

Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum

Wydział Farmaceutyczny

Zakład Biochemii Farmaceutycznej



Beata Powroźnik

***Ocena mutagenności i antymutagenności związków
o zdefiniowanej aktywności biologicznej z wykorzystaniem
testów alternatywnych***

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor: dr hab. Elżbieta Pękala, prof. UJ

Promotor pomocniczy: dr Karolina Słoczyńska

Kraków, 2016

Serdecznie dziękuję Promotorowi mojej pracy doktorskiej
Pani dr hab. Elżbiecie Pękali, prof. UJ
za poświęcony czas, wyrozumiałość, życzliwość oraz cenne
wskazówki w trakcie realizacji niniejszej pracy

Serdecznie dziękuję Promotorowi pomocniczemu
Pani dr Karolinie Słoczyńskiej
za współpracę, życzliwość, poświęcony czas
oraz wszechstronną pomoc w trakcie realizacji niniejszej pracy

Dziękuję Wszystkim Tym, którzy przyczynili się do powstania mojej pracy:

*Panu **prof. dr hab. Henrykowi Maronie**, Pani **dr Annie Waszkielewicz**
i **Współpracownikom** z Zakładu Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii
Organicznej UJ CM za syntezę związków 1-20 oraz umożliwienie
prowadzenia badań mikrobiologicznych w Pracowni Chemii Kosmetycznej*

*Panu **dr hab. Pawłowi Zajdlowi** z Zakładu Chemii Leków Katedry
Chemii Farmaceutycznej UJ CM za syntezę związków 21-36
oraz za poświęcony czas, pomoc i cenne wskazówki*

*Panu **prof. dr hab. Grzegorzowi Węgrzynowi** z Katedry Biologii
Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego za udostępnienie
szczepów *Vibrio harveyi* do badań*

*Pani **dr Takehiko Nohmi** z Zakładu Genetyki i Mutagenezy
Narodowego Instytutu Higieny, Tokio, Japonia za udostępnienie
szczepu *Salmonella typhimurium* TA100 do badań*

*Wszystkim **Pracownikom** i **Doktorantom** z Zakładu Biochemii
Farmaceutycznej UJ CM za życzliwość i wszelką pomoc*

Moim Rodzicom – dziękuję i poświęcam

Praca powstała dzięki współfinansowaniu ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka pt. „Opracowanie innowacyjnej grupy związków o aktywności stabilizującej potencjał błony komórkowej” (POIG.01.01.02-12-012/09-00).

Wyniki badań przedstawione w doktoracie stanowią podstawę następujących publikacji:

- Waszkielewicz AM, Gunia-Krzyżak A, **Powroźnik B**, Słoczyńska K, Pękala E, Walczak M, Bednarski M, Żesławska E, Nitek W, Marona H. Design, physico-chemical properties and biological evaluation of some new N-[(phenoxy)alkyl]- and N-{2-[2-(phenoxy)ethoxy]ethyl}aminoalkanols as anticonvulsant agents. *Bioorg Med Chem.* 2016; 24: 1793–1810.
- **Powroźnik B**, Słoczyńska K, Canale V, Grychowska K, Zajdel P, Pękala E. Preliminary mutagenicity and genotoxicity evaluation of selected arylsulfonamide derivatives of (aryloxy)alkylamines with potential psychotropic properties. *J Appl Genet.* 2016; 57: 263–270.
- Słoczyńska K, **Powroźnik B**, Pękala E, Waszkielewicz AM. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *J Appl Genet.* 2014; 55: 273–285.

Spis treści

I Wstęp.....	19
1. Mutagenność i genotoksyczność	20
1.1. Mutageny.....	28
2. Alternatywne badania mutagenności i genotoksyczności.....	31
2.1. Badania <i>in vitro</i>	33
2.1.1. Modele prokariotyczne	34
2.1.2. Modele eukariotyczne	35
2.2. Badania <i>in silico</i>	37
3. Aspekty prawne badania mutagenności i genotoksyczności	40
3.1. Algorytm badania mutagenności i genotoksyczności w UE	42
3.2. Testy alternatywne <i>in vitro</i> genotoksyczności i mutagenności	44
3.2.1. Testy rekomendowane przez UE i OECD	44
3.2.2. Pozostałe testy <i>in vitro</i> do oceny genotoksyczności i mutagenności.....	49
II Założenia i cel pracy.....	53
III Materiały i metody.....	58
1. Materiały.....	59
1.1. Badane związki	59
1.2. Szczepy bakteryjne.....	59
1.3. Składniki pożywek i odczynniki	59
1.4. Materiały laboratoryjne	60
1.5. Komercyjne zestawy testowe.....	60
1.6. Aparatura	60
1.7. Roztwory i bufony	61
1.7.1. Roztwory podstawowe	61
1.7.2. Roztwory robocze	63
1.7.3. Roztwory soli i buforów	67
2. Metodyka badań.....	69
2.1. Test Ames	69
2.2. Test <i>Vibrio harveyi</i>	71
2.3. Test <i>Vibrio harveyi</i> w wersji mikropłytkowej.....	74

2.4. Test SOS/ <i>umu</i>	76
2.5. Ocena działania antymutagennego testem Amesa	80
2.6. Ocena działania antymutagennego testem <i>Vibrio harveyi</i>	81
2.7. Programy komputerowe	82
IV Wyniki	83
1. Badania <i>in silico</i> bezpieczeństwa stosowania związków 1-36	84
2. Ocena aktywności mutagennej związków 1-36 <i>in vitro</i>	89
2.1. Test Amesa	89
2.2. Test <i>Vibrio harveyi</i>	91
2.3. Test <i>Vibrio harveyi</i> w wersji mikropłytkowej.....	95
3. Ocena aktywności genotoksycznej	98
4. Ocena aktywności antymutagennej.....	100
V Dyskusja.....	103
VI Podsumowanie	111
VII Piśmiennictwo.....	114
Spis tabel.....	131
Spis rycin	132

STRESZCZENIE

Obowiązujące prawo dotyczące rejestracji produktów leczniczych wymaga, aby wszystkie nowe związki o charakterze potencjalnych leków, przed skierowaniem ich do badań klinicznych, podlegały szeroko zakrojonym badaniom bezpieczeństwa zwłaszcza w zakresie oceny aktywności mutagennej i genotoksycznej. Obecnie w prawodawstwie europejskim kładzie się duży nacisk na rozwój i walidację metod alternatywnych, służących ocenie bezpieczeństwa substancji chemicznych. Metody alternatywne to metody zgodne z zasadą 3R, mającą na celu zastąpienie, ograniczenie i udoskonalenie wykorzystywania zwierząt w eksperymentach.

Przedmiot badań stanowiło 36 zróżnicowanych pod względem strukturalnym związków wśród, których znalazły się pochodne aminoalkanolowe (**1-20**) wykazujące działanie przeciwdrgawkowe, sulfonamidowe pochodne aryloksyetylo amin alicyklicznych (**21-28**) oraz sulfonamidowe pochodne arypiazolu (**29-36**) o aktywności przeciwdepresyjnej, przeciwłękowej i przeciwpsychotycznej.

Uniwersalność materiału genetycznego wszystkich organizmów uzasadnia stosowanie do przewidywania mutagenności związków chemicznych, tak różnych modeli badawczych, jak: komórki bakterii, drożdży, owadów, linie komórek ssaków, zwierzęta doświadczalne a następnie ekstrapolowanie tych wyników na organizm człowieka.

W związku z tym, w ramach pracy oznaczono aktywność mutagenną wyselekcjonowanych związków stosując metody alternatywne *in silico* oraz *in vitro*, oszczędzające zwierzęta. W pierwszym etapie przewidywanie potencjału mutagennego związków **1-36** wykonano wykorzystując program komputerowy OSIRIS. Następnie wysymulowane komputerowo wyniki poddano weryfikacji poprzez porównanie z danymi uzyskanymi eksperymentalnie. W celu ustalenia potencjału mutagennego związku objęte projektem badano w teście Ames, stosując szczep *Salmonella typhimurium* TA100, stanowiący nieodłączny element panelu szczepów *S. typhimurium* wykorzystywanych w rutynowych badaniach przesiewowych mutagenności oraz teście *Vibrio harveyi*, w obecności szczepu dzikiego BB7 oraz trzech jego genetycznych modyfikacji – BB7X, BB7M, BB7XM. Genotoksyczność wybranych związków **3-5**, **7-12**, **14-28** oszacowano

za pomocą mikroplótkowego testu SOS/*umu* z udziałem szczepu *S. typhimurium* TA1535/pSK1002, który dzięki licznym modyfikacjom genetycznym jest wystarczający do identyfikacji wszystkich klas bakteryjnych genotoksyn. Bardzo istotnym osiągnięciem projektu było opracowanie testu *Vibrio harveyi* w wersji mikroplótkowej, dzięki czemu obecnie można zwiększyć przepustowość badań przesiewowych mutagenności, skrócić czas oczekiwania na wyniki oraz zoptymalizować ich koszty.

Z uwagi na możliwość prostej modyfikacji metodyki zarówno testu Amesa jak i *Vibrio harveyi*, w ramach pracy dla wszystkich związków projektowych (**1-36**) pozbawionych potencjału mutagennego oznaczono dodatkowo aktywność antymutagenną, która jest cenną komponentą działania chemoprewencyjnego.

W celu uwiarygodnienia przeprowadzonych badań otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej. Uzyskane wyniki mają charakter aplikacyjny, przyczyniły się do bardziej racjonalnej selekcji związków o zdefiniowanej aktywności w ośrodkowym układzie nerwowym do dalszych badań przedklinicznych i klinicznych, pozwoliły także wyłonić spośród badanej grupy połączeń trzy struktury: **1**, **2** i **33** o bardzo wysokiej korzystnej aktywności antymutagennej.

Słowa kluczowe: antymutagenność, genotoksyczność, mutagenność, testy alternatywne, test Ames, testu SOS/*umu*, test *Vibrio harveyi*

SUMMARY

Determination of the mutagenic and genotoxic liability of biologically active compounds is of great concern for preliminary toxicity testing and drug development. In addition, most regulatory authorities have increased their commitment to a reduction in the use of animals in toxicology testing. In line with the basic principles of humane animal experimentation (Reduce, Refine, and Replace, *i.e.* 3Rs) it has been recommended that *in vitro* tests should be followed up with as few as possible *in vivo* tests.

The aim of the present study was to evaluate the mutagenic and genotoxic properties of 36 new biologically active compounds, *i.e.* aminoalkanol derivatives with anticonvulsant activity, arylsulfonamide derivatives of (aryloxy)alkylamines and sulfonamide analogs of aripiprazole which display antidepressant, anxiolytic, and/or antipsychotic properties. Focusing on the application of alternative *in vitro* and *in silico* test methods to predict compounds mutagenicity the novel *Vibrio harveyi* assay and OSIRIS Property Explorer software were employed. Additionally, the Ames test was used as the reference. Genotoxic liability was evaluated using the SOS/*umu*-test (*umuC* Easy CS test). Finally, the antimutagenic effects of the tested compounds were examined against NQNO in the *Vibrio harveyi* assay and the Ames test.

In the present study, was also developed the *Vibrio harveyi* microplate test procedure, which allows the preliminary assessment of mutagenic activity of chemical compounds. The development of microplate *Vibrio harveyi* assay enables a significant reduction of the amounts of growth media and reagents used in the experiment. Additionally, it provides an opportunity for simultaneous testing of many substances and to get results in shorter time than in a classic *Vibrio harveyi* assay.

The obtained preliminary results encourage further studies in eukaryotic models to confirm the lack of genotoxicity of the tested compounds, as some of the tested molecules possess mutagenic and toxic constituents. Additionally, all the tested compounds demonstrated various antimutagenic potential, with compounds **1**, **2** and **33** being the most active against NQNO-induced mutagenicity.

Keywords: alternative testing methods, Ames test, anti/mutagenesis, genotoxicity, SOS/*umu*-test, *Vibrio harveyi* assay

Wykaz skrótów

ADD	ang. <i>Antiepileptic drug development program</i>	Program rozwojowy leków przeciwpadaczkowych
ADME	ang. <i>Absorption, distribution, metabolism, excretion</i>	Adsorpcja, dystrybucja metabolizm, wydalanie
ANOVA	ang. <i>Analysis of variance</i>	Analiza wariancji
AP	ang. <i>Apyrimidinic/ apurinic site</i>	Miejsce apurynowe/ apirymidynowe
ARP	ang. <i>Aripiprazole</i>	Arypiprazol
AS	ang. <i>Sodium azide</i>	Azydek sodu
BA	ang. <i>Bottom agar</i>	Podłoże minimalne
B[a]P	ang. <i>Benzo[a]pyrene</i>	Benzo[a]piren
BER	ang. <i>Base excision repair</i>	Naprawa DNA przez wycinanie zasady
BPDE	ang. <i>Benzo(a)pyrene diolepoxide</i>	Diol-epoksyd benzo[a]pirenu
CA	ang. <i>Chromosomal aberration test</i>	Test aberracji chromosomowych
DB-ALM	ang. <i>Database Service on Alternative Methods</i>	Baza Danych Metod Alternatywnych
DMS	ang. <i>Dimethyl sulfide</i>	Siarczek dimetylu
DMSO	ang. <i>Dimethyl sulfoxide</i>	Dimetylosulfotlenek
DSB	ang. <i>Double strand breaks</i>	Uszkodzenie obu nici DNA
EURL	ang. <i>European Union Reference</i>	Laboratorium referencyjne Unii
ECVAM	<i>Laboratory for Alternatives to Animal Testing</i>	Europejskiej ds. metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach
ED₅₀	ang. <i>Effective dose</i>	Dawka skuteczna dla 50% badanych zwierząt
EMA	ang. <i>European Medicines Agency</i>	Europejska Agencja Leków
EMS	ang. <i>Methanesulfonic acid ethyl ester</i>	Ester etylowy kwasu metanosulfonowego
ENU	ang. <i>N-ethyl-N-nitrosourea</i>	N-etylo-N-nitrozomocznik

ETS	ang. <i>European Treaty Series</i>	Zbiór traktatów europejskich
FDA	ang. <i>Food and Drug Administration</i>	Agencja Żywności i Leków
FISH	ang. <i>Fluorescent in situ hybridization</i>	Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i>
GF	ang. <i>Growth factor</i>	Współczynnik biomasy
HPRT	ang. <i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>	Fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa
ICCVAM	ang. <i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i>	Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Walidacji Metod Alternatywnych
ICH	ang. <i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>	Międzynarodowa Konferencja ds. Harmonizacji
%Inh.	ang. <i>Inhibition rate (%)</i>	Procent hamowania mutagenezy
IR	ang. <i>Induction ratio</i>	Współczynnik indukcji
LD₅₀	ang. <i>Lethal dose</i>	Dawka letalna dla 50% badanych zwierząt
MES	ang. <i>Maximal electroshock test</i>	Test maksymalnego elektroszoku
MI	ang. <i>Mutagenic index</i>	Współczynnik mutagenności
MLA	ang. <i>Mouse lymphoma assay</i>	Test mutacji genu kinazy tymidynowej
MMS	ang. <i>Methanesulfonic acid methyl ester</i>	Ester metylowy kwasu metanosulfonowego
MN	ang. <i>Micronucleus test</i>	Test mikrojądrowy
MNU	ang. <i>N-methyl-N-nitrosourea</i>	<i>N</i> -metylo- <i>N</i> -nitrozomocznik
NER	ang. <i>Nucleotide excision repair</i>	Naprawa przez wycinanie nukleotydu
NIH	ang. <i>National Institutes of Health</i>	Amerykański Narodowy Instytut Zdrowia
4-NPD	ang. <i>4-nitro-O-phenylenediamine</i>	4-nitro- <i>O</i> -fenylenodiamina

NQNO	ang. <i>4-nitroquinoline N-oxide</i>	N-tlenek-4-nitrochinoliny
OD₆₀₀	ang. <i>Optical density</i>	Gęstość optyczna hodowli przy długości fali 600 nm
OECD	ang. <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>	Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju
ONPG	ang. <i>2-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside</i>	2-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozyd
PLS	ang. <i>Partial least squares methods</i>	Metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów
(Q)SAR	ang. <i>Quantitative structure - activity relationships</i>	Ilościowe zależności struktura - aktywność
3R	ang. <i>Replacement, reduction, refinement</i>	Zastąpienie, zmniejszenie doskonalenie
RFT	ang. <i>Reactive oxygen species</i>	Reaktywne formy tlenu
rpm	ang. <i>Revolutions per minute</i>	Obroty na minutę
RTECS	<i>Registry of Toxic Effects of Chemical Substances</i>	Rejestr Toksycznych Efektów Substancji Chemicznych
scMet	ang. <i>Subcutaneous pentylenetetrazol test</i>	Test pentetrazolowy
SD	ang. <i>Standard deviation</i>	Odchylenie standardowe
SDS	ang. <i>Sodium dodecyl sulfate</i>	Dodecylosiarcza sodu
SSB	ang. <i>Single strand breaks</i>	Jednoniciowe pęknięcia DNA
SVM	ang. <i>Support vector machines</i>	Metoda wektorów nośnych
TFT	ang. <i>Trifluorothymidine</i>	Trifluorotymidyna
TD₅₀	ang. <i>Toxic dose</i>	Dawka toksyczna dla 50% badanych zwierząt
temp.	ang. <i>Temperature</i>	Temperatura
TA	ang. <i>Top agar</i>	Agar powierzchniowy
TG	ang. <i>Test guideline</i>	Wytyczne OECD
TGA		Podłoże TG z ampicyliną
TK	ang. <i>Thymidine kinase</i>	Kinaza tymidynowa

U_β	ang. <i>β-galactosidase activity</i>	Aktywności β-galaktozydazy
UDS	ang. <i>Unscheduled DNA synthesis</i>	Test nieplanowanej syntezy DNA
UE	ang. <i>European Union</i>	Unia Europejska
WE		Wspólnota Europejska
WWA	ang. <i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i>	Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne
XPRT	ang. <i>Xanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>	Fosforybozylotransferaza ksantynowo-guaninowa
zw.	ang. <i>Compound</i>	Związek

I Wstep

1. Mutagenność i genotoksyczność

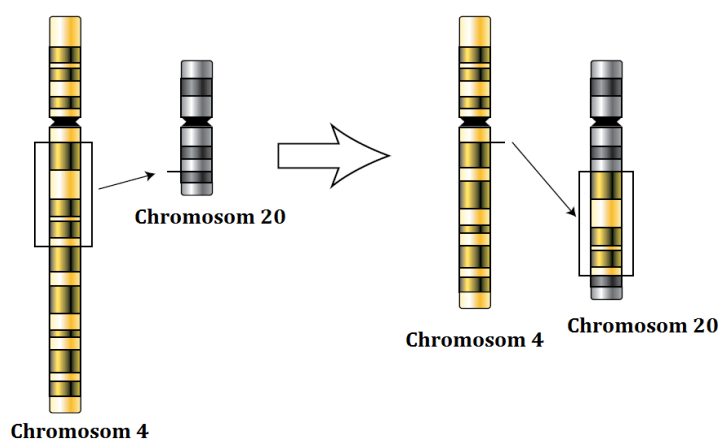
Środowisko, w którym żyjemy wpływa na materiał genetyczny. Niektóre czynniki środowiskowe, np. promieniowanie jonizujące, ultrafioletowe, szereg związków chemicznych, w tym niektóre leki oraz zanieczyszczenia przemysłowe, mogą być przyczyną uszkodzeń DNA (Kouvelis i wsp., 2011). W każdej komórce po zadziałaniu czynnika genotoksycznego następuje uruchomienie mechanizmów naprawczych. Naprawa DNA w komórce, może być kompletna i niekompletna. Jeżeli enzymy naprawcze nie zdołają naprawić uszkodzeń DNA, to komórka może przejść na szlak zaprogramowanej śmierci – apoptozy. W przypadku naprawy niekompletnej dochodzi do powstania mutacji genowych lub aberracji chromosomowych (Izzotti i wsp., 2003; Weakley i wsp., 2010). Mutacja oznacza trwałą zmianę w ilości lub strukturze materiału genetycznego w komórce. Pojęcie mutacja odnosi się zarówno do dziedzicznych zmian genetycznych, które mogą się objawiać na poziomie fenotypu, jak i do podstawowych modyfikacji DNA, jeśli są znane (w tym specyficzne zmiany par zasad i translokacje chromosomowe). Określenia „mutagenny” i „mutagen” używa się w odniesieniu do czynników powodujących zwiększone występowanie mutacji w populacjach komórek lub organizmów. Niektóre z tych mutacji mogą powodować transformację nowotworową (karcynogenezę), wady rozwojowe (teratogenezę) lub śmierć komórek (całego organizmu) (Erickson, 2010; Słoczyńska i wsp., 2014b).

W zależności od rodzaju uszkodzenia materiału genetycznego wyróżnia się trzy podstawowe typy mutacji:

- mutacje punktowe (genowe), zachodzące w obrębie jednego genu, polegające na zmianie sekwencji nukleotydów na skutek wstawienia (insercji) (Rycina 1, str. 21), wypadnięcia (delecji) jednego lub kilku nukleotydów oraz zamiany w obrębie nukleotydów zawierających zasady purynowe (tranzycja) lub pomiędzy nukleotydami purynowymi i pirymidynowymi (transwersja) (Solomon i wsp., 2014).
- aberracje chromosomowe strukturalne (mutacje chromosomowe), dotyczące zmiany struktury chromosomu (klastogenezy) w rezultacie pęknięcia, utraty

(delecji), lub przemieszczenia (translokacji) fragmentu chromosomu, podwojenia (duplikacji) lub odwrócenia (inwersji).

