka 13. Rozdělení průměrů tripletů bakterií *Salmonella typhimurium* TA100

Tabulka 14. Rozdělení průměrů tripletů bakterií *Salmonella typhimurium* TA1535

Tabulka 15. Rozdělení průměrů tripletů bakterií *Salmonella typhimurium* TA1537

Tabulka 16. Rozdělení průměrů tripletů bakterií *E. coli* Combo smíchané ve firmě MediTox s.r.o.

Tabulka 17. Testování pozitivní kontroly 4-NQO (2 µg/ml) dne 15.9.2019

Tabulka 18. Testování pozitivní kontroly 2-AF (400 µg/ml) dne 15.9.2019

Tabulka 19. Testování kultury č. 1 bez předtestu

Tabulka 20. Počty pozitivních jamek předtestu kultur č. 1-3

Tabulka 21. Výsledky testu s restartovanou kulturou č. 1

Tabulka 22. Stanovení optické denzity testovaných kmenů při testování vzorku č. 10

Tabulka 23. Počet pozitivních jamek kmenů TA98, TA1535 a TA1537 po 48 h kultivaci

Tabulka 24. Předtest č. 1 pro TA100 a *E.coli* Combo připraveného smícháním WP2 pKM101 a WP2 uvrA ve firmě MediTox s.r.o.

Tabulka 25. Počet pozitivních jamek kmenu TA100 a *E. coli* Combo po 48 h kultivaci (hlavní test)

Tabulka 26. Předtest č. 2 pro TA100 a *E.coli* Combo připraveného smícháním WP2 pKM101 a WP2 uvrA ve firmě MediTox s.r.o.

Tabulka 27. Počet pozitivních jamek TA100 a *E. coli* Combo po 48 h kultivaci (hlavní test č.2)

Tabulka 28. Předtest č. 3 pro TA100 a *E.coli* Combo (dodané z Xenometrixu přímo jako směs WP2 pKM101 a WP2 uvrA)

Tabulka 29. Počet pozitivních jamek TA100 a *E. coli* Combo po 48 h kultivaci (hlavní test č.3)

Tabulka 30. Stanovení optické denzity testovaných kmenů při testování vzorku č. 11

Tabulka 31. Počet pozitivních jamek kmenů TA98, TA1535 a TA1537 po 48h kultivaci

Tabulka 32. Předtest č. 1 pro TA100 a *E.coli* Combo připravených smícháním WP2 pKM101 a WP2 uvrA ve firmě MediTox s.r.o.

Tabulka 33. Počet pozitivních jamek pro TA100 a *E. coli* Combo (hlavní test)

Tabulka 34. Předtest č.2 pro *E.coli* Combo (dodané z Xenometrixu přímo jako směs WP2 pKM101 a WP2 uvrA)

Tabulka 35. Počet pozitivních jamek *E. coli* Combo po 48 h kultivaci (hlavní test č.2)

Tabulka 36. Stanovení optické denzity testovaných kmenů při testování vzorku č. 12

Tabulka 37. Počet pozitivních jamek kmenů TA98, TA1535 a TA1537 po 48 h kultivaci

Tabulka 38. Předtest kmenu TA100 a směsi *E.coli* Combo

Tabulka 39. Počet pozitivních jamek kmenů TA100 a *E.coli* Combo

Tabulka 40. Historická data firmy MediTox s.r.o.

Obrázky

Obrázek 1. Příprava koncentrační řady (Xenometrix)

Obrázek 2. Přesun vzorků látky na expoziční destičky (Xenometrix)

Obrázek 3. Přesun kultur z 24-jamkové destičky na 384-jamkovou destičku (Xenometrix)

Obrázek 4. Pozitivní jamky kmene *E coli* Combo

Obrázek 5. Předtest 1. a 2. kultury *E. coli* Combo

Obrázek 6. Předtest 3. kultury *E. coli* Combo

Seznam zkratk

č.	číslo
D 1	Destička 1
D 2	Destička 2
D 3	Destička 3
ECHA	European chemicals agency
EMA	European Medicines Agency
ICH	The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
Konc.	Koncentrace
MPF TM	microplate format (mikro-destičkový formát)
N ⁴ -ACT	N ⁴ -aminocytidine
NK	Negativní kontrola
NTP	National Toxicology Program
OD	Optická denzita
ON	Overnight kultura
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
ot/min	Otáčky za minutu
PK	Pozitivní kontrola
SD	Směrodatná odchylka
2-AA	2-Aminoanthracene
2-AF	2-aminofluorene
2-NF	2-Nitrofluorene
4-NQO	4-Nitroquinoline-1-oxide
9-AAc	9-aminoacridine