- Aberracje chromosomowe liczbowe (mutacje genomowe), powstające w wyniku zaburzenia procesu mitozy, prowadzące do zmiany liczby chromosomów (aneuploidia) lub zwielokrotnienia kariotypu (poliploidia).



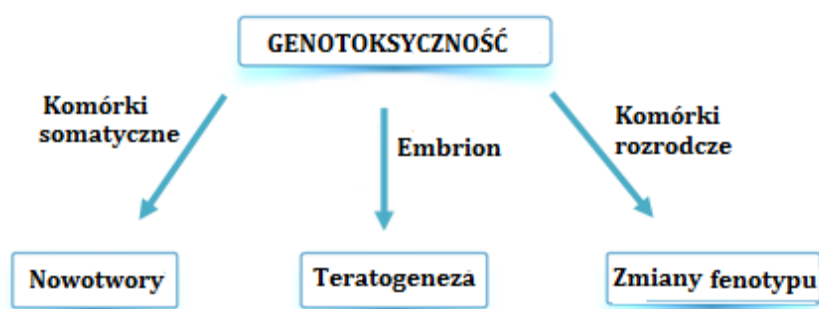
Rycina 1. Mechanizm insercji na poziomie całego chromosomu (<http://www.genome.gov>).

Uszkodzenia DNA mogą powodować efekt genotoksyczny w komórkach organizmów żywych (Maurici i wsp., 2005; Eastmond i wsp., 2009). Pojęcia „genotoksyczny” i „genotoksyczność” odnoszą się do czynników lub procesów powodujących zmianę struktury, treści informacji lub podziału DNA, łącznie z tymi, które powodują uszkodzenie DNA poprzez zakłócenie normalnych procesów replikacji lub, które w sposób niefizjologiczny (tymczasowo) zmieniają jego replikację. Związki genotoksyczne mogą działać na DNA bezpośrednio, np. związki alkilujące, etylenoimina, lub działać na DNA w sposób pośredni, czyli po aktywacji enzymatycznej, np. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, nitrozoaminy. Aktywność związków genotoksycznych działających pośrednio na DNA (tzw. prekancerogeny) jest wypadkową procesów aktywacji i detoksykacji, jakim ulegają w organizmie (Migliore i Coppedè, 2002; El-Sayed i Hussin, 2013a). Udowodniono wysoką korelację między działaniem genotoksycznym, a kancerogennym związków chemicznych. Czynniki genotoksyczne inicjujące kancerogenezę mogą reagować z DNA tworząc addukty (połączenie zasad azotowych, np. z nitrozoaminami), mogą również powodować modyfikacje zasad azotowych w DNA. Jednorazowy kontakt komórki

z chemicznym czynnikiem genotoksycznym może wystarczyć do indukcji zmian w genomie komórki. Powstałe zmiany są nieodwracalne.

Efekty genotoksyczności można zaobserwować jedynie w żywych komórkach, a więc tylko wtedy, gdy w wyniku działania związku chemicznego lub mieszaniny związków komórka nie zostanie uszkodzona w rezultacie pojawienia się efektu cytotoksycznego. Zmienione genetycznie komórki somatyczne zaczynają proliferować, co w rezultacie prowadzi do rozwoju nowotworu (Migliore i Coppedè 2002; Cooke i wsp., 2003 Yamakage i wsp., 2014)

Całkowicie odmienne skutki powodują mutacje komórek rozrodczych, których efektem jest nie tylko zmienność o podłożu genetycznym, lecz ciężkie schorzenia genetyczne bądź efekt letalny. Skutkiem mutacji komórek rozrodczych po zapłodnieniu jest potomstwo obciążone defektem genetycznym lub całkowite uniemożliwienie rozwoju zarodka (Rycina 2).

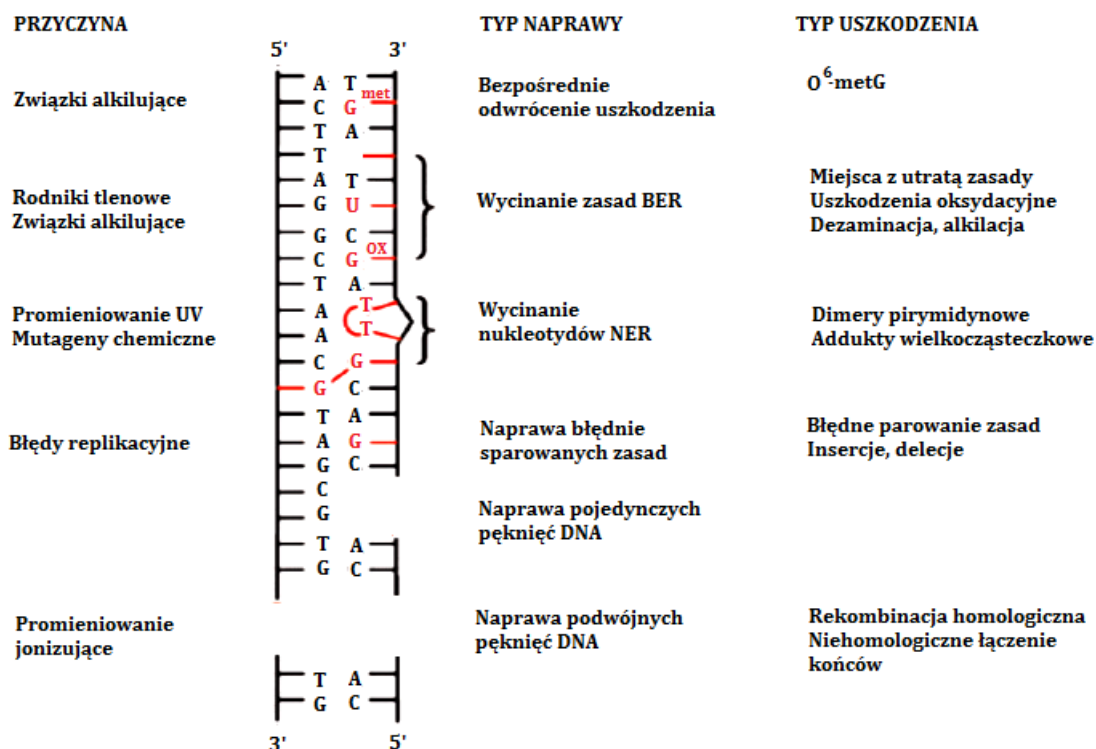


Rycina 2. Efekty działania genotoksycznego (Eastmond i wsp., 2009).

Termin „genotoksyczność” w porównaniu do „mutagenności” jest pojęciem szerszym i zawiera również zdolność do uszkodzania aparatu enzymatycznego, uczestniczącego w procesie naprawy DNA. Efekt genotoksyczny nie zawsze jest związany z mutacjami. Natomiast mutagenność odnosi się głównie do stałych zmian jakościowych bądź ilościowych informacji genetycznej zawartej w DNA. Wyniki badań genotoksyczności traktuje się zwykle jako wskaźniki skutków mutagennych.

Do najczęstszych uszkodzeń DNA spowodowanych przez czynniki mutagenne i genotoksyczne należą: utrata zasady azotowej, interkalacja czynnika pomiędzy pary zasad, modyfikacja zasad azotowych przez hydrolizę, alkilację oraz oksydację (Tuteja i wsp., 2009). W wyniku działania czynników mutagennych

i genotoksycznych mogą powstawać wiązania poprzeczne wewnątrz i między niciami DNA, fotouszkodzenia, a także nowe przerwania w obrębie jednoniciowego lub dwuniciowego DNA (Rycina 3).



Rycina 3. Rodzaje uszkodzeń oraz mechanizmy naprawy DNA (Bulman i wsp., 2006).

Utrata zasady azotowej należy do częstych uszkodzeń DNA na skutek hydrolytycznego zerwania wiązania β -N-glikozydowego pomiędzy deoksyrybozą a zasadą azotową (De Bont i van Laerbeke, 2004; Amosova i wsp. 2006). Miejsca pozbawione zasady azotowej nazywane są miejscami AP (*APyrimidinic/APurinic site*) w zależności od utraconej puryny lub pirymidyny. W komórkach ludzkich dziennie powstaje spontanicznie około 10 000 miejsc AP. Miejsca AP powstają najczęściej przez oddziaływanie DNA z wolnymi rodnikami tlenowymi, wytworzonymi m. in. na skutek działania światła UV, związków alkilujących oraz szoku termicznego. W efekcie wystąpienia w łańcuchu DNA miejsc AP mogą powstawać: mutacje punktowe, aberracje chromosomowe, zaburzenia transkrypcji oraz pęknięcia nici DNA.

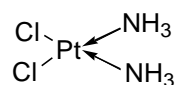
Interkalacja polega na wnikaniu płaskich cząsteczek, najczęściej o strukturze aromatycznej, między zasady azotowe w łańcuchu DNA, powodując

ich rozsuniecie. Interkalacja cząsteczek powoduje wydłużanie struktury, zmniejszenie elastyczności i obniżenie gęstości DNA (Gherghi i wsp., 2003; Minotti i wsp., 2004; Rabik i Dolan, 2007). Następstwem tych zmian jest deformacja DNA powodująca błędy replikacji, prowadzące do delecji lub insercji pojedynczych par nukleotydów, a w dalszej konsekwencji do mutacji typu zmiany ramki odczytu. Związki interkalujące mogą także przyczynić się do powstania wiązań poprzecznych między nićmi DNA, prowadząc do zaburzenia procesu replikacji i transkrypcji. Głównym miejscem oddziaływania związków interkalujących z DNA, są sekwencje 5'-GC-3', 5'-CG-3'. Czynnikiem interkalującym są m.in.: oranż akrydyny, proflawina, heterocykliczne aminy oraz bromek etydydy. Jako leki przeciwnowotworowe znalazły zastosowanie następujące interkalatory: amsakryna, aktynomycyna D, bleomycyna, mitomycyna C czy 5-bromouracyl (Dopierała i wsp., 2011).

Każda modyfikacja grup chemicznych wchodzących w skład zasad azotowych może powodować nieprawidłowe parowanie zasad i w konsekwencji prowadzić do powstania uszkodzeń DNA. Większość mutagennych czynników chemicznych oddziałuje na DNA poprzez **modyfikację zasad azotowych**. Do najczęściej obserwowanych reakcji chemicznych czynników mutagennych z zasadami azotowymi należy alkilacja, dezaminacja oraz oksydacja (Wyatt i Pittman, 2006; Sedgwick i wsp., 2007).

- Alkilacja polega na wprowadzeniu grup alkilowych (np. metylowych, etylowych) w różne pozycje zasad azotowych, głównie purynowych. Efekt alkilacji zależy od rodzaju dodanej grupy alkilowej oraz miejsca, w które zostanie ona wbudowana (De Bont i van Laerbeke, 2004, Drablos i wsp., 2004, Wyatt i Pittman, 2006). Do związków alkilujących należą między innymi sulfonian dietylowy, sulfonian etylometylowy oraz metylosulfonian metylu i etylnitrozomocznik. Największą wrażliwość na alkilację wykazuje atom azotu N7 guaniny. W dalszej kolejności alkilacji ulegają atom azotu N1 guaniny, N1 i N3 adeniny i N3 cytozyny. Alkilacja może powodować różne skutki tj.: powstawanie miejsc AP, tworzenie wiązań poprzecznych między i wewnątrz nici DNA, jednoniciowe i dwuniciowe złamanie nici DNA, zablokowanie replikacji oraz substytucje, delecje i insercje nukleotydów. Do leków alkilujących należą m.in. pochodne platyny – cisplatyna,

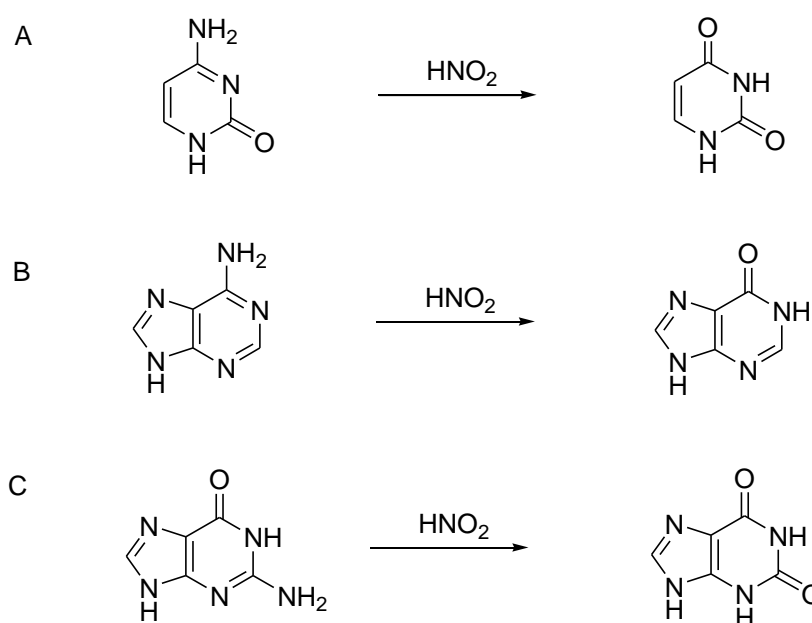
karboplatyna, oksaliplatyna. Są to płaszczyznowe kompleksy cis-diaminy z dwuwartościową platyną jako atomem centralnym (Rycina 4).



Rycina 4. Płaski kompleks cis-diaminoplatyny.

Właściwą postacią czynną związków platyny jest elektrofilny kompleks wodny, który powstaje wewnątrzkomórkowo. Działa on w sposób nieswoisty dla fazy poprzez wybiórcze łączenie pojedynczych nici DNA i hamuje w ten sposób podział komórek. Wybiórczym punktem uchwytu jest azot N7 guaniny (Galea i Murray, 2008; Basu i Krishnamurthy, 2010).

- Dezaminacja polega na eliminacji z cząsteczki związku chemicznego grupy aminowej. Zmiana w budowie chemicznej zasad azotowych prowadzi do zamiany par zasad w łańcuchu DNA (Vongchampa i wsp., 2003; Sun i wsp., 2005).

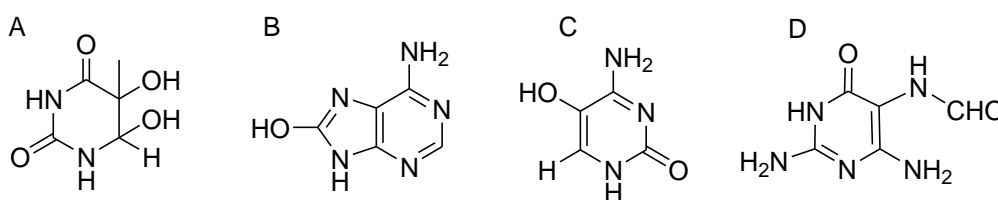


Rycina 5. Dezaminacja zasad azotowych: (A) zamiana cytozyny na uracyl, (B) zamiana adeniny na hipoksantynę, (C) zamiana guaniny na ksantynę (Vongchampa i wsp., 2003).

Przykładem mutagenu wywołującego dezaminację jest kwas azotowy (III). Kwas ten powoduje usunięcie grupy aminowej w adeninie, cytozynie lub guaninie. Dezaminacja prowadzi do powstania hipoksantyny z adeniny, ksantyny z guaniny

oraz uracylu z cytozyny (Rycina 5, str. 25). Przekształcenia zasad azotowych powstałe w wyniku dezaminacji, przyczyniają się do tworzenia różnych mutacji punktowych.

- Oksydacja – główną, aktywną formą tlenu, odpowiedzialną za powstanie większości oksydacyjnych uszkodzeń cząsteczki DNA, jest rodnik hydroksylowy – OH•. W wyniku oddziaływania tego rodnika na wiązanie C5=C6 tyminy tworzy się glikol tyminy, który może powodować zablokowanie transkrypcji, replikacji oraz mutacje punktowe, np. C → T (Cooke i wsp., 2003). Połączenie się rodnika wodorotlenowego z węglem C8 adeniny, tworzy 8-hydroksyadeninę, natomiast z węglem C5 cytozyny tworzy 5-hydroksycytozynę. Reaktywne formy tlenu (RFT) mogą także powodować rozerwanie pierścienia imidazolowego w purynie, np. w guaninie, tworząc 2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopyrimidynę (FapyGua), która powoduje zahamowanie replikacji i apoptozę komórki (Rycina 6).



Rycina 6. Przykłady związków powstałych w reakcji wolnorodnikowej z zasadami azotowymi: (A) glikol tyminy, (B) 8-hydroksyadenina, (C) 5-hydroksycytozyna, (D) FapyGua (Cooke i wsp., 2003).

Wolne rodniki tlenowe powodują najczęściej uszkodzenia zasad azotowych, reszt cukrowych, rozerwanie wiązań fosfodiesterowych – rozerwanie łańcucha fosfocukrowego i tworzenie wiązań poprzecznych między DNA i białkami chromatyny (De Bont i van Laerbeke, 2004; Roldan-Arjona i Ariza, 2009).

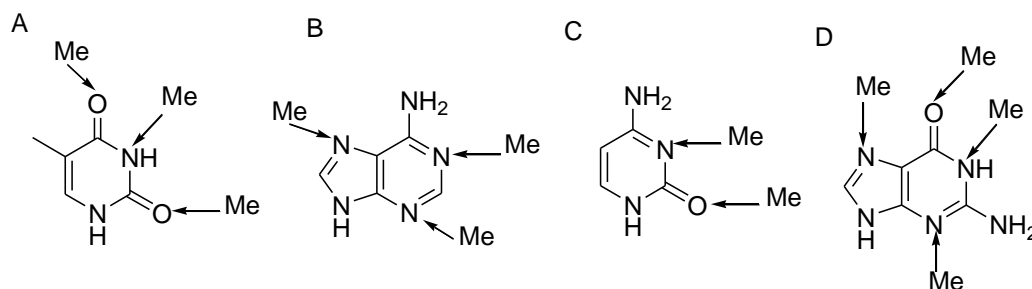
Uszkodzenia DNA mogą powodować tworzenie się **kowalencyjnych wiązań poprzecznych (cross-linking)** w DNA, prowadząc do zaburzenia procesów replikacji i transkrypcji (Lehoczky i wsp., 2007; Minko i wsp., 2009). Można wyróżnić wiązania poprzeczne wewnątrz nici DNA, pomiędzy nićmi DNA oraz między białkami znajdującymi się w komórce i DNA. Wiązania poprzeczne najczęściej powstają na skutek oddziaływania DNA ze związkami alkilującymi, aromatycznymi oraz wolnymi rodnikami. Na początku dochodzi do tworzenia się monoadduktów z DNA, czyli kompleksów powstałych z połączenia się w jednym miejscu grupy reaktywnej związku mutagennego i DNA. 90 %

powstałych monoadduktów przekształca się w wiązania poprzeczne, kiedy związek chemiczny jest połączony z DNA w dwóch różnych miejscach. Wiązania poprzeczne między białkami, a DNA są wykorzystywane, jako biomarkery długości ekspozycji komórki na mutagen, ponieważ im dłuższy czas ekspozycji, tym więcej tworzy się wiązań białko-DNA (Raschle i wsp., 2008; Roldan-Arjona i Ariza, 2009).

Do **pęknięć nici DNA** dochodzi podczas normalnego metabolizmu komórek, w trakcie replikacji, transkrypcji i rekombinacji chromatyd (Tsai i wsp., 2015; Longhese i wsp., 2009). Powstają one także w wyniku oddziaływania promieniowania i mutagenów chemicznych na DNA. Pęknięcia nici DNA mogą być jednoniciowe (SSB, *Single Strand Breaks*) lub dwuniciowe (DSB, *Double Strand Breaks*). Mutageny najczęściej indukują różne typy uszkodzeń DNA, które dopiero w następstwie prowadzą do powstania DSB podczas naprawy lub replikacji. Obecność SSB, w znacznej odległości od siebie, nie powoduje poważnych zaburzeń w komórce. Duże zagrożenie dla funkcjonowania komórki stanowi pojawienie się kilku jednoniciowych pęknięć w bliskiej odległości od siebie lub naprzeciw siebie, które mogą doprowadzić do dwuniciowych pęknięć DNA (Cornforth, 2006; Khoronenkova i Dianov, 2015). Często nieprawidłowa naprawa DSB skutkuje powstawaniem aberracji chromosomowych, takich jak: delecje, duplikacje czy translokacje, co w konsekwencji może wywołać zablokowanie replikacji i apoptozę komórki.

Związki uszkadzające DNA mogą oddziaływać ze strukturą DNA w sposób bezpośredni lub pośredni (De Bont i van Laerbeke, 2004, Noll i wsp., 2006; Wyatt i Pittman, 2006).

Mechanizm bezpośredni występuje, kiedy mutagenne czynniki chemiczne reagują z elementami wchodzącymi w skład DNA, co prowadzi np. do zerwania wiązań między nimi. Zerwanie wiązania β -N-glikozydowego pomiędzy zasadą azotową a cukrem (dezoksyrybozą) może skutkować utratą zasady azotowej. Natomiast rozerwanie wiązania fosfodiesterowego pomiędzy fosforanem jednego nukleotydu a węglem kolejnego nukleotydu może prowadzić do pęknięć nici DNA. Mechanizm bezpośredni może prowadzić także do modyfikacji zasad azotowych, np. poprzez alkilację (Rycina 7, str. 28) czy dezaminację.



Rycina 7. Miejsca ataku grup alkilowych (Me) w zasadach azotowych (A) tymina, (B) adenina, (C) cytozyna, (D) guanina (Wyatt i Pittman, 2006).

Mechanizm pośredni występuje, gdy czynniki chemiczne modyfikują strukturę DNA dopiero po wytworzeniu w komórce metabolitów pośrednich, np. wolnych rodników tlenowych, zdolnych do oddziaływania z DNA. Rodniki tlenowe są to atomy lub cząsteczki zawierające jeden lub więcej niesparowanych elektronów na orbitalu walencyjnym (Chong i wsp., 2005; Adibhatla i Hatcher, 2010). Charakterystyczną cechą wolnych rodników tlenowych jest ich duża reaktywność i krótki okres półtrwania wynikający z dążenia do sparowania elektronów przez odebranie lub oddanie ich innym cząsteczkom. w wyniku działania wolnych rodników tlenowych dochodzi do wielorakich uszkodzeń wewnątrzkomórkowych, takich jak peroksydacja lipidów błon komórkowych, inaktywacja enzymów, uszkodzenie DNA, zmiany strukturalne w cząsteczkach białek i węglowodanów.

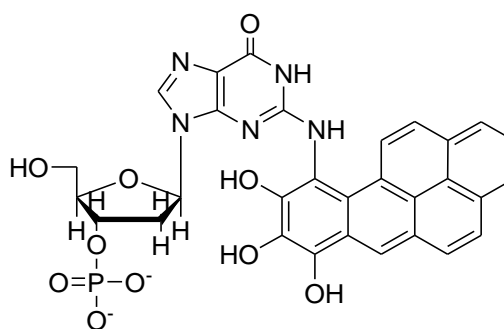
1.1. Mutageny

Najliczniejszą grupę związków chemicznych wykorzystywanych w mutagenezie stanowią związki alkilujące, dzielone na związki mono-, bi- i polifunkcyjne ze względu na liczbę grup alkilowych w nich występujących (Sawhney i wsp., 2007; Achary i Panda, 2010; Gulluce i wsp., 2010). Związki takie, jak *N*-metylo-*N*-nitrozomocznik (MNU), *N*-etylo-*N*-nitrozomocznik (ENU), ester etylowy kwasu metanosulfonowego (EMS), ester metylowy kwasu metanosulfonowego (MMS) oraz siarczek dimetylu (DMS) należą do związków monofunkcyjnych, natomiast iperyt azotowy jest związkiem bifunkcyjnym. Związki alkilujące powodują powstanie mutacji punktowych, ale mogą również powodować efekt klastogeny, tzn. wywołują zmiany w strukturze chromosomów.

W zależności od użytego mutagenu powstają różne uszkodzenia DNA. MNU indukuje głównie powstanie tranzycji GC → AT, podczas gdy ENU prowadzi zarówno do tranzycji GC → AT, jak i AT → GC oraz transwersji GC → CG lub AT → CG. EMS indukuje tranzycję CG → TA, natomiast MMS powoduje uszkodzenie widełek replikacyjnych i powstanie pęknięć DNA (Drablos i wsp., 2004; Guenet, 2004).

Innym związkiem wykorzystywanym w mutagenezie, jest azydek sodu (NaN₃). Ma on w swojej budowie reaktywny jon azydkowy, który w roztworze wodnym występuje w postaci toksycznego azotowodoru (Mol i Stolarek, 2011; Słoczyńska i wsp., 2014b). Azydek sodu zaliczany jest do silnych mutagenów, jednak nie wykazuje działania mutagennego w stosunku do wszystkich organizmów; np. powoduje powstanie mutacji w genomie *Escherichia coli* natomiast u *Drosophila melanogaster* mutacje nie są obserwowane. Azydek sodu wykazuje reaktywność w kwasowym pH. Mutagenny jest dopiero organiczny metabolit pośredni azydku sodu powstały w organizmie podczas syntezy cysteiny. Związkiem tym jest najprawdopodobniej azydoalanina, powstała w wyniku reakcji katalizowanej przez enzym sulfohydrolazę O-acetyloserynową. Szlak biosyntezy cysteiny zachodzi u bakterii i roślin, u zwierząt nie występuje, w związku z tym azydek dla tych organizmów nie jest czynnikiem mutagenym. Azydoalanina może wchodzić w interakcje z DNA, powodując powstanie mutacji punktowych w genomie. Jony azydkowe łączą się także z oksydazą cytochromową, prowadząc do inhibicji procesu oddychania wewnątrzkomórkowego i do zahamowania biosyntezy ATP, nośnika energii wykorzystywanego w podstawowym metabolizmie komórki. Azydek sodu powoduje przede wszystkim tranzycję AT → GC (Gulluce i wsp., 2010; Turhan i wsp., 2012).

Natomiast wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, takie jak np. benzo[a]piren (B[a]P) tworzą addukty z DNA (Rycina 8, str. 30). B[a]P zaliczany jest do promutagenów, czyli związków, które stają się właściwymi mutagenami dopiero po metabolicznym przekształceniu w organizmie (Smith i Gupta, 1996; Ajith i Janardhanan, 2011). B[a]P ulega przemianie metabolicznej do diol-epoksyd benzo[a]pirenu (BPDE), w wyniku której wiąże się z atomem azotu N2 guaniny w DNA.



Rycina 8. Addukt metabolitu benzo[a]pirenu z guaniną.

Mutagenne pochodne nitrowe także tworzą addukty z DNA. Do grupy tej zalicza się m.in. nitroareny, nitrozoaminy, jak np. 4-nitro-*O*-fenylenodiamina (NPD), czy *N*-tlenek-4-nitrochinoliny (NQNO), który łączy się z DNA, tworząc addukty poprzez guaninę w pozycji C8 i N2 oraz poprzez adeninę w pozycji N6 i indukuje mutacje podstawiania zasad w DNA (G → A) (Fronza i wsp., 1992; Słoczyńska i wsp., 2014b).

Uszkodzenia powstające w materiale genetycznym, jeśli nie zostaną bezbłędnie naprawione lub usunięte, mogą prowadzić do zmian patologicznych, m.in. do rozwoju chorób nowotworowych. Wobec wzrastającej ilości nowych związków chemicznych wprowadzanych do środowiska, w którym żyje i funkcjonuje człowiek, istnieje konieczność identyfikacji czynników stwarzających zagrożenie dla jego zdrowia. Z tego powodu podejmowane są liczne prace badawcze, mające na celu ocenę ich właściwości mutagennych i genotoksycznych (Mol i Stolarek, 2011).

Intensywny rozwój dziedzin naukowych z zakresu inżynierii genetycznej, biologii molekularnej i modelowania komputerowego przekłada się na rozwój nowych bardziej skutecznych metod badawczych, dzięki którym możemy opracowywać czułe i skuteczne narzędzia mające zastosowanie w toksykologii i będące niezwykle pomocne w ocenie mutagenności i genotoksyczności nowych substancji chemicznych (Muster i wsp., 2008; Reifferscheid i wsp., 2008).

2. Alternatywne badania mutagenności i genotoksyczności

Według Europejskiej Konwencji w sprawie ochrony zwierząt kręgowych wykorzystywanych do celów doświadczalnych i innych celów naukowych (Szttrasburg, 18 marzec 1986 r.), człowiek ma moralny obowiązek poszanowania wszystkich zwierząt i należytego brania pod uwagę ich zdolności do odczuwania cierpienia i zapamiętywania. W swoim dążeniu do wiedzy, zdrowia i bezpieczeństwa może przeprowadzać na zwierzętach doświadczenia, jeżeli spodziewa się, że doprowadzą one do poszerzenia wiedzy lub przyniosą korzyści człowiekowi lub zwierzęciu. Projektując badania należy dążyć do ograniczania używania zwierząt doświadczalnych poprzez poszukiwanie środków alternatywnych i zachęcania do ich stosowania (ETS 123).

Inny dokument, dyrektywa 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.U. UE L 276/33 z 20.10.2010) bardzo wyraźnie wskazuje, że obowiązującą przy planowaniu i ocenie dopuszczalności doświadczeń ma być rygorystycznie pojmowana zasada 3R od ang. *replacement, reduction, refinement* czyli zastąpienia, zmniejszenia i doskonalenia. Zasada 3R, jako fundament etycznej dopuszczalności doświadczeń na zwierzętach została sformułowana w 1959 r. przez W. Russella i R. Burcha w pracy „*The Principles of Humane Experimental Technique*” (Russell i Burch, 1959). Oznacza ona zastępowanie doświadczeń na zwierzętach innymi modelami badawczymi, ograniczanie do statystycznie niezbędnej liczby zwierząt wykorzystanych w badaniu oraz doskonalenie metod badawczych w celu złagodzenia bólu, cierpienia i stresu zwierząt doświadczalnych.

Jednocześnie nowa dyrektywa nakazuje by w procesie podejmowania decyzji zezwalającej na procedurę kierować się zasadą *cost-benefit analysis* (analiza kosztów i korzyści), będącą fundamentem etycznej oceny doświadczenia. Polega ona na ważeniu oczekiwanych korzyści naukowych lub poznawczych danej procedury i koniecznej dla ich osiągnięcia „ceny” cierpień i bólu zwierząt (Pietrzykowski, 2011)

Zasada zastąpienia (subsidiarności) polega na tym, że procedura doświadczalna lub naukowa może zostać przeprowadzona tylko wtedy, jeżeli racjonalnie i praktycznie nie jest możliwe wykorzystanie innej zadowalającej z naukowego punktu widzenia metody niewymagającej używania zwierząt (art. 6

ust. 1 konwencji). Praktycznej realizacji tej zasady służy przewidziane zarówno w konwencji, jak i w dyrektywie uznawanie tak dalece, jak to możliwe ważności danych czy wyników doświadczeń przeprowadzonych w innych państwach, aby uniknąć niepotrzebnego powtarzania doświadczeń. W tym też celu utworzono w 1991 r. Europejskie Centrum Walidacji Metod Alternatywnych (ECVAM), które obecnie zyskuje status unijnego laboratorium referencyjnego, mającego koordynować politykę walidacji alternatywnych, wobec użycia zwierząt, metod zdobywania wiarygodnej wiedzy naukowej. Państwa członkowskie mają natomiast obowiązek wspierania Komisji w wyznaczaniu krajowych laboratoriów specjalistycznych dokonujących na zlecenie EURL ECVAM takiej walidacji, a także zapewnić pełne respektowanie danych uzyskanych dzięki zastosowaniu formalnie zwalidowanych metod alternatywnych (<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>).

Zasada zmniejszenia oznacza, że w procedurach doświadczalnych i naukowych należy wykorzystywać, jak najmniejszą ilość zwierząt (art. 4 ust. 2 dyrektywy). Liczbę tę można zredukować poprzez wykonywanie procedur na zwierzętach wielokrotnie o ile nie godzi w dobrostan zwierząt. Z zasadą zmniejszenia wiążą się wprowadzone zarówno w konwencji, jak i w dyrektywie liczne ograniczenia. Po pierwsze do doświadczeń mogą być używane tylko zwierzęta pochodzące z hodowli. Po drugie, istnieje względny zakaz wykorzystywania do doświadczeń zwierząt dzikich, od którego mogą być przewidziane wyjątki w prawie krajowym (art. 21 ust.1 konwencji i art. 9 ust.1 dyrektywy). Po trzecie istnieje względny zakaz wykorzystywania do doświadczeń zwierząt bezdomnych w szczególności psów i kotów, ponieważ cechy zbłąkanych i dziczyńskich zwierząt z gatunków domowych nie są znane, a pozyskiwanie i umieszczanie w ośrodkach zwiększa dystres (stres przewlekły) u takich zwierząt (art. 21 ust. 3 konwencji oraz art. 19 ust.4 dyrektywy).

Zasada doskonalenia polega z kolei na poprawie warunków hodowli, utrzymania zwierząt i opieki nad nimi, jak również metod stosowanych w procedurach, tak aby wszelki potencjalny ból, cierpienie, stres lub trwałe uszkodzenie zostały wyeliminowane lub ograniczone do minimum.

Odnośnie warunków hodowli dyrektywa (załącznik III) w nowy sposób reguluje wymogi dotyczące warunków utrzymywania zwierząt doświadczalnych,

szczegółowo wskazuje nowe, większe wymiary pomieszczeń i klatek wymaganych w celu zapewnienia zwierzętom doświadczalnym znośnych warunków bytowych.

Odnośnie doskonalenia procedur doświadczalnych zasadą jest, że w przypadku dokonywania wyboru pomiędzy procedurami należy preferować metody, które wykorzystują, jak najmniejszą liczbę zwierząt, wykorzystują zwierzęta z najniższą wrażliwością neurofizjologiczną, powodują jak najmniej bólu, cierpienia, stresu lub trwałego uszkodzenia oraz z największym prawdopodobieństwem przyniosą zadowalające wyniki (art. 14 dyrektywy).

W związku z regułą doskonalenia metod (załącznik VIII do dyrektywy) wprowadza się ujednoliconą skalę inwazyjności doświadczeń. Ujednoczenie skali i relatywizacji sposobu kontroli etycznej doświadczenia w zależności od stopnia jego inwazyjności było jednym z najistotniejszych postulatów dotyczących międzynarodowych standardów ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych (Micińska-Bojarek, 2012).

Celem naukowym w zakresie oceny mutagenności i genotoksyczności substancji chemicznych jest rozwój metod alternatywnych, które mogą dostarczyć takiego samego zasobu informacji, co obecnie stosowane testy na zwierzętach, ale które będą oparte na mniejszej ich liczbie, będą powodowały mniejsze cierpienia lub wykluczą całkowicie ich użycie. Zatem, metody alternatywne to nie tylko badania *in vitro* lecz także ulepszone, zmodyfikowane testy *in vivo* (*Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines*, 2015). Metody takie, jeżeli są dostępne i gdy jest możliwe ich zastosowanie, muszą być zawsze brane pod uwagę, przy ocenie mutagenności i genotoksyczności nowych substancji chemicznych.

2.1. Badania *in vitro*

Do oceny aktywności mutagennej i genotoksycznej substancji chemicznych stosowane są różne modele komórkowe (Eastmond i wsp., 2009). Wykorzystywane są zarówno bakterie, grzyby, owady jak i hodowle komórkowe ssaków, w tym człowieka. Taka możliwość istnieje ze względu na uniwersalność DNA jako materiału genetycznego. Z uwagi na fakt, że budowa DNA i zasada tworzenia kodu genetycznego są wspólne dla wszystkich żywych organizmów, wyniki otrzymane przy ocenie działania związku chemicznego na jeden gatunek,

mogą być wykorzystywane przy przewidywaniu możliwości odpowiedzi genetycznej u innego gatunku. Wyniki uzyskane za pomocą testów krótkoterminowych do oceny aktywności mutagennej i genotoksycznej substancji chemicznych mogą posłużyć do przewidywania możliwych skutków genetycznych w komórkach człowieka (Cimino, 2006; Gollapudi i wsp., 2013; MacGregor i wsp., 2015b). Testy te pozwalają wykrywać uszkodzenia DNA, mutacje genowe lub aberracje chromosomowe indukowane przez dany związek chemiczny.

2.1.1. Modele prokariotyczne

Testy z użyciem bakterii są doskonałym narzędziem do badania właściwości mutagennych i genotoksycznych substancji chemicznych (Claxton i wsp., 2001; Fluckiger-Isler i wsp., 2004; Lan i wsp., 2014). Budowa bakterii jest prosta, a ich DNA stosunkowo łatwo dostępne dla związków chemicznych wnikających do komórki. Podlegają one częstym podziałom i dlatego można pozyskać miliony komórek w dość krótkim czasie. Do badań stosuje się szczepy bakteryjne mające zwiększoną wrażliwość na testowane związki chemiczne. Otrzymano je dzięki odpowiednim manipulacjom genetycznym, polegającym m.in. na wprowadzeniu DNA plazmidu zawierającego nowe geny. Skonstruowano w ten sposób wiele nowych szczepów bakteryjnych o zwiększonej przepuszczalności błon komórkowych dla molekuł o dużej masie cząsteczkowej, czy też obniżonej zdolności naprawy uszkodzonego DNA.

Testy bakteryjne dzieli się na trzy klasy wykrywające: mutacje postępujące, mutacje wsteczne oraz reperacje uszkodzeń DNA. W ocenie aktywności biologicznej substancji chemicznych najczęściej stosuje się testy polegające na obserwacji mutacji powrotnych lub wstecznych specjalnie przygotowanych szczepów bakterii. W związku z tym, że szczepy bakteryjne nie posiadają większości enzymów uczestniczących w aktywacji promutagenów, wprowadza się frakcję mikrosomalną wątroby szczurów (frakcja S9), indukowaną wcześniej mieszaniną polichlorowanych bifenyli (Arochlor 1254), fenobarbitalem lub 5,6-benzoflawonem (Mortelmans i Riccio, 2000; Mortelmans i Zeiger, 2000). Frakcja S9 używana jest w celu stworzenia warunków zbliżonych do tych, jakie istnieją w komórkach ssaków. Testowany związek chemiczny po inkubacji z komórkami bakteryjnymi w obecności lub przy nieobecności enzymów frakcji S9 daje

odpowieź w postaci pojawienia się bakteryjnych mutantów, ekspresji określonych genów indukowanych przez czynniki genotoksyczne, zwiększonej śmiertelności komórek pozbawionych określonych systemów reperacji DNA itd.

2.1.2. Modele eukariotyczne

Testy z wykorzystaniem grzybów

W badaniach właściwości mutagennych i genotoksycznych związków chemicznych najczęściej znajdują zastosowanie szczepy drożdży z rodzaju *Saccharomyces* (Abudayyak i wsp., 2015; Bui i wsp., 2015). Pozwalają określić, czy dany związek indukuje mutacje punktowe w DNA jądrowym i mitochondrialnym, czy też powoduje powstawanie aneuploidii chromosomowych, bądź rekombinacji w obrębie genów i pomiędzy genami w wyniku nieprawidłowej mitozy i mejozy.

W przypadku mutacji punktowych wykorzystuje się różne systemy indukcji w komórkach drożdży. Najczęściej używany jest system oparty na indukcji alleli genów regulujących syntezę adeniny. W systemach tych używane są szczepy *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, które w formie niezmutowanej do wzrostu potrzebują aminokwasów (Skoneczna i wsp., 2015).

Proces rekombinacji w komórkach drożdży związany jest z podziałem mitotycznym i mejotycznym (Hanlon i Li, 2015). Drożdże mogą być z dużym powodzeniem wykorzystane do badania zarówno spontanicznych, jak i indukowanych rekombinacji mitotycznych i mejotycznych. Zdecydowanie większe znaczenie w ocenie aktywności mutagennej związków chemicznych mają uszkodzenia mitotyczne. Mogą być wykrywane zarówno rekombinacje pomiędzy genami (mitotyczny *crossing-over*), jak i w obrębie genu (konwersja genowa).

Testy z wykorzystaniem muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*)

Testy z muszką owocową *D. melanogaster* stanowią uzupełnienie testów bakteryjnych (Palermo i Mudry, 2011). Komórki somatyczne i płciowe muszki owocowej znalazły zastosowanie w testach wykrywających mutacje genowe (delecje), aberracje chromosomowe i rekombinacje w tej samej populacji komórek poddanych działaniu związku chemicznego w warunkach *in vivo*. Komórki muszki

owocowej w przeciwieństwie do komórek bakteryjnych nie wymagają obecności frakcji S9 do metabolizowania ksenobiotyków. Obecność enzymów o działaniu zbliżonym do ludzkich pozwala z dużym prawdopodobieństwem przenosić wyniki uzyskane w badaniach z owadami na ludzi (Jacociunas i wsp., 2014; Doganlar i wsp., 2015). Test na obecność recesywnych mutacji letalnych (*sex-linked recessive lethals*, SLRL) służy do wykrywania indukcji zmian genetycznych w dużej części genomu. Procedura umożliwia wykrycie mutacji zarówno punktowych, jak i małych delecji w liniach komórek rozrodczych owadów, w tym mutacji postępowych i mutacji w około 800 *loci* na chromosomie X, co stanowi około 80 % wszystkich *loci* na chromosomie X (Stanić i wsp., 2011). Mutacje w chromosomie X u muszki *D. melanogaster* wyrażają się fenotypowo u samców ze zmutowanym genem. Jeśli mutacja jest letalna, a organizmy są homozygotami, to o jej występowaniu świadczy brak jednej z dwóch klas potomnych samców, zwykle wydawanych przez heterozygotyczne samice. Test SLRL opiera się na wykrywaniu obecności specjalnych markerów i zmienionych chromosomów.

Testy wykorzystujące linie komórkowe

Wśród szeregu metod służących do identyfikacji substancji mutagennych i genotoksycznych ważną rolę odgrywają testy cytogenetyczne (Gajski i wsp., 2014; Watanabe i wsp., 2014; Kayraldız i wsp., 2015). Wynikiem działania większości mutagenów chemicznych są uszkodzenia DNA prowadzące do różnego rodzaju anomalii chromosomowych wykrywanych metodami cytogenetycznymi. Czułym wskaźnikiem uszkodzeń chromosomów jest test wykrywający aberracje strukturalne chromosomów (*Chromosomal aberration test*, CA) oraz test mikrojądrowy (*Micronucleus test*, MN). Testy te są wykonywane na różnych rodzajach komórek izolowanych z organizmów (układy doświadczalne *in vitro*) lub bezpośrednio na ssakach (układ doświadczalny *in vivo*). Wykorzystuje się najczęściej komórki posiadające zdolność do proliferacji *in vivo* (np. szpik kostny, komórki nabłonkowe, komórki płciowe) lub komórki, które poza organizmem mogą się dzielić i namnażać (limfocyty krwi obwodowej, fibroblasty, komórki nabłonkowe zarodków chomika chińskiego – CHO, komórki nabłonkowe płuc chomika chińskiego - V79, komórki nowotworów mysich - L5178Y i inne).

2.2. Badania *in silico*

W procesie optymalizacji struktury związku aktywnego biologicznie duże znaczenie mają obecnie metody wspomagane komputerowo. Wartość metod *in silico* wynika z możliwości ich zastosowania we wczesnych etapach badań, nawet przed zsyntetyzowaniem związku (Toropov i wsp., 2014). Wirtualny skrining bibliotek cząsteczek umożliwia szybkie wybranie spośród tysięcy zaprojektowanych struktur o najbardziej optymalnych właściwościach. Na tym etapie odrzuca się na przykład cząsteczki, w strukturze których znajdują się fragmenty (toksykofory) warunkujące określone działanie toksyczne, tzw. alerty strukturalne (Stark i Steger-Hartmann, 2015). Wysoka sprawność narzędzi *in silico* (możliwość testowania znacznych ilości związków w stosunkowo krótkim czasie) znacznie skraca fazę poszukiwania struktur wiodących. W dalszym etapie syntezy chemicznej podlegają jedynie wyselekcjonowane związki, dla których prawdopodobieństwo odrzucenia w kolejnych fazach testów jest znacznie mniejsze.

Zastosowanie modelowania komputerowego podczas badań nad bezpieczeństwem potencjalnych leków pozwala wskazać obszary wymagające dokładnej oceny *in vivo*, co sprawia, że w badaniach klinicznych testowane są cząsteczki bezpieczniejsze dla pacjentów biorących w nich udział oraz z największą szansą na spełnienie wymogów agencji rejestrujących leki (Valencia i wsp., 2013).

Wraz ze wzrostem znaczenia metod alternatywnych w badaniu bezpieczeństwa leków podejmuje się różne inicjatywy, których jednym z celów jest opracowanie i publikacja toksykologicznych baz danych (<https://eur-lex.europa.eu/jrc/ec.europa.eu>). Istnieje wiele programów o charakterze komercyjnym i dostępnych w ramach licencji zezwalających na bezpłatne korzystanie, w tym za pośrednictwem Internetu, służących do predykcji działań toksycznych (Tabela 1, str. 38). Wykorzystywane m.in. przez przemysł farmaceutyczny techniki komputerowej predykcji toksyczności można podzielić na trzy kategorie (Alam i Lee, 2016; Greene i wsp., 2015):

- modelowanie molekularne
- systemy ekspertowe
- systemy oparte na danych.

Tabela 1. Programy komputerowe służące do przewidywania toksyczności.

Programy komputerowe	Przewidywane działanie	Dostępność
TOPKAT	mutagenne, kancerogenne, drażniące, skórne reakcje uczuleniowe, LD ₅₀ , toksyczność środowiskowa	http://accelrys.com/products/discovery-studio/toxicology/
Lazar	mutagenne, kancerogenne, hepatotoksyczne, toksyczność środowiskowa	http://lazar.in-silico.de/
ToxScope	mutagenne, kancerogenne, teratogenne, drażniące, hepatotoksyczne	www.leadscope.com
DEREK for Windows	mutagenne, kancerogenne, drażniące, skórne reakcje uczuleniowe, i inne (ponad 40)	http://www.lhasalimited.org
HazardExpert	mutagenne, kancerogenne, drażniące, immunotoksyczne, neurotoksyczne, skórne reakcje uczuleniowe	http://www.compudrug.com/
CSGenoTox	mutagenne	www.chemsilico.com
ADMET Predictor	mutagenne, kancerogenne, drażniące, kardiotoksyczne, skórne reakcje uczuleniowe, LD ₅₀ , toksyczność środowiskowa, modulacja receptora estrogenowego i inne	www.simulationsplus.com
OSIRIS Property Explorer	mutagenne, kancerogenne, teratogenne, drażniące	http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/

Modelowanie molekularne obejmuje metody modelujące zdarzenia biochemiczne istotne z punktu widzenia toksyczności (Bulusu i wsp., 2016). Techniki modelowania molekularnego stosowane podczas selekcji, optymalizacji i oceny właściwości ADME cząsteczek wiodących można również wykorzystać do predykcji działań toksycznych, jeżeli w mechanizmie danego efektu pośredniczy receptor (np. cytochrom P450, receptor estrogenowy) i znana jest struktura białka receptorowego. Systemy ekspertowe są oparte na ogólnych regułach wiążących aktywność biologiczną ze strukturą cząstki. Ich podstawą jest usystematyzowana wiedza ekspertów z dziedziny toksykologii oraz interpretacje danych toksykologicznych (Omer i wsp., 2014). Ponadto w tego rodzaju systemach możliwa jest integracja właściwości chemicznych i biologicznych z pomiarów *in vivo* i *in vitro* oraz właściwości cząsteczek uzyskanych doświadczalnie bądź obliczonych. Systemy ekspertowe są stosowane w badaniach nad potencjalnym

lekiem i wykorzystywane do wytypowania substancji, co skutkuje zwróceniem na te molekuly większej uwagi podczas dalszych etapów. Niewątpliwą zaletą systemów eksperckich jest transparentność predykcji (Mousavian i Masoudi-Nejad, 2014). Ponieważ system taki zwykle zbudowany jest z zestawu reguł „jeżeli – to”, stosunkowo łatwo jest zidentyfikować przyczyny i uzasadnienie danej odpowiedzi systemu, co ułatwia zrozumienie i dalszą ocenę przewidzianego efektu. Taka konstrukcja pozwala na łatwe przeszukiwanie bazy danych i uzyskanie potrzebnych informacji.

Systemy oparte na danych (statystyczne, empiryczne) wykorzystują do budowy modeli predykcyjnych dane doświadczalne oraz obliczone ze struktury cząsteczki. Typowym przykładem takiej procedury są zależności (Q)SAR (Braun, 2014). Klasyczna analiza QSAR stosuje techniki regresji, pozwalające opracować na podstawie danych równanie, które może być wykorzystane do przewidywania różnych właściwości dla molekuł o podobnej strukturze i mechanizmie działania. Modele statystyczne są znacznie częściej wykorzystywane niż systemy ekspertowe do predykcji właściwości cząstek. Ponieważ testy oceniające toksyczność są zwykle kosztowne i czasochłonne, techniki zgłębiania danych (*data mining*) zyskały sobie w ostatnich latach znaczną popularność. Należą do nich m.in.: metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS), regresja wieloczynnikowa, metoda wektorów nośnych (SVM), sztuczne sieci neuronowe (Houck i Kavlock, 2008).

Zespoły informatyków we współpracy z firmami farmaceutycznymi i chemicznymi opracowują toksykologiczne bazy danych, tworzą i oceniają techniki zgłębiania danych oraz techniki QSAR, dążąc do stworzenia zestawu narzędzi do oceny efektów (mutagenności, kancerogenności i in.) i dawek toksycznych (Koutkias i Jaulent, 2015). Wyniki modelowania w warunkach *in silico* dla strukturalnie podobnych związków i predykcja efektów toksycznych i klinicznych pozwalają również uniknąć dodatkowych badań.

3. Aspekty prawne badania mutagenności i genotoksyczności

Rozwojem, walidacją, a także koordynacją alternatywnych badań w zakresie mutagenności i genotoksyczności oraz ich wdrożeń zajmują się powstałe w wielu państwach instytucje. Do najważniejszych należą: Laboratorium referencyjne Unii Europejskiej ds. metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach (EURL ECVAM – *European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing*) w państwach Wspólnoty Europejskiej oraz Międzyagencyjny Komitet Koordynacyjny ds. Walidacji Metod Alternatywnych (ICCVAM – *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) w USA. Metody, które przeszły pozytywnie proces walidacji, są zatwierdzane i wdrażane jako wytyczne (TG, *Test Guideline*) przez OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) (Wytyczne OECD) (Pfuhler i wsp., 2009; <http://www.oecd.org/>).

Na stronie internetowej EURL ECVAM (<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>) dostępna jest pełna lista metod alternatywnych zawartych w ustawodawstwie UE (Rozporządzenie Komisji (WE) NR 440/2008, Dz.U. L 142 str. 1-739), zwalidowanych przez EURL ECVAM, lecz nie zawartych jeszcze w ustawodawstwie UE oraz metod w trakcie rozwoju i walidacji. Ponadto organizacja ta stworzyła bazę danych metod alternatywnych EURL ECVAM DataBase Service on Alternative Methods (DB-ALM) (<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>), gdzie dostępne są aktualne, dokładne, techniczne informacje na temat wykonywania testów *in vitro*, ich zastosowania, zalet i wad.

Do metod alternatywnych oceny mutagenności i genotoksyczności zwalidowanych przez EURL ECVAM, lecz nie zawartych jeszcze w ustawodawstwie UE należy test mikrojądrowy *in vitro* (OECD 2014, Test Nr 487). Natomiast test kometowy jest metodą alternatywną w trakcie rozwoju i walidacji. Chociaż zapotrzebowanie na metody alternatywne jest ogromne, to jednak trzeba pamiętać że proces rozwoju, walidacji i implementacji do ustawodawstwa nowej metody alternatywnej jest długi i zajmuje około 8 lat.

Metody alternatywne oceny mutagenności i genotoksyczności zawarte w Rozporządzeniu Komisji (WE) NR 440/ 2008 przedstawiono w Tabeli 2 (str. 41).

Tabela 2. Testy oceny mutagenności i genotoksyczności zgodne z wymogami UE i OECD.

Nazwa testu	Symbol testu wg Rozp. (WE) NR 440/2008	Symbol testu wg OECD Test Guideline
Test mutacji powrotnych <i>Salmonella typhimurium</i> (test Ames)	EU B.13/14.	OECD TG 471
Test mutacji genowych <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EU B.15.	OECD TG 480*
Test mutacji genowych w komórkach ssaków <i>in vitro</i> ^a	EU B.17.	OECD TG 476
Badanie recesywnych mutacji letalnych związanych z płcią <i>Drosophila melanogaster</i>	EU B.20.	OECD TG 477*
Test plamkowy na myszach (mutacje komórek somatycznych <i>in vivo</i>)	EU B.24.	OECD TG 484*
Test mutacji genowych w locus <i>tk in vitro</i> ^b		OECD TG 490
Test mutacji genowych w komórkach somatycznych i rozrodczych zwierząt transgenicznych ^b		OECD TG 488
Test aberracji chromosomowych w komórkach ssaków <i>in vitro</i>	EU B.10.	OECD TG 473
Test aberracji chromosomowych w szpiku kostnym ssaków <i>in vivo</i>	EU B.11.	OECD TG 475
Test mikrojądrowy w erytrocytach ssaków <i>in vivo</i>	EU B.12.	OECD TG 474
Badanie dominujących mutacji letalnych na gryzoniach	EU B.22.	OECD TG 478
Badanie aberracji chromosomowych w spermatogoniach ssaków	EU B.23.	OECD TG 483
Test dziedzicznych translokacji na myszach	EU B.25.	OECD TG 485
Test mikrojądrowy na komórkach ssaków <i>in vitro</i> ^b		OECD TG 487
Test rekombinacji mitotycznych w komórkach <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EU B.16.	OECD TG 481*
Nieplanowa synteza DNA. (Badanie w komórkach ssaków <i>in vitro</i>)	EU B.18.	OECD TG 482*
Test wymiany chromatyd siostrzanych <i>in vitro</i>	EU B.19.	OECD TG 479*
Test nieplanowej syntezy DNA w komórkach wątroby ssaków <i>in vivo</i>	EU B.39.	OECD TG 486
Test kometowy <i>in vivo</i> ^b		OECD TG 489

*Metody badawcze nierekomendowane przez OECD od 2013 r. (zarchiwizowane/usunięte metody badawcze). ^aPo weryfikacji, metoda TG 476 służy tylko do oceny mutacji genowych komórek ssaków w locus *hprt* lub *xprt*. ^bMetody w trakcie walidacji przez EURL ECVAM (<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>).

Nowe wytyczne dotyczące strategii testowania mutagenności i genotoksyczności zaproponowane przez OECD w sierpniu 2015 r. zostały uwzględnione w Tabeli 2 (str. 41) (*OECD Genetic Toxicology Test Guidelines*, 2015). Decyzja o usunięciu niektórych metod badawczych np. testu mutacji genowych w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* została podjęta na podstawie obserwacji, z których wynika, iż metody te są rzadko używane w poszczególnych krajach legislacyjnych oraz w związku z dostępnością nowszych badań wykazujących większą skuteczność w ocenie tych samych efektów końcowych. Ponadto, badania przeprowadzane w komórkach ssaków są szczególnie wskazane przy ocenie mutagenności i genotoksyczności ksenobiotyków, gdyż bardziej przybliżają nas do procesów mających miejsce w organizmie człowieka.

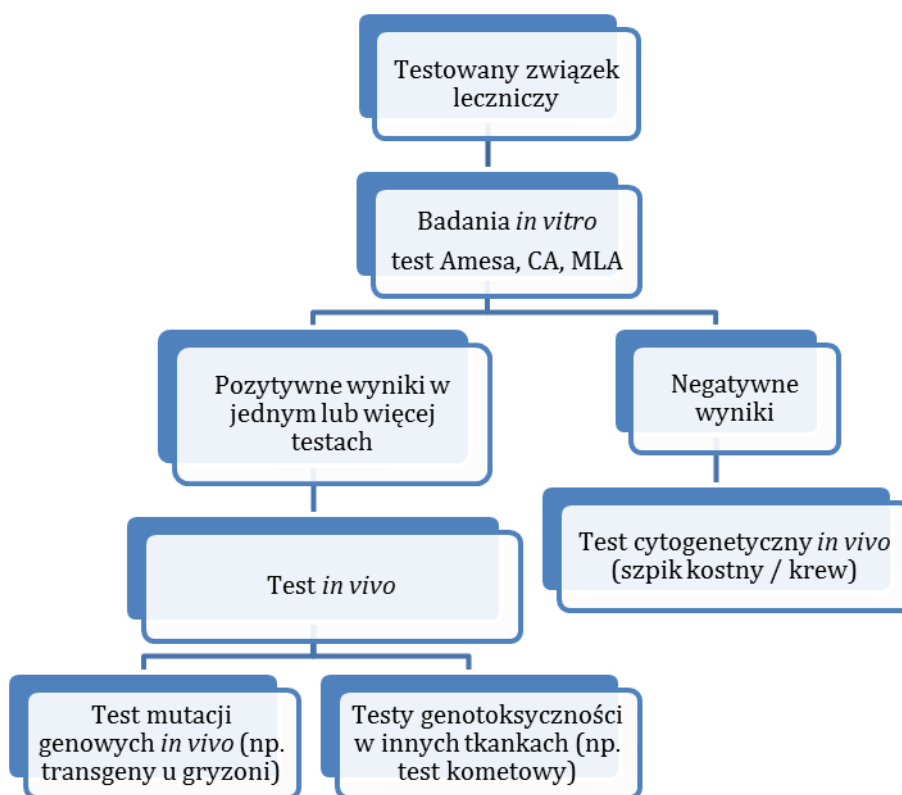
3.1. Algorytm badania mutagenności i genotoksyczności w UE

Zgodnie z wytycznymi OECD substancje chemiczne przed wprowadzaniem na rynek wymagają kompleksowej oceny aktywności mutagennej i genotoksycznej. Żaden pojedynczy test nie jest w stanie wykryć wszystkich istotnych czynników mutagennych i genotoksycznych (Cimino, 2006; Eastmond i wsp., 2009).

Uważa się, że za indukcję somatycznych (włączając kancerogenezę) oraz dziedzicznych defektów są odpowiedzialne mutacje genowe albo aberracje chromosomowe. Ksenobiotyki mogą indukować więcej niż jedną zmianę w materiale genetycznym. Zatem, ocena potencjalnej mutagenności i genotoksyczności związków chemicznych powinna opierać się na zestawie testów obejmujących obserwację zmian na poziomie genowym i chromosomowym (Cao i wsp., 2014; Gollapudi i wsp., 2013; Johnson i wsp., 2014; MacGregor i wsp., 2015a).

Opracowana przez Międzynarodową Konferencję ds. Harmonizacji (ICH Guideline S2(R1), 2011) strategia wykonywania badań genotoksyczności i mutagenności potencjalnych substancji leczniczych (dla przemysłu farmaceutycznego) ma na celu ujednoczenie naukowych i technicznych aspektów rejestracji produktów leczniczych. ICH dąży do zmniejszenia lub wyeliminowania konieczności powtarzania testów przeprowadzonych w trakcie badań nad poszukiwaniem i rozwojem nowych leków, poprzez zalecanie sposobów

osiągnięcia większej harmonizacji w zakresie interpretacji i stosowania wytycznych technicznych oraz wymagań dotyczących rejestracji produktu.



Rycina 9. Schemat strategii badań genotoksyczności i mutagenności potencjalnych substancji leczniczych. CA – test aberracji chromosomowych w komórkach ssaków *in vitro*; MLA – test mutacji genu kinazy tymidynowej w komórkach chłoniaka myszy). Opracowano na podstawie ICH Guideline S2(R1), 2011.

Harmonizacja ma na celu doprowadzenie do bardziej oszczędniejszego wykorzystania zasobów ludzkich, zwierząt i środków, oraz eliminacji zbędnych opóźnień w rozwoju i dostępności nowych leków, przy zachowaniu gwarancji jakości, bezpieczeństwa i skuteczności oraz poszanowaniu regulacji ochrony zdrowia publicznego (ICH Guideline S2(R1), 2011). Strategię testowania genotoksyczności i mutagenności zgodnie z wytycznymi ICH przedstawiono na schemacie (Rycina 9, str. 43).

3.2. Testy alternatywne *in vitro* genotoksyczności i mutagenności

3.2.1. Testy rekomendowane przez UE i OECD

Test Ames (test rewersji mutacji w komórkach bakteryjnych; EU B.13/14.)

W teście Ames wykorzystuje się odpowiednio skonstruowane szczepy *Salmonella typhimurium*, zawierające różne mutacje w operonie histydyny (auksotroficzne mutanty o fenotypie *his*⁻). Mutanty *his*⁻, na skutek utraty zdolności syntezy histydyny, nie są zdolne do wzrostu na pożywce minimalnej, pozbawionej L-histydyny (Maron i Ames, 1983). Zdolność do wzrostu na pożywce bez histydyny może zmutowanym komórkom bakteryjnym przywrócić mutacja powrotna (rewersja) do form protroficznych o fenotypie *his*⁺. W teście Ames określa się zdolność do wywoływania przez badaną substancję chemiczną mutacji powrotnych czyli rewersji.

Ponadto, do szczepów testowych wprowadzana została mutacja *rfa* zwiększająca przepuszczalność błony komórkowej w wyniku zmiany jej składników lipopolisacharydowych oraz delecja $\Delta uvrB$ zmniejszająca zdolność naprawy materiału genetycznego poprzez wycinanie uszkodzonych fragmentów i zastępowanie ich prawidłowymi. Z przyczyn technicznych oprócz genu *uvrB* wycięto również dwa geny: gen kodujący syntezę biotyny (gen *bio*), co spowodowało, że bakterie potrzebują do wzrostu także biotyny, oraz gen kodujący reduktazę nitrową (gen *chl*) (Maron i Ames, 1983; Mortelmans i Zeiger 2000). Plazmid pKM101 (czynnik R) warunkuje oporność bakterii na ampicylinę oraz zawiera gen *mucAB*, który powoduje stymulację systemu błędnej naprawy DNA. Plazmid pKM101, zwiększa czułość szczepów testowych na wykrywanie mutacji indukowanych przez nitrowe i aminowe pochodne wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA). W Tabeli 3 (str. 45) przedstawiono charakterystykę szczepów *S. typhimurium* rekomendowanych w testowaniu mutagenności.

W przypadku mutagenów nie działających bezpośrednio, wymagana jest ich metaboliczna aktywacja. Najczęściej w tym celu stosuje się frakcję S9, otrzymywaną z homogenatów wątroby szczurów poddanych działaniu Arochloru 1254 (mieszanina polichlorowanych bifenyli).

W teście wykorzystuje się kilka szczepów bakteryjnych, ze względu na ich zróżnicowaną podatność na czynniki mutagenne. Do rutynowych badań przesiewowych zaleca się stosowanie, co najmniej pięciu szczepów bakteryjnych (Mortelmans i Zeiger, 2000):

- *S. typhimurium* TA1535
- *S. typhimurium* TA1537 lub TA97
- *S. typhimurium* TA98
- *S. typhimurium* TA100
- *E. coli* WP2 *uvrA* lub *E. coli* WP2 *uvrA* (pkM101) lub *S. typhimurium* TA102

Tabela 3. Charakterystyczne mutacje szczepu *S. typhimurium* (Mortelmans i Zeiger, 2000).

Szczep	Miejsce mutacji	Typ mutacji	Mutacje dodatkowe		
			LPS	Naprawa DNA	Plazmid
TA1535	<i>hisG46</i>	podstawienie pary zasad	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	-
TA100	<i>hisG46</i>	podstawienie pary zasad	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	pKM101
TA1538	<i>hisD3052</i>	przesunięcie ramki odczytu	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	-
TA98	<i>hisD3052</i>	przesunięcie ramki odczytu	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	pKM101
TA1537	<i>hisC3076</i>	przesunięcie ramki odczytu	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	-
TA97	<i>hisO1242</i>	przesunięcie ramki odczytu	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	pKM101
TA102	<i>hisG428</i>	tranzycje, transwersje, małe delecje	<i>rfa</i>	szczep dziki	pKM101 pAQ1

Szczepy *S. typhimurium* TA1537, TA97 i TA98 są wrażliwe na działanie mutagenów wywołujących mutacje typu zmiany ramki odczytu, zaś szczepy TA1535 i TA100 pozwalają wykryć mutageny wywołujące mutacje typu zamiany pary zasad. Szczepy *S. typhimurium* TA97, TA98, TA100 w wyniku delekcji genu kodującego enzymy wycinające dimery pirymidynowe (*uvrB*) umożliwiają stwierdzenie indukcji uszkodzeń, które są usuwane przez ten system naprawy. w szczepie *S. typhimurium* TA102 w miejscu zapisu rewersji znajduje się mutacja *ochre* (kodon stop). Szczep ten, w porównaniu do innych szczepów testowych, jest bardziej wrażliwy na działanie związków utleniających, takich jak aldehydy i ketony. Szczep TA102 umożliwia ponadto wykrycie związków chemicznych wywołujących wiązania krzyżowe w DNA (Mortelmans i Riccio, 2000). Obecnie wprowadzono do badań nowe szczepy YG1012, YG1021, YG1024 *S. typhimurium* oraz NM 2009 *S. typhimurium* charakteryzujące się zwiększoną aktywnością O-

acetylotransferazy. Są one bardziej czułe na działanie heterocyklicznych amin aromatycznych oraz ich pochodnych. Drugą grupą nowych szczepów są TA 98NR i TA 98/1-DNP6 o zwiększonej aktywności nitroreduktazy. Można dzięki nim wykryć aktywność mutageną nitrowych i aminopochodnych węglowodorów aromatycznych (Gee i wsp., 1998).

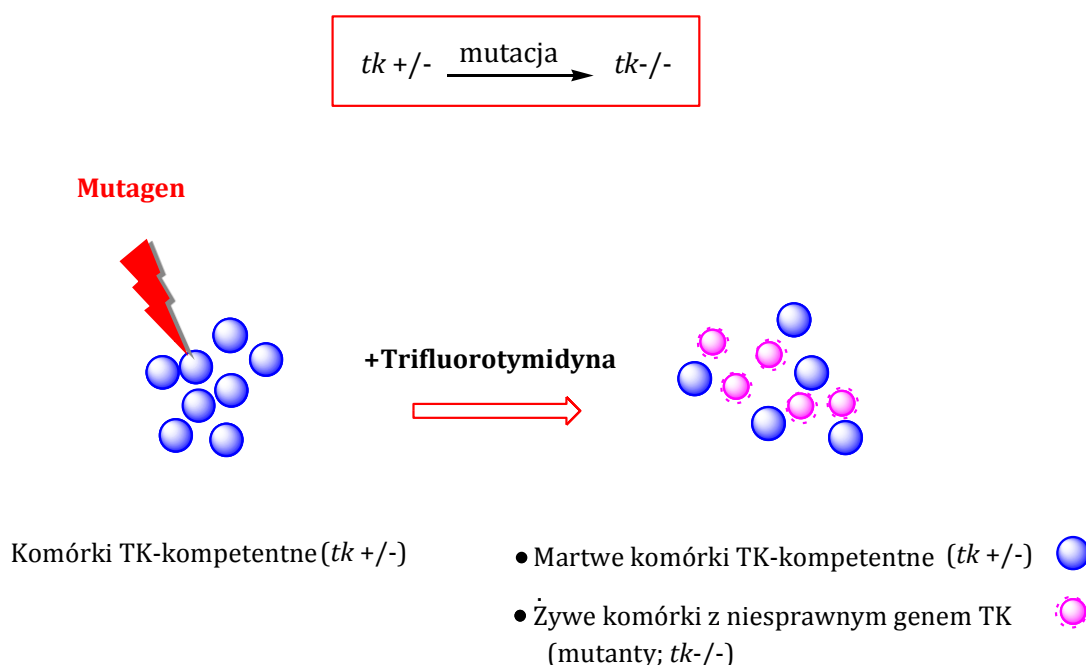
Test mutacji genowych w komórkach ssaków (EU B.17.)

Testy *in vitro* mutacji genowych w komórkach ssaków pozwalają na określenie częstości występowania mutacji punktowych w określonych genach w różnych komórkach ssaków. Do badań substancji chemicznych najczęściej stosuje się: komórki chłoniaka myszy L5178Y, linie komórek świnki morskiej CHO, CHO-AS52 i V79 oraz ludzkie komórki limfoblastyczne TK6 (OECD 2015, Test Nr 476). W komórkach tych bada się częstość mutacji w *locus* kinazy tymidynowej (TK), fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (HPRT) oraz fosforybozylotransferazy ksantynowo-guaninowej (XPRT). Systemy identyfikujące mutacje genów *tk* i *hprt* pozwalają wykryć mutacje typu zmiany zasady, zmiany ramki odczytu oraz małe delecje. Natomiast, autosomalne umiejscowienie genów *tk* i *xprt* pozwala na wykrycie zaburzeń genetycznych (np. dużych delecji) niemożliwych do wykrycia przy użyciu genu *hprt* umiejscowionego na chromosomie X (Johnson, 2012). W testach tych wykorzystuje się hodowle komórek rosnących na podłożach selekcyjnych. Podłoża te zawierają związek toksyczny lub antymetabolit (nazywany czynnikiem selekcyjnym), działający toksycznie na wszystkie komórki, poza mutantami. W tych warunkach tylko zmutowane komórki przeżywają i tworzą kolonie.

Test mutacji genu kinazy tymidynowej (OECD 2015, Test Nr 490) wykonywany jest przy użyciu komórek chłoniaka myszy L5178Y *tk*^{+/-} (*Mouse T cell Lymphoma*). W teście stosowany jest umiejscowiony autosomalnie gen kinazy tymidynowej (*tk*), będący reporterem mutacji powstałych pod wpływem badanego związku.

Metoda polega na hodowaniu komórek w podłożach selekcyjnych, zawierających czynnik działający toksycznie na wszystkie komórki nie będące mutantami. Enzym kinaza tymidynowa (TK) umożliwia wbudowywanie tymidyny i jej toksycznych analogów ze źródeł egzogennych do komórki. Dodanie

trifluorotymidyny (TFT) do medium hodowlanego pozwala na selekcję mutantów homo- i heterozygotycznych. Komórki, w których zaszła mutacja $tk^{+/-} \rightarrow tk^{-/-}$ nie produkują aktywnego enzymu TK i są odporne na cytotoksyczne działanie TFT będącej analogiem pirymidyny (Rycina 10). Komórki ze sprawnym genem tk są wrażliwe na TFT, która hamuje metabolizm komórkowy i powstrzymuje dalszy podział komórki. Zmutowane komórki posiadają zdolność proliferacji w obecności TFT, w odróżnieniu od prawidłowych komórek zawierających TK (Maisanaba i wsp., 2015). Test mutacji genu tk umożliwia wykrycie zarówno aberracji chromosomowych jak i mutacji punktowych.

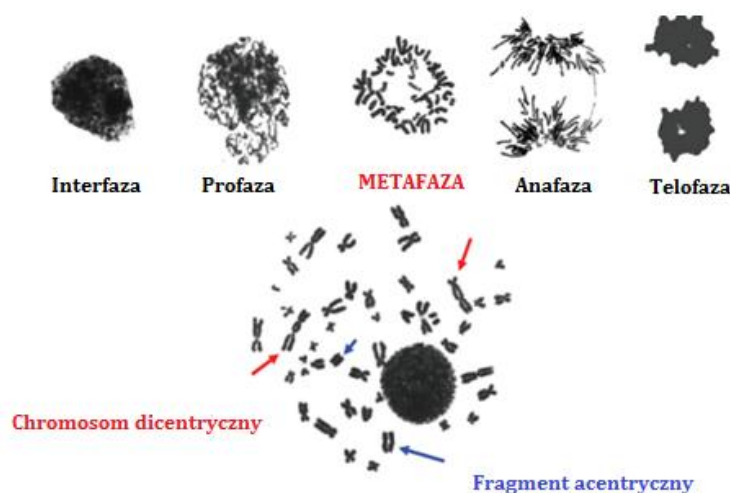


Rycina 10. Badanie *in vitro* mutacji genowych komórek ssaków (Guo i wsp., 2015).

Test aberracji chromosomowych w komórkach ssaków (EU B.10.)

Cytogenetyczną metodą stosowaną do wykrywania czynników mutagennych i genotoksycznych jest test strukturalnych aberracji chromosomowych (OECD 2014, Test Nr 473). W teście tym wykorzystuje się właściwości klastogenne (zdolność do łamania chromosomów) badanych mutagenów. Złamania w chromosomach mogą zostać utrwalone i na skutek interakcji złamanych odcinków przekształcone w różne, nieprawidłowe konfiguracje.

Obserwuje się aberracje typu chromosomowego, gdy uszkodzenia obejmują dwie chromatydy danego chromosomu metafazowego i typu chromatydowego, gdy uszkodzenia dotyczą jednej chromatydy. W przypadku aberracji chromosomowych mutageny działały w fazie G_1 lub G_0 , a więc przed fazą replikacji materiału genetycznego. W przypadku aberracji chromatynowych mutageny działały w późnej fazie S lub G_2 , a więc po replikacji materiału genetycznego (Fei i wsp., 2015).



Rycina 11. Analiza aberracji strukturalnych w stadium metafazy (<http://ghr.nlm.nih.gov/>).

Uszkodzenia chromosomów można obserwować i analizować w dzielących się komórkach w stadium metafazy (Rycina 11). Jest to etap cyklu komórkowego, w którym DNA występuje w formie skondensowanej, zespiralizowanej tworząc rozróżnialne chromosomy podzielone na dwie chromatydy spięte centromerem.

Materiałem do testu w warunkach *in vitro* mogą być różne rodzaje komórek np. limfocyty krwi obwodowej, fibroblasty, trofoblasty lub komórki płynu owodniowego.

Test nieplanowanej syntezy DNA (EU B.18.)

Test nieplanowanej syntezy DNA (UDS) pozwala wskazać genotoksyczne substancje chemiczne, indukujące naprawę uszkodzeń w materiale genetycznym (OECD 1986, Test Nr 482). W teście UDS używane są najczęściej fibroblasty ludzkie, komórki CHO lub linie transformowanych komórek ludzkich (HeLa).

Mechanizm usuwania uszkodzeń w UDS polega na wycięciu fragmentu DNA z jednej nici podwójnej helisy, a następnie zastąpieniu nukleotydami nie uszkodzonego DNA, dzięki możliwości użycia przeciwległych nici jako matrycy i włączenia nowo utworzonego fragmentu do poprzednio istniejącej nici. Proces ten nazwano reperacją wyciętego miejsca i odbudową cząsteczek DNA. Nieplanowana synteza DNA różni się od semikonserwatywnej replikacji DNA w fazie S cyklu komórkowego *Eucaryota* (Doida i Miller, 1992). Jest to bowiem synteza DNA mająca miejsce jedynie podczas reperacji uszkodzonego odcinka i zachodzi w całym genomie niezależnie od syntezy DNA przed podziałem komórkowym. W procesie tym dochodzi do tworzenia adduktów DNA z badanym związkiem lub ewentualnym metabolitem. Endonukleaza wycina uszkodzone odcinki DNA, a polimerazy uzupełniają wycięte fragmenty. Poziom syntezy reperacyjnej zależy od typu uszkodzenia, czy też wielkości reperowanego odcinka DNA (Le Hégarat i wsp., 2004).

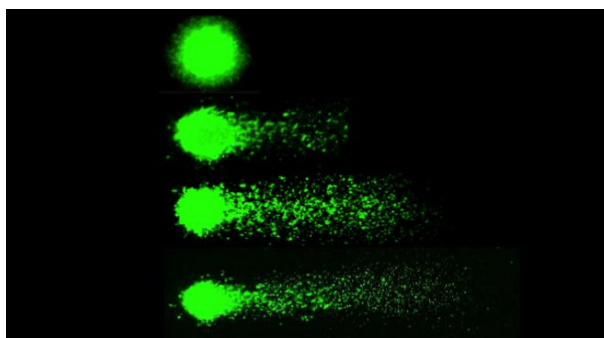
3.2.2. Pozostałe testy *in vitro* do oceny genotoksyczności i mutagenności

Test kometowy

Podstawową metodą analizy stopnia fragmentacji DNA na skutek działania czynników genotoksycznych jest elektroforeza żelowa pojedynczych komórek (*single cell gel electrophoresis*) nazywana testem kometowym (*Comet assay*) (OECD 2014, Test Nr 489). Metoda ta identyfikuje jednoniciowe i dwuniciowe pęknięcia DNA oraz wszelkie modyfikacje chemiczne (miejsca apurynowe, niestabilne addukty) i enzymatyczne (uszkodzenia oksydacyjne), które mogą przekształcić się w pęknięcia. Test kometowy daje możliwość detekcji uszkodzeń DNA na poziomie pojedynczej komórki umożliwia określenie wrażliwości na określony czynnik genotoksyczny, a także sprawność naprawy uszkodzeń (Hoff Brait i wsp., 2015; Yujra i wsp., 2015).

Materiałem wykorzystywanym do badania mogą być wszystkie rodzaje komórek eukariotycznych lub fragmenty tkanek, z których można uzyskać zawiesinę. Stopień uszkodzenia DNA, któremu towarzyszy jego fragmentacja, ocenia się w wybarwionych preparatach poprzez analizę obrazów w mikroskopie fluorescencyjnym (Rycina 12). Są to charakterystyczne obrazy „komet”

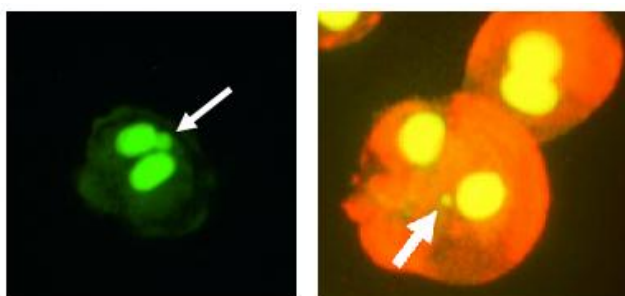
z wyodrębnionymi w nich „głowami” i „ogonami”. „Głowa” to miejsce unieruchomienia komórki przed lizą, „ogon” to uszkodzone fragmenty DNA. Miarą poziomu uszkodzeń DNA jest długość ogona i ilość zawartego w nim DNA (Sowmithra i wsp., 2015; Girardello i wsp., 2016). Szybkość i łatwość wykonania testu, jego czułość i możliwość stosowania dowolnych komórek eukariotycznych oraz nieinwazyjność sprawiają, że może być wykorzystany do wstępnego badania właściwości genotoksycznych ksenobiotyków. Nie jest to jednak szeroko stosowany test, wymaga bowiem opracowania jednolitej procedury stosowanej we wszystkich laboratoriach na całym świecie, co pozwoli na porównywanie wyników według jednakowych parametrów.



Rycina 12. Obraz komet uzyskany w mikroskopie fluorescencyjnym. Uszkodzenia materiału genetycznego pod wpływem czynnika genotoksycznego powodują szybszą migrację DNA w polu elektrycznym, co po wybarwieniu nadaje jądra komórkowemu kształt komety, której głową jest pozostałość jądra, a ogonem rozciągnięte w wyniku elektroforezy fragmenty DNA (Saska i wsp., 2015).

Test mikrojądrowy *in vitro*

W warunkach *in vitro* test mikrojądrowy wykonywany jest w obecności cytochalazyny B (bloker cytokinezy) przy użyciu linii komórkowej CHO-K1 (komórki jajnika chomika chińskiego), wskazanej przez wytyczną OECD 487. Zastosowanie cytochalazyny B – czynnika, który blokując mitotyczną cytokinezę hamuje powstanie bruzdy podziałowej, pozwala na analizę mikrojąder w komórkach, które ukończyły pierwszy podział po rozpoczęciu hodowli *in vitro* (komórki dwujądrzaste) oraz umożliwia akumulację wszystkich komórek dwujądrzastych (Rycina 13, str. 51) bez względu na stopień synchronizacji w cyklu komórkowym i rozmiar populacji dzielących się komórek aż do skończenia hodowli (Randa i wsp., 2008; Hatzi i wsp., 2015).



Rycina 13. Dwujądrowe komórki zawierające mikrojądro (<http://reconstructed-human-epidermis.com/epics/genotox/>).

Barwienie kinetochorów lub barwienie centromerów techniką FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) pozwala na rozpoznanie czy mikrojądro zostało utworzone przez fragment centryczny oderwany od jednej bądź obu chromatyd, czy też utworzone zostało przez cały chromosom (Rastkhah i wsp., 2016).

Test SOS/*umu*

Test SOS/*umu* opiera się na zdolności indukcji ekspresji genu *UmuC* w operonie SOS przez czynniki uszkodzające DNA. W teście wykorzystuje się szczep bakterii *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 (Oda i wsp., 1985). Gen *UmuC*, w powiązaniu z innymi indukowalnymi genami *recA*, *lexA* i *UmuD* odpowiada za tzw. mutagenezę bakteryjną, nazywaną procesem reperacji SOS. Indukcja genu *UmuC*, połączonego w funkcjonalną całość z genem *LacZ*, mierzona jest poziomem aktywności wewnątrzkomórkowej β -galaktozydazy, przy jednoczesnej delecji naturalnego regionu *LacZ* w genomie bakteryjnym (Reifferscheid i wsp., 1991; Powroźnik i wsp., 2015). Zwielenkrotnienie układu *UmuC-LacZ* na licznych kopiach plazmidu pSK1002 znacznie przyspiesza odpowiedź i nadaje szczepowi testowemu wysoką czułość. Ponadto, w celu uwrażliwienia na genotoksyny, szczep testowy zawiera dodatkowe modyfikacje genetyczne: mutację *rfa* zwiększającą przepuszczalność błony lipopolisacharydowej, co ułatwia genotoksynom penetrację do środka komórki bakteryjnej oraz delecję regionu *uvrB* skutkującą utratą możliwości naprawy genomu poprzez wycinanie źle sparowanych zasad.

SOS-Chromotest

Zasada testu opiera się na uruchomieniu procesu naprawy DNA, zwanego systemem SOS, w komórkach bakterii *Escherichia coli* K12 PQ37 (Kaur i wsp., 2012; Kocak, 2015). Jego uruchomienie wskazuje na uszkodzenie DNA. W systemie naprawy SOS kluczową rolę odgrywają dwa geny: *lexA* kodujący represor dla wszystkich genów systemu SOS (ponad 15 znanych) i *recA* kodujący białko zdolne do przecinania represora *lexA*. Miarą genotoksyczności jest aktywność β -galaktozydazy, której gen strukturalny połączony jest z genem *sfiA* (*sfiA*;*lacZ*). Aktywność β -galaktozydazy jest ściśle zależna od ekspresji genu *sfiA*. Ponadto szczep używany do badań pozbawiony jest systemu naprawy przez wycinanie uszkodzeń DNA – *uvrA* oraz posiada mutację *rfa* zwiększającą przepuszczalność błony komórkowej dla dużych cząsteczek związków organicznych (Sharma i wsp., 2015). Konstytutywna synteza fosfatazy alkalicznej, pozwala na ocenę toksyczności badanych związków. Według danych literaturowych (McDaniels i wsp., 1990) zgodność SOS-Chromotestu z testem Ames jest bardzo duża. Spośród 83 związków chemicznych zbadanych za pomocą testu Ames wykazano mutagenność dla 78 %, a testem SOS dla 75 % badanych substancji. Uważa się, że SOS-Chromotest, dostępny w zestawach do szybkich badań mutagenności, daje mniej fałszywych dodatnich wyników niż test Ames.

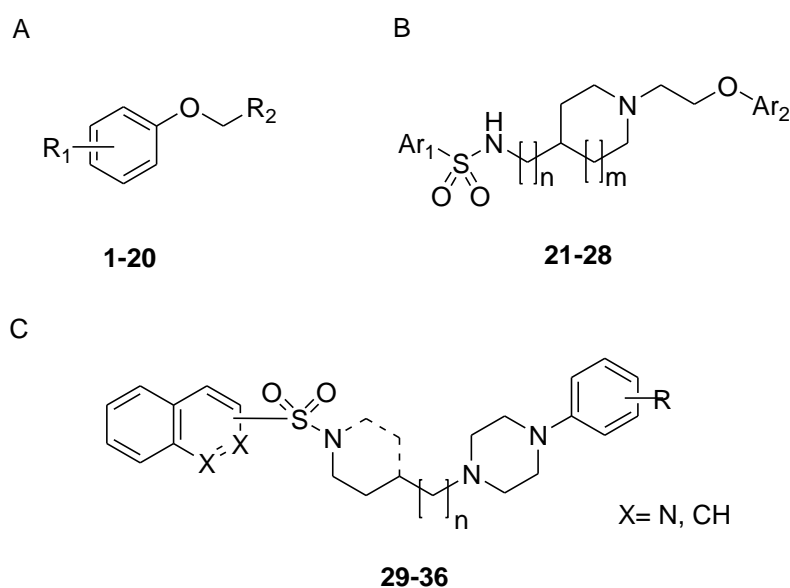
II Założenia i cel pracy

Ocena właściwości mutagennych i genotoksycznych jest jednym z obowiązkowych etapów postępowania przy wprowadzaniu do badań klinicznych nowych substancji o potencjalnym działaniu terapeutycznym. Wzrost wymagań, stawianych nowym lekom przez agencje rejestrujące (FDA, EMA) dotyczących bezpieczeństwa, skutkuje zwiększoną liczbą cząsteczek odrzucanych na kolejnych etapach rozwoju, a co za tym idzie zwiększeniem kosztów wprowadzenia nowego leku na rynek. Istnieje więc potrzeba stosowania technik i narzędzi umożliwiających odrzucenie takich cząsteczek na możliwie wczesnym etapie poszukiwania nowego leku (Cimino i wsp., 2006; MacGregor i wsp., 2015). Możliwość zastosowania szybkich i tanich testów mikrobiologicznych oraz modeli komputerowych do wstępnej oceny potencjalnych kancerogenów i mutagenów, stanowi cenną alternatywę dla badań na zwierzętach (Muster i wsp., 2008; Gollapudi i wsp., 2013). Ważnym argumentem przemawiającym za szeroką i wciąż rosnącą gamą modeli realizowanych w warunkach *in silico* oraz *in vitro* są względy humanitarne-etyczne wskazujące na konieczność uzyskania maksymalnej możliwej redukcji doświadczeń przeprowadzanych na zwierzętach oraz optymalizacja koniecznych badań prowadzonych z udziałem ludzi.

Jak już wspomniano we Wstępie, do oceny działania mutagennego i genotoksycznego substancji chemicznych opracowano szereg testów, które przeprowadza się na różnych organizmach, począwszy od komórek bakteryjnych, a skończywszy na hodowlach komórkowych ssaków, w tym człowieka (Erickson, 2010). Taka możliwość istnieje ze względu na uniwersalność DNA, jako materiału genetycznego. Z uwagi na fakt, że budowa DNA i zasada tworzenia kodu genetycznego są wspólne dla wszystkich żywych organizmów, wyniki otrzymane przy ocenie działania związku chemicznego na jeden gatunek, mogą posłużyć do przewidywania możliwych skutków genetycznych w komórkach człowieka (MacGregor i wsp., 2015a).

Celem projektu obejmującego pracę doktorską jest przeprowadzenie badań szacujących właściwości mutagenne i genotoksyczne dla 36 nowych związków chemicznych o ustalonej aktywności w ośrodkowym układzie nerwowym wybranymi metodami *in silico* oraz *in vitro*.

Pierwsza grupa badanych związków obejmuje 20 chiralnych i achiralnych pochodnych różnych aroksyalkiloaminoalkanoli (**1-20**, Rycina 14), których aktywność przeciwdrgawkowa została potwierdzona w badaniach farmakologicznych *in vivo* wykonanych w ramach Programu Rozwojowego Leków Przeciwpadaczkowych (*Antiepileptic Drug Development Program, ADD*) realizowanego w amerykańskim Narodowym Instytucie Zdrowia (NIH) w Rockville. Związki **1-20** zostały poddane skringowi w teście maksymalnego elektroszoku (MES) i teście pentetrazolowym (scMet) oraz badaniom neurotoksyczności w teście pręta obrotowego u myszy po podaniu dootrzewnowym (Waszkielewicz i wsp., 2015). Dla najbardziej aktywnych związków zostały wyznaczone wartości ED₅₀ oraz TD₅₀. Ponadto niektóre pochodne wykazywały aktywność w innych zwierzęcych modelach drgawek, takich jak test 6-Hz, model drgawek indukowanych pilokarpiną, czy też model drgawek rozniecanych u szczurów.



Rycina 14. Pochodne (A) aroksyalkiloaminoalkanoli (**1-20**), (B) sulfonamidowych pochodnych aryloksyetylo amin alicyklicznych (**21-28**) oraz (C) sulfonamidowych pochodnych arypiprazolu (**29-36**).

Drugą grupę badanych związków stanowi 16 nowych połączeń, które są sulfonamidowymi pochodnymi aryloksyetylo amin alicyklicznych (**21-28**) oraz sulfonamidowymi pochodnymi arypiprazolu (**29-36**) o wieloreceptorowym mechanizmie działania; wykazujących potencjał terapeutyczny w leczeniu

afektywnych schorzeń typu depresyjnego, lękowego oraz schorzeń psychotycznych (Zajdel i wsp., 2012a,b; Zajdel i wsp., 2013; Zajdel i wsp., 2015). Przedstawiciele tej serii pochodnych, wykazywali wysokie powinowactwo do receptorów 5-HT₇ i cechy antagonistów tych miejsc wiążących i równocześnie mieszany profil receptorowy 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}/5-HT₇ oraz 5-HT_{2A}/5-HT₇, także aktywność antagonistyczną do postsynaptycznych receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} i D₂. Struktury ogólne związków **21-36** przedstawiono na Rycinie 14 (str. 55).

W ramach realizacji zadań badawczych zaplanowano ocenę przydatności mikrobiologicznego testu *Vibrio harveyi* do szybkiej skryningowej oceny aktywności mutagennej nowych związków chemicznych o potencjale terapeutycznym.

W ramach pracy zostaną podjęte także próby zmierzające do opracowania testu mutagenności *Vibrio harveyi* w formie mikropłytki. Obecnie referencyjny test Amesa szacujący właściwości mutagenne jest również wykonywany w takiej formie, ponieważ mikrometody stały się nowym, standardowym obliczem nowoczesnej biologii molekularnej, biotechnologii oraz biochemii.

Ze względu na prostą możliwość modyfikacji metodyki testu Amesa oraz *Vibrio harveyi*, zaplanowano także oznaczenie aktywności antymutagennej badanych związków.

Przedstawione cele rozprawy doktorskiej zostaną zrealizowane w oparciu o szczegółowy plan pracy, na który składa się:

1. ocena potencjału mutagennego badanych grup związków **1-36** metodami *in silico* z wykorzystaniem programu komputerowego OSIRIS Property Explorer;
2. ocena potencjału mutagennego związków **1-36** metodami *in vitro* z wykorzystaniem:
 - a) referencyjnego testu Amesa
 - b) testu *Vibrio harveyi*
 - c) testu *Vibrio harveyi* w wersji mikropłytkowej;
3. ocena potencjału genotoksycznego związków **3-5, 7-12, 14-28** przy użyciu mikropłytkowego testu SOS/*umu*;
4. oznaczanie potencjału antymutagennego związków **1-36** w zmodyfikowanym teście:
 - a) Amesa

b) *Vibrio harveyi*

Wydaje się, że w ten sposób zaplanowane badania mutagenności i genotoksyczności pozwolą na racjonalny wybór spośród badanych związków (**1-36**) kandydatów o właściwym profilu bezpieczeństwa do dalszych testów przedklinicznych i klinicznych.

III Materiały i metody

1. Materiały

1.1. Badane związki

Związki **1-20**, zostały zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJ CM.

Związki **21-36**, zsyntetyzowano w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM.

1.2. Szczepy bakteryjne

Salmonella typhimurium TA100 [*hisG46 rfa* Δ (*bio chlD uvrB*), pKM101], szczep otrzymano z Zakładu Genetyki i Mutagenyzy Narodowego Instytutu Higieny, Tokio, Japonia.

Szczep *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002, szczep komercyjny z Xenometrix AG, Szwajcaria.

Vibrio harveyi: BB7, BB7M, BB7X i BB7XM (Tabela 4), szczepy otrzymano z Katedry Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego.

Tabela 4. Charakterystyka szczepów testowych *V. harveyi* (Czyż i wsp., 2000).

Szczep	Charakterystyka
BB7	szczep dziki
BB7M	otrzymany w wyniku transformacji BB7 plazmidem pAB91273*
BB7X	poходna BB7, nadwrażliwa na światło UV, mutant insercyjny w genie <i>cgtA</i> (ozn. <i>cgtA:Tn5TpMCS</i>)
BB7XM	otrzymany w wyniku transformacji BB7X plazmidem pAB91273*

*Plazmid pAB91273 zawiera gen *mucAB*, który warunkuje mutagenezę zależną od systemu błędnej naprawy DNA i jednocześnie oporność bakterii na ampicylinę.

1.3. Składniki pożywek i odczynniki

Agar	Merck
Azydek sodu	Sigma-Aldrich
Bulion odżywczy Oxoid Nr 2	Argenta
Chlorek sodu (NaCl)	Chempur
D-biotyna	Sigma-Aldrich

Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Merck
Diwodorofosforan sodu (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich
Ekstrakt wołowy	Merck
Glicerol	Pharma Cosmetic
Glukoza	Sigma-Aldrich
Kwas cytrynowy	Sigma-Aldrich
L-histydyna HCl	Sigma-Aldrich
4-nitro- <i>O</i> -fenylenodiaminy (4-NPD)	Sigma-Aldrich
Neomycyna	Pharma Cosmetic
<i>N</i> -tlenek-4-nitrochinoliny (NQNO)	Merck
Pepton	Merck
Siarczan magnezu (MgSO_4)	Sigma-Aldrich
Woda do badań molekularnych	5Prime
Wodorofosforan potasu (K_2HPO_4)	Sigma-Aldrich
Wodorofosforan sodowo-amonowy ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$)	Sigma-Aldrich
Wodorofosforan sodu (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich

1.4. Materiały laboratoryjne

Kuweta polistyrenowa SEMIMIKRO do spektrofotometru	Greiner
Mikropłytki typ pureGrade S, 96-dołkowe	Merck
Szalki Petriego (60 × 15 mm)	Greiner

1.5. Komercyjne zestawy testowe

UmuC Easy CS	Xenometrix
--------------	------------

1.6. Aparatura

Czytnik mikropłytek LT-400	Labtech
Komora laminarna	Alpina
Mieszadło magnetyczne MS2	IKA
pH-metr	Schott
Spektrofotometr BioPhotometer	Eppendorf

Sterylizator parowy 2100 Classic Standard	Prestige Medical
Termomikser Compact	Eppendorf
Waga analityczna	Radwag
Wirówka laboratoryjna MiniSpin	Eppendorf
Wirówka laboratoryjna Mikro 22R	Hettich
Wytrząsarka orbitalna KS130	IKA
Wytrząsarka orbitalna 358A	Elpin-plus

1.7. Roztwory i bufony

1.7.1. Roztwory podstawowe

- *0,1 % roztwory związków 3-5, 7-12, 14-28*

Na wadze analitycznej odważono kolejno po 1 mg związków **3-5, 7-12, 14-28**, przeniesiono do probówek Eppendorf i rozpuszczono w 1000 µl DMSO.

- *0,2 % roztwory związków 1-36*

Na wadze analitycznej odważono kolejno po 2 mg związków **1-36**, przeniesiono do probówek Eppendorf i rozpuszczono w 1000 µl DMSO

- *0,4 % roztwory związków 1-36*

Na wadze analitycznej odważono kolejno po 4 mg związków **1-36**, przeniesiono do probówek Eppendorf i rozpuszczono w 1000 µl DMSO.

- *0,5 % roztwory związków 1-36*

Na wadze analitycznej odważono kolejno po 5 mg związków **1-36**, przeniesiono do probówek Eppendorf i rozpuszczono w 1000 µl DMSO.

- *0,65 % roztwory związków 1-36*

Na wadze analitycznej odważono kolejno po 6,5 mg związków **1-36**, przeniesiono do probówek Eppendorf i rozpuszczono w 1000 µl DMSO.

- *0,8 % roztwory związków 1-36*

Na wadze analitycznej odważono kolejno po 8 mg związków **1-36**, przeniesiono do probówek Eppendorf i rozpuszczono w 1000 μ l DMSO.

- *1,25 % roztwory związków 3-5, 7-12, 14-28*

Na wadze analitycznej odważono kolejno po 12,5 mg związków **3-5, 7-12, 14-28**, przeniesiono do probówek Eppendorf i rozpuszczono w 1000 μ l DMSO.

- *0,1 % roztwory N-tlenku-4-nitrochinoliny (NQNO)*

Na wadze analitycznej odważono 1 mg NQNO, przeniesiono do probówki Eppendorf i rozpuszczono w 1000 μ l DMSO.

- *0,2 % roztwory NQNO*

Na wadze analitycznej odważono 2 mg NQNO, przeniesiono do probówki Eppendorf i rozpuszczono w 1000 μ l wody do badań molekularnych. Otrzymany roztwór umieszczono w termomikserze i wytrząsano (temp. 30°C, 500 rpm).

- *0,4 % roztwory NQNO*

Na wadze analitycznej odważono 4 mg NQNO, przeniesiono do probówki Eppendorf i rozpuszczono w 1000 μ l wody do badań molekularnych.

- *0,5 % roztwory NQNO*

Na wadze analitycznej odważono 5 mg NQNO, przeniesiono do probówki Eppendorf i rozpuszczono w 1000 μ l DMSO.

- *0,65 % roztwory NQNO*

Na wadze analitycznej odważono 6,5 mg NQNO, przeniesiono do probówki Eppendorf i rozpuszczono w 1000 μ l DMSO.

- *1,25 % roztwory NQNO*

Na wadze analitycznej odważono 12,5 mg NQNO, przeniesiono do probówki Eppendorf i rozpuszczono w 1000 μ l DMSO.

- *0,2 % roztwory azydku sodu (AS)*

Na wadze analitycznej odważono 2 mg AS, przeniesiono do probówki Eppendorf i rozpuszczono w 1000 µl wody do badań molekularnych.

- *0,4 % roztwory AS*

Na wadze analitycznej odważono 4 mg AS, przeniesiono do probówki Eppendorf i rozpuszczono w 1000 µl wody do badań molekularnych.

- *0,2 % roztwory 4-nitro-O-fenylendiaminy (4-NPD)*

Na wadze analitycznej odważono 2 mg 4-NPD, przeniesiono do probówki Eppendorf i rozpuszczono w 1000 µl DMSO

- *0,4 % roztwory 4-NPD*

Na wadze analitycznej odważono 4 mg 4-NPD, przeniesiono do probówki Eppendorf i rozpuszczono w 1000 µl DMSO.

- *0,8 % roztwory dimetylosulfotlenku (DMSO)*

Na wadze analitycznej odważono 8 mg DMSO, przeniesiono do probówki Eppendorf i dodano 992 µl wody do badań molekularnych.

- *3 % roztwory neomycyny*

Na wadze analitycznej odważono 30 mg antybiotyku i rozpuszczono w 1000 µl wody do badań molekularnych.

1.7.2. Roztwory robocze

- *40 µg% roztwory związków 1-36*

Do probówek Eppendorf odmierzone 990 µl wody do badań molekularnych i dodano 10 µl roztworów roboczych związków **1-36** o stężeniu 4 mg%.

- *50 µg% roztwory związków 1-36*

Do probówek Eppendorf odmierzone 990 µl DMSO i dodano 10 µl roztworów roboczych związków **1-36** o stężeniu 5 mg%.

- *0,1 mg% roztwory związków 3-5, 7-12, 14-28*

Do probówek Eppendorf odmierzone 900 µl DMSO i dodano 100 µl roztworów roboczych związków **3-5, 7-12, 14-28** o stężeniu 1 mg%.

- *0,5 mg% roztwory związków 1-36*

Do probówek Eppendorf odmierzone 997,5 µl wody do badań molekularnych i dodano 2,5 µl roztworów podstawowych związków **1-36** o stężeniu 0,2 %.

- *0,65 mg% roztwory związków 1-36*

Do probówek Eppendorf odmierzone 900 µl DMSO i dodano 100 µl roztworów roboczych związków **1-36** o stężeniu 6,5 mg%.

- *1 mg% roztwory związków 3-5, 7-12, 14-28*

Do probówek Eppendorf odmierzone 990 µl DMSO i dodano 10 µl roztworów podstawowych związków **3-5, 7-12, 14-28** o stężeniu 0,1 %.

- *1,25 mg% roztwory związków 3-5, 7-12, 14-28*

Do probówek Eppendorf odmierzone 900 µl DMSO i dodano 100 µl roztworów roboczych związków **3-5, 7-12, 14-28** o stężeniu 12,5 mg%.

- *4 mg% roztwory związków 1-36*

Do probówek Eppendorf odmierzone 990 µl wody do badań molekularnych i dodano 10 µl roztworów podstawowych związków **1-36** o stężeniu 0,4 %.

- *5 mg% roztwory związków 1-36*

Do probówek Eppendorf odmierzone 990 µl DMSO i dodano 10 µl roztworów podstawowych związków **1-36** o stężeniu 0,5 %.

- *6,5 mg% roztwory związków 1-36*

Do probówek Eppendorf odmierzone 990 µl DMSO i dodano 10 µl roztworów podstawowych związków **1-36** o stężeniu 0,65 %.

- *8 mg% roztwory związków 1-36*

Do probówek Eppendorf odmierzone 990 µl wody do badań molekularnych i dodano 10 µl roztworów podstawowych związków **1-36** o stężeniu 0,8 %.

- *12,5 mg% roztwory związków 3-5, 7-12, 14-28*

Do probówek Eppendorf odmierzone 990 µl DMSO i dodano 10 µl roztworów podstawowych związków **3-5, 7-12, 14-28** o stężeniu 1,25 %.

- *40 µg% roztwór NQNO*

Do probówki Eppendorf odmierzone 990 µl wody do badań molekularnych i dodano 10 µl roztworu roboczego NQNO o stężeniu 4 mg%.

- *50 µg% roztwór NQNO*

Do probówki Eppendorf odmierzone 990 µl DMSO i dodano 10 µl roztworu roboczego NQNO o stężeniu 5 mg%.

- *0,1 mg% roztwór NQNO*

Do probówek Eppendorf odmierzone 900 µl DMSO i dodano 100 µl roztworu roboczego NQNO o stężeniu 1 mg%.

- *0,5 mg% roztwór NQNO*

Do probówki Eppendorf odmierzone 997,5 µl wody do badań molekularnych i dodano 2,5 µl roztworu podstawowego NQNO o stężeniu 0,2 %.

- *0,65 mg% roztwór NQNO*

Do probówki Eppendorf odmierzone 900 µl DMSO i dodano 100 µl roztworu roboczego NQNO o stężeniu 6,5 mg%.

- *1 mg% roztwór NQNO*

Do probówki Eppendorf odmierzone 990 µl DMSO i dodano 10 µl roztworu podstawowego NQNO o stężeniu 0,1 %.

- *1,25 mg% roztwór NQNO*

Do probówki Eppendorf odmierzone 900 µl DMSO i dodano 100 µl roztworu roboczego NQNO o stężeniu 12,5 mg%.

- *4 mg% roztwór NQNO*

Do probówki Eppendorf odmierzone 990 µl wody do badań molekularnych i dodano 10 µl roztworu podstawowego NQNO o stężeniu 0,4 %.

- *5 mg% roztwór NQNO*

Do probówki Eppendorf odmierzone 990 µl DMSO i dodano 10 µl roztworu podstawowego NQNO o stężeniu 0,5 %.

- *6,5 mg% roztwór NQNO*

Do probówki Eppendorf odmierzone 990 µl DMSO i dodano 10 µl roztworu podstawowego NQNO o stężeniu 0,65 %.

- *8 mg% roztwór NQNO*

Do probówki Eppendorf odmierzone 960 µl wody do badań molekularnych i dodano 40 µl roztworu podstawowego NQNO o stężeniu 0,2 %.

- *12,5 mg% roztwór NQNO*

Do probówki Eppendorf odmierzone 990 µl DMSO i dodano 10 µl roztworu podstawowego NQNO o stężeniu 1,25 %.

- *40 µg% roztwór AS*

Do probówki Eppendorf odmierzone 990 µl wody do badań molekularnych i dodano 10 µl roztworu roboczego AS o stężeniu 4 mg%.

- *0,5 mg% roztwór AS*

Do probówki Eppendorf odmierzone 997,5 µl wody do badań molekularnych i dodano 2,5 µl roztworu podstawowego AS o stężeniu 0,2 %.

- 4 mg% roztwór AS

Do probówki Eppendorf odmierzone 990 µl wody do badań molekularnych i dodano 10 µl roztworu podstawowego AS o stężeniu 0,4 %.

- 40 µg% roztwór 4-NPD

Do probówki Eppendorf odmierzone 990 µl wody do badań molekularnych i dodano 10 µl roztworu roboczego 4-NPD o stężeniu 4 mg%.

- 0,5 mg% roztwór 4-NPD

Do probówki Eppendorf odmierzone 997,5 µl wody do badań molekularnych i dodano 2,5 µl roztworu podstawowego 4-NPD o stężeniu 0,2 %.

- 4 mg% roztwór 4-NPD

Do probówki Eppendorf odmierzone 990 µl wody do badań molekularnych i dodano 10 µl roztworu podstawowego 4-NPD o stężeniu 0,4 %.

- 8 mg% roztwór DMSO

Do probówki Eppendorf odmierzone 990 µl wody do badań molekularnych i dodano 10 µl roztworu podstawowego DMSO o stężeniu 0,8 %.

1.7.3. Roztwory soli i buforów

- *Roztwór soli Vogel-Bonner (VB salts)*

Tabela 5. Skład roztworu soli Vogel-Bonner.

Składniki	Ilość
Woda destylowana	650 ml
Siarczan magnezu ($MgSO_4 \times H_2O$)	10 g
Kwas cytrynowy jednowodny	100 g
Wodorofosforan potasu (K_2HPO_4)	500 g
Wodorofosforan sodowo-amonowy ($NaNH_4HPO_4$)	175 g

W celu otrzymania roztworu soli Vogel-Bonner składniki podane w Tabeli 5 rozpuszczono kolejno w wodzie destylowanej o temperaturze ok. 50°C, stale mieszając aż do całkowitego rozpuszczenia. Po sterylizacji roztwór soli Vogel-Bonnera stosowano do przygotowania podłoża minimalnego (*Bottom agar*, BA).

- *0,1 mM bufor sodowo-fosforanowy*

Tabela 6. Skład 0,1 mM buforu fosforanowego.

Składniki	Ilość
Diwodorofosforan sodu (0,1 M) 13,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	120 ml
Wodorofosforan sodu (0,1 M) 14,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	880 ml

0,1mM bufor sodowo-fosforanowy sporządzono zgodnie z wytycznymi zawartymi w Tabeli 6. Następnie bufor doprowadzono do pH= 7,4 przy pomocy 0,1 M Na_2HPO_4 i autoklawowano.

- *0,5 mM roztwór histydyny i biotyny*

Tabela 7. Skład 0,5 mM roztworu histydyny i biotyny.

Składniki	Ilość
Woda destylowana	1000 ml
D-biotyna	124 mg
Chlorowodorek L-histydyny	96 mg

Roztwór przygotowano zgodnie z danymi zawartymi w Tabeli 7. Po sterylizacji i ostudzeniu 0,5 mM roztwór histydyny i biotyny dodano do agaru powierzchniowego.

- *10 % roztwór glukozy*

Tabela 8. Skład 10 % roztworu glukozy.

Składniki	Ilość
Woda destylowana	700 ml
Glukoza	100 g

Roztwór przygotowano zgodnie z danymi zawartymi w Tabeli 8. Po sterylizacji i ostudzeniu 10 % roztwór glukozy stosowano do przygotowania podłoża BA.

2. Metodyka badań

2.1. Test Ames

W teście Ames wykorzystywano następujące podłoża mikrobiologiczne: agar powierzchniowy (*Top agar*, TA); podłoże minimalne (*Bottom agar*, BA); bulion odżywczy (Oxoid nr 2), których skład przedstawiono poniżej.

- *Agar TA*

Tabela 9. Skład agaru powierzchniowego.

Składniki	Ilość
Woda destylowana	900 ml
Agar	6 g
Chlorek sodu	6 g
Roztwór histydyny i biotyny	100 ml

Po sterylizacji pożywkę rozlano do 50 ml kolb Erlenmeyera i pozostawiono do zestalenia.

- *Bulion odżywczy*

Tabela 10. Skład bulionu odżywczego.

Składniki	Ilość
Woda destylowana	1000 ml
Oxoid nr 2	25 g

Hodowlę i namnażanie szczepu *S. typhimurium* TA100 prowadzono w bulionie odżywczym Oxoid nr 2.

- *Podłoże BA*

Tabela 11. Składniki podłoża BA.

Składniki	Ilość
Woda destylowana	900 ml
Agar	15 g
Roztwór soli Vogel-Bonner	20 ml
10 % Roztwór glukozy	50 ml

Po sterylizacji podłoże minimalne wystudowano do temperatury ok. 60 °C. Następnie pożywkę rozlano na szalki Petriego i pozostawiono do zestalenia.

Procedura testu Ames

Do kolby stożkowej o pojemności 100 ml odmierzone 20 ml bulionu odżywczego Oxoid i zaszczerpiono szczepem testowym *S. typhimurium* TA100. Hodowlę inkubowano 12 h w temperaturze 37 °C. Po inkubacji hodowlę całonocną rozcieńczono w celu uzyskania gęstości optycznej o wartości 0,15 (1×10^8 komórek/ml). Następnie, do sterylnych probówek o objętości 5 ml dodawano kolejno:

- 0,5 ml 0,1 M buforu fosforanowego (pH = 7,4)
- 0,1 ml hodowli szczepu *S. typhimurium* TA100
- 50 µl roztworów roboczych (w stężeniach 50 µg% lub 0,65 mg%) badanych związków (**1-36**) lub mutagenu wzorcowego (NQNO), osiągając stężenie końcowe testowanych substancji odpowiednio 4 µg% lub 50 µg%.

Równolegle wykonano kontrolę negatywną, która zawierała DMSO. Tak sporządzone mieszaniny inkubowano przez 20 min. w temperaturze 37°C. Następnie do każdej mieszaniny dodano po 2 ml agaru powierzchniowego o temperaturze 45°C. Zawartość każdej probówki dokładnie wymieszano i wylano na powierzchnię płytki Petriego z podłożem BA. Płytki inkubowano w temperaturze 37 °C przez 48 h. Badanie dla każdej próby zostało wykonane w trzykrotnych powtórzeniach. Po upływie 48 godzin liczono kolonie rewertantów *his+*, które wyrosły na poszczególnych szalkach (Maron i Ames, 1983; Mortelmans i Zeiger, 2000). Procedurę testu Ames przedstawiono na Rycinie 15 (str. 71).

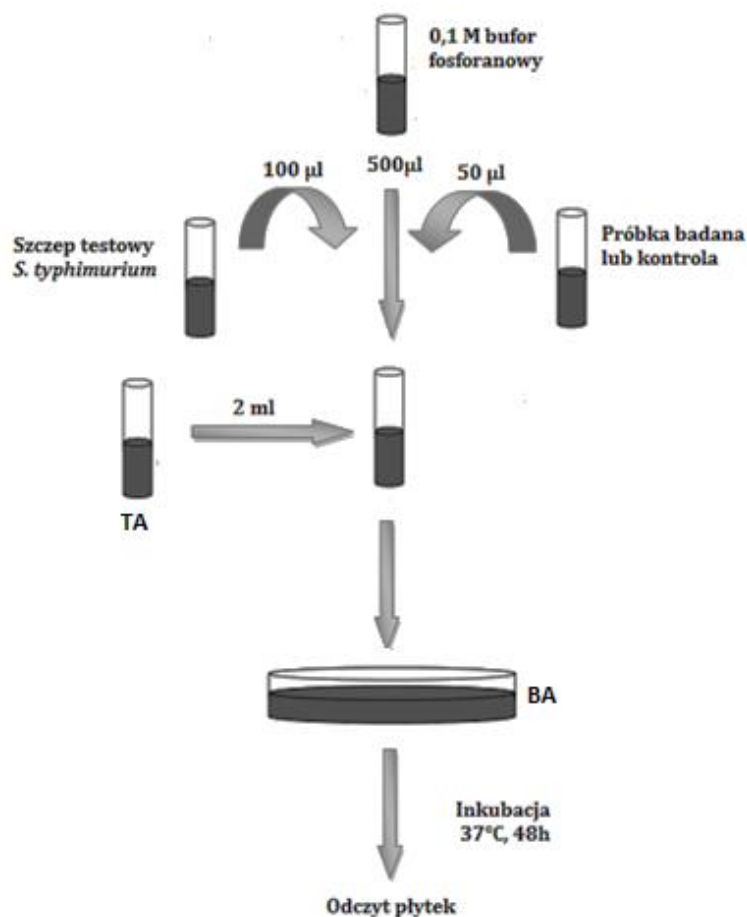
Wyniki uzyskane w teście Ames przedstawiono, jako współczynnik mutagenności (MI), będący ilorazem średniej liczby rewertantów *his+* indukowanych przez testowany związek na płycie i średniej liczby rewertantów *his+* powstałych spontanicznie. Zgodnie z procedurą za mutagenne uznawano te związki, które dawały co najmniej dwukrotny wzrost liczby rewertantów *his+* w stosunku do kontroli negatywnej (DMSO lub H₂O) (współczynnik mutagenności $MI \geq 2$) (Mortelmans i Zeiger, 2000). Współczynnik mutagenności obliczano ze wzoru:

$$MI = n_i/n_s$$

gdzie:

n_i - liczba rewertantów *his+* indukowanych przez testowany związek chemiczny

n_s - liczba rewertantów *his+* spontanicznych



Rycina 15. Etapy testu Ames (Mortelmans i Zeiger, 2000).

2.2. Test *Vibrio harveyi*

Rodzaje i skład podłoży mikrobiologicznych niezbędnych do przeprowadzenia testu *Vibrio harveyi* przedstawiono poniżej.

- Pożywka BOSS z agarem

Tabela 12. Skład pożywki BOSS z agarem.

Składniki	Ilość
Woda destylowana	1000 ml
Pepton	10 g
Ekstrakt wołowy	3 g
Chlorek sodu (NaCl)	30 g
Glicerol	1 ml
Agar	10 g
Roztwór neomycyny (3 %)	3,4 ml

Po sterylizacji pożywkę BOSS z agarem wystudowano do temperatury ok. 50 °C, następnie dodano roztwór neomycyny o stężeniu 3 %. Końcowe stężenie

antybiotyku w pożywce wynosiło 10 mg%. Podłoże rozlano na szalki Petriego i pozostawiono do zestalenia.

- *Pożywka BOSS*

Tabela 13. Skład płynnej pożywki BOSS.

Składniki	Ilość
Woda destylowana	1000 ml
Pepton	10 g
Ekstrakt wołowy	3 g
Chlorek sodu (NaCl)	30 g
Glicerol	1 ml

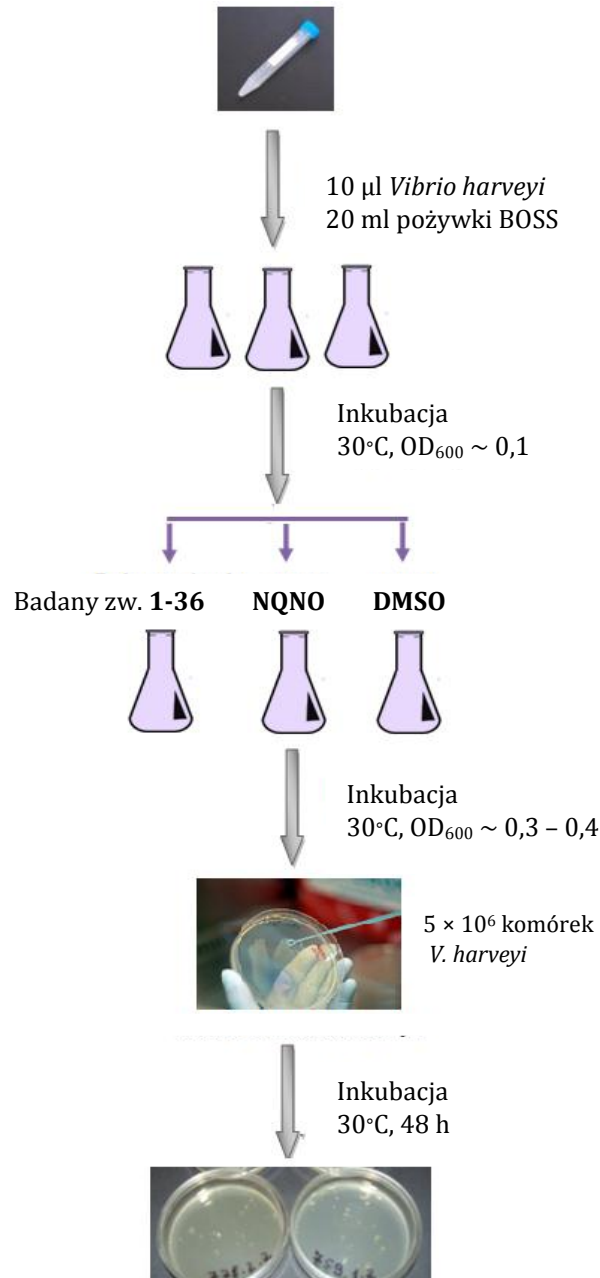
Pożywkę BOSS sporządzono zgodnie z wytycznymi zamieszczonymi w Tabeli 13. Wyjałowione podłoże użyto do hodowli i namnażania szczepów testowych *Vibrio harveyi*.

Procedura testu *Vibrio harveyi*

Do 4 kolb stożkowych o pojemności 50 ml odmierzone po 20 ml płynnej pożywki BOSS, następnie dodano 10 µl zawiesiny komórek szczepów testowych *V. harveyi*: BB7, BB7M, BB7X, BB7XM. Hodowle inkubowano 24 h w temp. 30 °C z wytrząsaniem. Po inkubacji każdą z hodowli przeniesiono do falkonów i odwirowano (10 min., 4°C, 6000 rpm). Następnie, do kolb stożkowych o pojemności 50 ml odmierzone 20 ml pożywki płynnej BOSS i każdą z nich zaszczepiono 10 µl peletu komórkowego poszczególnych szczepów *V. harveyi*. Hodowle inkubowano wytrząsając (300 rpm) w temperaturze 30°C. Wzrost bakterii kontrolowano poprzez pomiar gęstości optycznej hodowli przy długości fali 600 nm (*optical density*, OD₆₀₀). Gdy gęstość optyczna hodowli osiągnęła wartość 0,1 do poszczególnych kolbek dodano po 10 µl odpowiednich roztworów roboczych (w stężeniu 8 mg%):

- badanych związków (1-36)
- mutagenu wzorcowego (NQNO), osiągając końcowe stężenie badanych substancji 4 µg%. Równolegle wykonano kontrolę negatywną z DMSO (8 mg%). Każdą próbę wykonano w trzykrotnych powtórzeniach. Hodowle inkubowano wytrząsając (300 rpm) w temperaturze 30°C, do uzyskania wartości OD₆₀₀

w zakresie 0,3 do 0,4. Następnie z każdej kolbki odmierzone objętość zawiesiny bakteryjnej zawierającą 5×10^6 komórek bakteryjnych i przeniesiono na podłoże stałe BOSS z neomycyną. Hodowle na szalkach Petriego inkubowano w temperaturze 30 °C przez 48 h. Po tym czasie na każdej płytce zliczono neomycynooporne mutanty (Czyż i wsp., 2000; Czyż i wsp., 2002; Podgórska i wsp., 2006). Procedurę testu *Vibrio harveyi* przedstawiono na Rycinie 16.



Rycina. 16. Etapy testu *Vibrio harveyi*.

Interpretacja wyników opiera się na porównaniu średniej liczby mutantów neomycynoopornych, które wyrosły na płytce z badanymi związkami z liczbą mutantów neomycynoopornych, które wyrosły w referencyjnej próbie z wzorcowym mutagenem (NQNO). Próba kontrolna stanowi odzwierciedlenie liczby spontanicznych mutacji, które pojawiły się w danym szczepie. Efekt mutageny badanych związków przedstawiono w postaci współczynnika mutagenności (MI), czyli ilorazu średniej liczby mutantów neomycynoopornych wyrosłych w obecności badanej próbki i średniej liczby mutantów spontanicznych. Za mutagenne uznaje się związki dla, których współczynnik mutagenności MI jest ≥ 2 .

2.3. Test *Vibrio harveyi* w wersji mikropłytkowej

Do kolby Erlenmeyera o pojemności 50 ml odmierzone 20 ml płynnej pożywki BOSS i dodano 100 μ l rozmrożonej hodowli szczepu testowego *V. harveyi* BB7. Hodowlę inkubowano 24 h w temp. 30°C wytrząsając (250 rpm). Po inkubacji 24-godzinną hodowlę rozcieńczono pożywką BOSS do uzyskania zawiesiny bakteryjnej o gęstości optycznej $OD_{600} = 2,0$.

W dołkach mikropłytki umieszczono po 200 μ l świeżej pożywki BOSS i dodano 15 μ l zawiesiny bakteryjnej o gęstości optycznej $OD_{600} = 2,0$. Mikropłytkę inkubowano w temperaturze 30°C intensywnie wytrząsając (250 rpm). Gdy gęstość optyczna hodowli osiągnęła wartość 0,1 do poszczególnych dołków mikropłytki dodano po 24 μ l odpowiednich roztworów roboczych (w stężeniach 40 μ g% i 0,5 mg%):

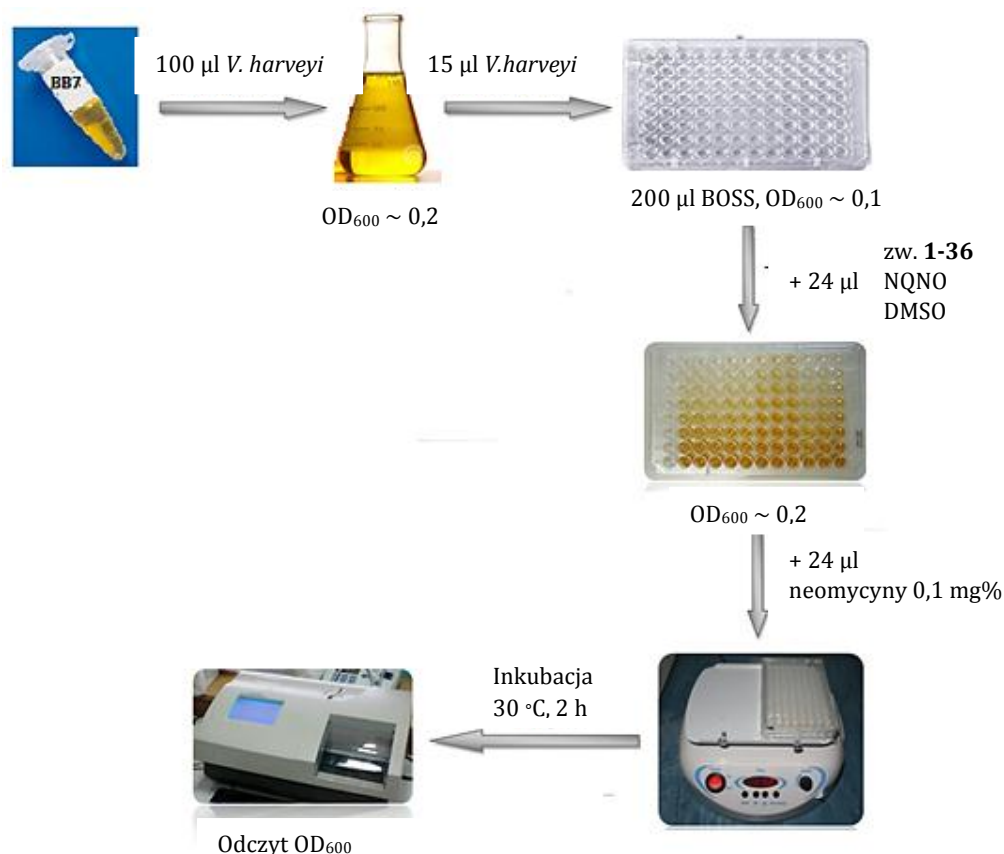
- mutagenów wzorcowych (NQNO, AS, 4-NPD)
- badanych związków **1-36**.

Stężenie końcowe badanych substancji wynosiło odpowiednio 4 μ g% i 50 μ g%. Równolegle wykonano próbę:

- ślepa dla pożywki BOSS
- negatywną dla pożywki BOSS z zawiesiną bakteryjną
- kontrolną dla rozpuszczalników DMSO i H₂O.

Każdą z prób wykonano w trzykrotnym powtórzeniu. Mikropłytkę inkubowano w temperaturze 30°C wytrząsając (300 rpm), do uzyskania gęstości optycznej

hodowli bakteryjnej ok. 0,2 (po około 2 h inkubacji). Następnie do poszczególnych dołków mikro płytki dodano 24 μ l roztworu neomycyny w stężeniu 0,1 mg%, osiągając ostateczne stężenie 10 mg%. Mikro płytkę inkubowano ponownie przez 2 h w temperaturze 30°C i intensywnie wytrząsano (250 rpm). Po inkubacji odczytano gęstość optyczną OD₆₀₀ hodowli bakteryjnej. Powyższą procedurę przedstawiono na Rycinie 17.



Rycina 17. Etapy mikro płytkowego testu *Vibrio harveyi*.

Wyniki uzyskane w mikro płytkowym teście *Vibrio harveyi* zostały przedstawiono, jako Δ_B i Δ_M :

$$\Delta_B = OD_{600B} - 0,2$$

$$\Delta_M = OD_{600M} - 0,2$$

gdzie:

OD_{600B} – absorbancja badanego związku (1-36) po 2 h inkubacji z neomycyną

OD_{600M} – absorbancja mutagenu wzorcowego (NQNO, AS, 4-NPD) po 2 h inkubacji z neomycyną

0,2 – OD₆₀₀ hodowli *V. harveyi* po inkubacji ze związkami **1-36** oraz mutagenami diagnostycznymi

Interpretacja wyników opiera się na porównaniu wartości Δ_B względem Δ_M . Jeżeli:

- $\Delta_B < \Delta_M$ – badany związek uznawano za niemutageny
- $\Delta_B \geq \Delta_M$ – badany związek uznawano za mutageny.

2.4. Test SOS/*umu*

Do badania genotoksyczności zastosowano mikroplótkową wersję testu SOS/*umu*, zgodnie z normą ISO 13829 (2000).

Do **kolby Erlenmeyera** o pojemności 50 ml odmierzone 10 ml podłoża TGA (1 % trypton, 0,5 % NaCl, 0,2 % glukoza, ampicylina 5 mg%), następnie dodano 50 µl rozmrożonej zawiesiny komórek szczepu *S. typhimurium* TA1535/pSK1002. Hodowlę inkubowano przez 14 – 16 godzin w temp. 37 °C, wytrząsając (250 rpm). Po całonocnej inkubacji zmierzono gęstość optyczną hodowli szczepu testowego oraz kontroli negatywnej (TGA + bakterie). Wartości akceptowalne do dalszych badań to: OD₆₀₀ < 0,05 dla kontroli negatywnej oraz OD₆₀₀ > 2,0 dla szczepu *S. typhimurium* TA1535/pSK1002. Następnie, całonocną hodowlę rozcieńczono 10-krotnie podłożem TGA. Ponowną inkubację z wytrząsaniem prowadzono przez ok. 2 godziny w celu uzyskania gęstości optycznej odpowiadającej 70 – 80 % wartości OD₆₀₀ dla hodowli całonocnej (1,4 – 1,6).

I Mikroplótkka: do wszystkich dołków mikroplótki wprowadzono po 200 µl podłoża TGA (Rycina 18, str. 77). Następnie do poszczególnych dołków dodano po 50 µl zawiesiny reinkubowanych bakterii oraz po 20 µl odpowiednich roztworów roboczych w stężeniach 0,1 mg% lub 1,25 mg%:

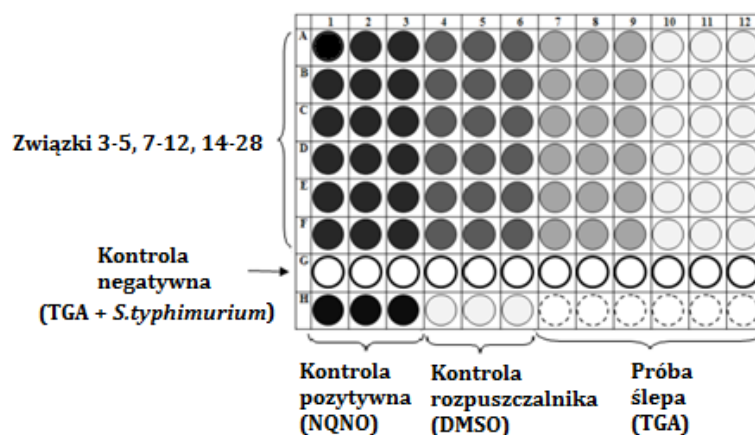
- mutagenu wzorcowego (NQNO)
- badanych związków (**3-5, 7-12, 14-28**)

osiągając stężenie końcowe badanych substancji odpowiednio 4 µg% lub 50 µg%.

Równolegle wykonano kontrolę:

- rozpuszczalnika (DMSO)
- negatywną (TGA + zawiesina bakteryjna)
- próbę ślepą (TGA).

Po wymieszaniu zawartości wszystkich dołków, mikroplótkę inkubowano intensywnie wytrząsając (150 rpm) przez 2 h w temperaturze 37°C.

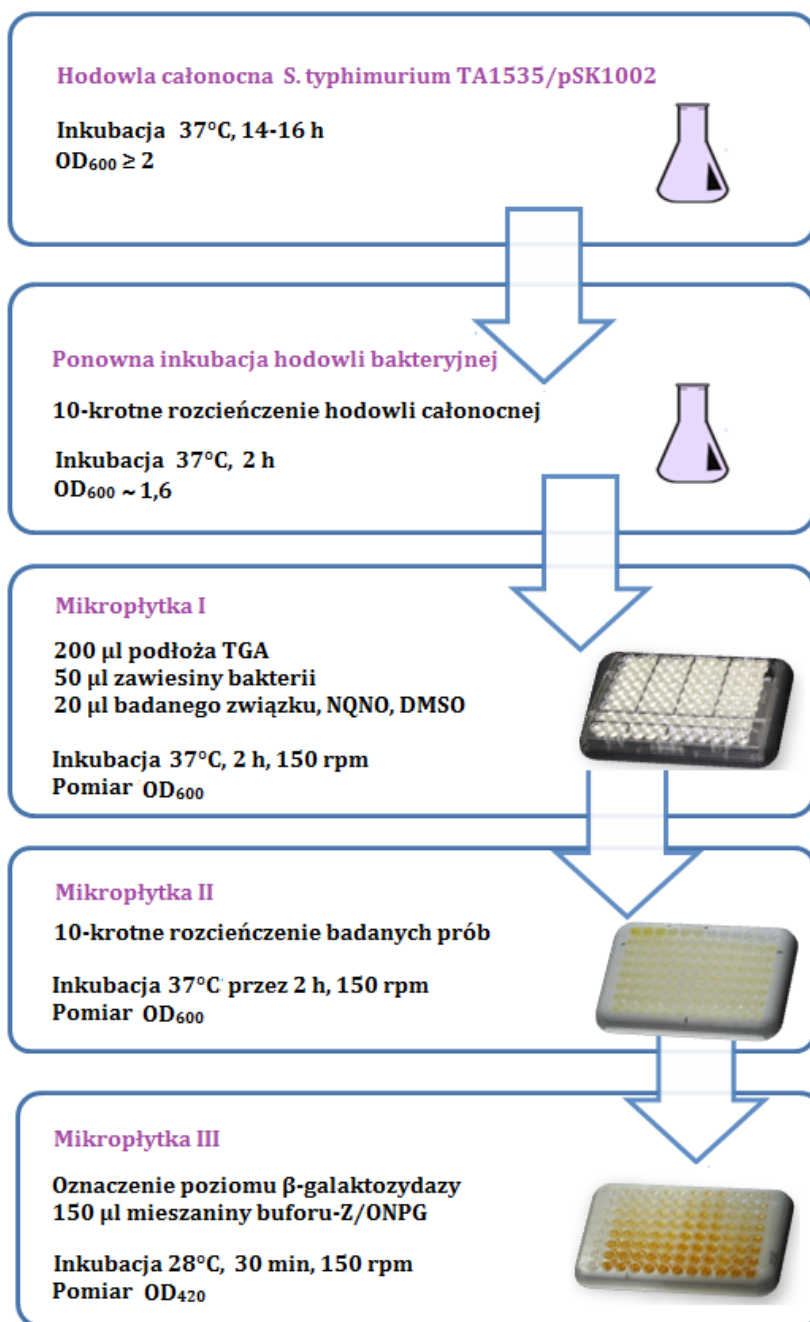


Rycina 18. Mikroplótkę w teście SOS/*umu*.

II Mikroplótkę: do wszystkich dołków II mikroplótki wprowadzono po 270 μ l podłoża TGA i przeniesiono po 30 μ l hodowli z I mikroplótki do poszczególnych dołków (rozcieńczenie 10 \times). II mikroplótkę inkubowano przez 2 h w temperaturze 37°C z wytrząsaniem (150 rpm). Po inkubacji odczytano gęstość optyczną OD₆₀₀.

III Mikroplótkę: 30 μ l hodowli z każdego dołka II mikroplótki przeniesiono do mikroplótki III zawierającej: 90 μ l buforu Z (0,06 M Na₂HPO₄ 7H₂O; 0,04 M NaH₂PO₄ H₂O; 0,01 M KCl; 0,01 M MgSO₄ 7H₂O; 0,05 M 2-merkaptioetanol); 50 μ l 0,1 % dodecylosiarczanu sodu (SDS) oraz 10 μ l 2-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozydu (ONPG) (0,4%). Następnie, inkubację prowadzono przez 30 minut w temperaturze 28°C, wytrząsając (150 rpm). Po inkubacji dodano 120 μ l roztworu hamującego (1 M Na₂CO₃) do każdego dołka i dokładnie wymieszano.

Uszkodzenie DNA przez substancje genotoksyczne objawia się w tym teście wzrostem aktywności wewnątrzkomórkowej β -galaktozydazy. Pomiar spektrofotometryczny wykonano przy długości fali 420 nm. Aktywność β -galaktozydazy oznaczono w każdej próbce w trzech powtórzeniach (Oda i wsp., 1985). Poszczególne etapy testu SOS/*umu* przedstawiono na Rycinie 19 (str. 78).



Rycina 19. Etapy testu SOS/umu.

W celu oceny poziomu cytotoksyczności badanych związków dokonano pomiaru gęstości optycznej po 2 i 4 godzinach inkubacji. Na podstawie gęstości optycznej hodowli po 4 godzinnej inkubacji wyliczono właściwy wskaźnik cytotoksyczności (Reifferscheid i wsp., 1991), tj. współczynnik biomasy (GF) wg wzoru:

$$GF = (A_{600T} - A_{600B}) / (A_{600N} - A_{600B})$$

gdzie:

A_{600T} – absorbancja badanej próbki przy długości fali 600 nm

A_{600N} – absorbancja kontroli negatywnej (TGA + bakterie) przy długości fali 600 nm

A_{600B} – absorbancja ślepej próby (TGA) przy długości fali 600 nm

Spadek wartości współczynnika GF poniżej 0,5 dyskwalifikował próbkę, nawet w przypadku wzrostu poziomu aktywności β -galaktozdazy (zbyt duży efekt cytotoksyczny). Ocenę poziomu aktywności β -galaktozydazy prowadzono w oparciu o względne jednostki aktywności enzymatycznej (U_{β}):

$$U_{\beta} = A_{420T} - A_{420B} / A_{600T} - A_{600B}$$

gdzie:

A_{420T} - absorbancja badanej próbki przy długości fali 420 nm

Poziom wzrost aktywności β -galaktozdazy prezentowany jest w postaci jednostki bezwzględnej, tj. współczynnik indukcji (IR):

$$IR = (1/GF) \times A_{420T} - A_{420B} / A_{420N} - A_{420B}$$

gdzie:

A_{420N} - absorbancja kontroli negatywnej przy długości fali 420 nm

Badana substancja chemiczna uznawana była za genotoksyczną, jeżeli IR był większy od 1,5.

2.5. Ocena działania antymutagennego testem Ames

Działanie antymutagenne badanych związków oszacowano w zmodyfikowanym teście Ames. Modyfikacja polegała na równoczesnej inkubacji badanych związków w obecności mutagenu wzorcowego wg następującego schematu:

- 0,5 ml 0,1 M buforu fosforanowego (pH = 7,4)
- 0,1 ml hodowli szczepu *S. typhimurium* TA 100 (1×10^8 komórek/ml)
- 50 μ l roztworów roboczych (w stężeniach 50 μ g% lub 0,65 mg%) badanych związków (**1-36**) oraz mutagenu wzorcowego (NQNO).

Stężenie końcowe badanych substancji wynosiło odpowiednio 4 μ g% lub 50 μ g% (Mortelmans i Zeiger, 2000; Zahin i wsp., 2010; Resende i wsp., 2014).

Aktywność antymutagenną badanych związków (**1-36**) w teście Ames wyrażono jako procent inhibicji aktywności mutagennej NQNO na podstawie wzoru (Negi i wsp., 2003; Birošová i wsp., 2005; Di Sotto i wsp., 2008; Resende i wsp., 2015):

$$\% \text{ Inhibicji} = 100 - [(R1/R2) \times 100]$$

gdzie:

R1 - liczba rewertantów *his+*, które wyrosły na szlacie po inkubacji z NQNO i badanym związkiem

R2 - liczba rewertantów *his+*, które wyrosły na szlacie po inkubacji z NQNO

Na podstawie analizy inhibicji aktywności mutagennej mutagenu wzorcowego wskazano substancje o różnym stopniu aktywności antymutagennej:

- wysokim – inhibicja powyżej 40 %
- umiarkowanym – inhibicja w zakresie 25–40 %
- niskim – inhibicja poniżej 25 % (Gulluce i wsp., 2011; Resende i wsp., 2012).

2.6. Ocena działania antymutagennego testem *Vibrio harveyi*

Działanie antymutagenne badanych związków oceniono w zmodyfikowanym teście *Vibrio harveyi*. Modyfikacja polegała na równoczesnej inkubacji w płynnej pożywce BOSS 10 µl roztworów roboczych (w stężeniu 8 mg%):

- badanych związków (**1-36**)
- z mutagenem wzorcowym (NQNO)

osiągając stężenie końcowe badanych substancji 4 µg% (Pękała i wsp., 2013; Słoczyńska i wsp., 2014a).

Aktywność antymutagenną badanych związków (**1-36**) w teście *Vibrio harveyi* wyrażono jako procent inhibicji aktywności mutagennej NQNO na podstawie wzoru (Negi i wsp., 2003; Birošová i wsp., 2005; Di Sotto i wsp., 2008; Resende i wsp., 2015):

$$\% \text{ Inhibicji} = 100 - [(R1/R2) \times 100]$$

gdzie:

R1 - liczba mutantów neomycynoopornych, które wyrosły na szlacie po inkubacji z NQNO i badanym związkiem

R2 - liczba mutantów neomycynoopornych, które wyrosły na szlacie po inkubacji z NQNO

Na podstawie analizy inhibicji aktywności mutagennej mutagenu wzorcowego wskazano substancje o różnym stopniu aktywności antymutagennej:

- wysokim – inhibicja powyżej 40 %
- umiarkowanym – inhibicja w zakresie 25–40 %
- niskim – inhibicja poniżej 25 % (Gulluce i wsp., 2011; Resende i wsp., 2012).

2.7. Programy komputerowe

- *OSIRIS Property Explorer* firmy *Actelion Pharmaceuticals Ltd.*

Program wykorzystano do wstępnej oceny potencjału mutagennego badanych związków **1-36**.

- *Statistica 10.2.*

Program wykorzystano do analizy statystycznej uzyskanych wyników. Do porównywania wielu grup wykorzystano analizę wariancji (test ANOVA). W przypadku wystąpienia istotnych efektów do porównań szczegółowych (z grupą kontrolną) wykorzystano test Dunetta. We wszystkich analizach, jako istotne przyjęto efekty, dla których wartość prawdopodobieństwa testowego p była mniejsza od przyjętego poziomu istotności $p = 0,05$.

IV Wyniki

1. Badania *in silico* bezpieczeństwa stosowania związków 1-36

Do wstępnej oceny toksyczności związków **1-36** wybrano program komputerowy OSIRIS Property Explorer. Program ten służy do szybkiego wstępnego oszacowania parametrów toksyczności takich jak: mutagenność, kancerogenność, teratogenność oraz właściwości drażniące na podstawie struktury chemicznej (Sangamwar i wsp., 2007; RajaSekhar i wsp., 2011). Ponadto oprócz tych właściwości program określa predyspozycję danego związku do bycia lekiem, czyli podobieństwo do istniejących leków (*druglikeness*) oraz zdolność bycia lekiem. Wykorzystuje on wartości deskryptorów opisujące właściwości fizykochemiczne, topologiczne, geometryczne i elektronowe oparte o strukturę cząsteczki. W programie istnieją dwa typy modeli: jakościowe i ilościowe. Modele jakościowe kwalifikują cząsteczki do danej klasy toksyczności np.: model, który określa czy dana cząsteczka pasuje do grupy będącej karcynogenami czy też nie. W przypadku modeli ilościowych program podaje wartości przewidywanych parametrów np. rozpuszczalność w wodzie.

Program posiada bazę danych zawierającą fragmenty związków o właściwościach toksycznych. Model ten został stworzony na podstawie danych z Rejestru Toksycznych Efektów Substancji Chemicznych (*Registry of Toxic Effects of Chemical Substances*, RTECS). Następnie proces oceny związku chemicznego polega na przeszukaniu i porównaniu każdego fragmentu jego budowy z fragmentami struktury związków należących do danej klasy toksyczności. Ponadto serwis posiada bazę danych zawierającą fragmenty związków pozbawionych działania toksycznego. Model ten został stworzony, aby zwiększyć dokładność analizy, a przez to wyeliminować przewidywanie fałszywie negatywnych wyników. Badane związki są również porównywane ze strukturami ponad 3000 zarejestrowanych leków. Dany fragment jest uważany za czynnik ryzyka, jeśli występuje w strukturze związków toksycznych.

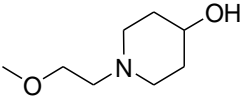
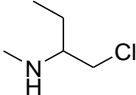
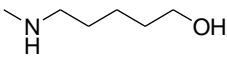
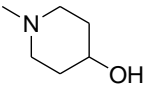
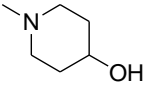
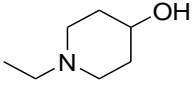
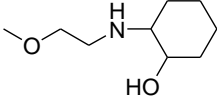
Wśród 36 związków poddanych analizie *in silico*, OSIRIS wskazał tylko cztery połączenia, **15** i **20** w grupie aminoalkanoli oraz **33** i **34** w grupie sulfonamidowych pochodnych arypiprazolu, dla których istnieje umiarkowane prawdopodobieństwo wywołania efektu mutagennego. Program zasugerował,

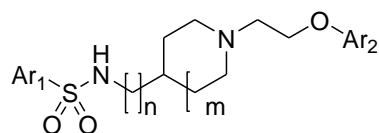
że fragmenty 2-chloroetyloaminowy i fenoksymetylenowy w grupie aminoalkanolu oraz 7-chinoliny w grupie pochodnych aripiprazolu są odpowiedzialne za pojawienie się toksycznych alertów strukturalnych (Tabela 14).

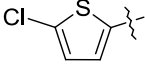
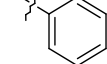
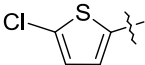
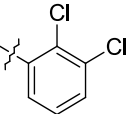
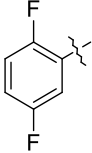
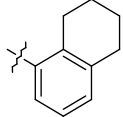
Tabela 14. Analiza toksyczności *in silico* związków 1-36.

Nr zw.	R ₁	R ₂	M	K	D	T
1 (R)			-	-	+	-
2 (S)	2,6-(CH ₃) ₂		-	-	+	-
3 (R/S)			-	-	+	-
4 (R)			-	-	+	-
5 (S)	2,6-(CH ₃) ₂		-	-	+	-
6 (R/S)			-	-	+	-
7 (R)			-	-	+	-
8 (S)	2-Cl,6-CH ₃		-	-	+	-
9 (R/S)			-	-	+	-
10 (R/S)	2,4,6-(CH ₃) ₃		-	-	+	-
11 (R/S)	2,6-(CH ₃) ₂		-	-	+	-
12 (R/S)	2,4,6-(CH ₃) ₃		-	-	+	-
13	2-Cl,6-CH ₃		-	-	+	-

cd. Tab. 14

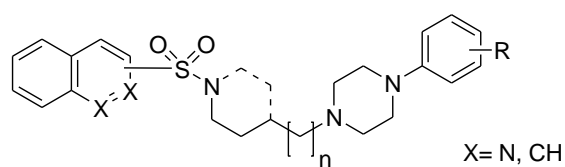
14	2,6-(CH ₃) ₂		-	-	+	-
15 (R/S)	2-Cl,6-CH ₃		+	+	+	+
16	2-Cl,6-CH ₃		-	-	+	-
17	2-Cl,6-CH ₃		-	-	+	-
18	2,6-(CH ₃) ₂		-	-	+	-
19	2,6-(CH ₃) ₂		-	-	+	-
20 (R/S)	2,3-(CH ₃) ₂		+/-	-	+	-



Nr zw.	Ar ₁	n	m	Ar ₂	M ^a	K ^a	D ^a	T ^a
21 (R/S)		0	0		-	-	-	+/-
22 (R/S)		0	0		-	-	-	+/-
23 (R/S)		0	0		-	-	+/-	+/-

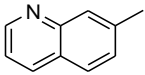
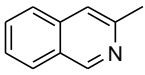
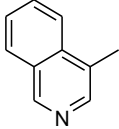
cd. Tab. 14

24 (R)		0	0		-	-	+	+
25 (S)		0	0		-	-	-	+/-
26		0	1		-	-	-	+/-
27		0	1		-	-	-	-
28		1	1		-	-	-	-



Nr zw.	Azynyl	n	R	M ^a	K ^a	D ^a	T ^a
29		1	3-Cl	-	-	-	-
30		1	3-Cl	-	-	-	-
31		2	4-Cl	-	+	-	-
32		1	2,3-diCl	-	-	-	-
33		0	2,3-diCl	+/-	-	-	-

cd. Tab. 14

34		1	2,3-diCl	+/-	-	-	-
35		1	2,3-diCl	-	-	-	-
36		1	2,3-diCl	-	+	-	-
ARP	Arypripazol	-	2,3-diCl	-	-	-	-

M - mutagenność, **K** - kancerogenność, **D** - działanie drażniące, **T** - teratogenność. Prawdopodobieństwo wystąpienia działania mutagennego, kancerogennego, drażniącego lub teratogennego: (-) - brak; (+/-) - umiarkowane; (+) - wysokie.

Interesujące wyniki zostały wysymulowane w aspekcie działania drażniącego. Wszystkie pochodne aminoalkanoli **1-20** zostały wskazane, jako te, które są obciążone potencjałem drażniącym, w przeciwieństwie do pochodnych arypripazolu **29-36**, dla których OSIRIS przewidywał całkowite bezpieczeństwo w zakresie tego parametru. Z symulacji programu OSIRIS wynika także, że spośród testowanych połączeń związek **15** jest strukturą, która może nieść najwyższe zagrożenie w zakresie bezpieczeństwa. Program przewidział dla tego związku aktywność mutagenną, kancerogenną, drażniącą oraz teratogenną.

2. Ocena aktywności mutagennej związków 1-36 *in vitro*

2.1. Test Ames

Do badań wybrano szczep *S. typhimurium* TA100, który wchodzi w skład standardowego zestawu testowego rekomendowanego do rutynowych badań przesiewowych mutagenności. Pozwala wykryć związki chemiczne wywołujące mutacje typu zamiany pary zasad. Aktywność mutagenną badanych związków oceniano względem wzorcowego mutagenu dla szczepu TA 100, którym jest *N*-tlenek-4-nitrochinoliny (NQNO) (Maron i Ames, 1983). Związki **1-36** testowano w dwóch stężeniach: 4 $\mu\text{g}\%$ i 50 $\mu\text{g}\%$. Pierwsze z nich było charakterystyczne dla metodyki testu *Vibrio harveyi* (Czyż i wsp., 2000; Czyż i wsp., 2002), drugie 12,5-krotnie wyższe było zgodne z procedurą testu Ames (Mortelmans i Zeiger, 2000). Do rozpuszczenia związków w zależności od ich właściwości hydrofobowo-hydrofilowych użyto wody do badań molekularnych lub dimetylosulfotlenku (DMSO). Ze względu na dużą hydrofilowość związków **2** i **15**, ich roztwory podstawowe przygotowano stosując wodę.

Na podstawie wyników uzyskanych w oparciu o analizę współczynnika mutagenności (MI) stwierdzono, że związki **1-36** były pozbawione właściwości mutagennych. Nie obserwowano podwojenia liczby kolonii rewertantów *his*⁺ w odniesieniu do próby kontrolnej zawierającej rozpuszczalnik (Tabela 15, str. 90).

Wartości współczynnika mutagenności (MI) dla szczepu *S. typhimurium* TA100 w stężeniu 4 $\mu\text{g}\%$ wahały się w granicach od MI = 0,4 dla związków **31** i **36** do MI = 1,7 dla związków **5** i **9**. W stężeniu 50 $\mu\text{g}\%$ obserwowano wartości współczynnika mutagenności od MI = 0,2 dla związku **32** do MI = 1,9 dla związku **19**.

Interpretację testu Ames można również przedstawić, w oparciu o wyniki analizy statystycznej. Analiza statystyczna dotyczyła określenia istotności różnic pomiędzy średnią liczbą kolonii rewertantów *his*⁺ uzyskaną dla badanych związków względem kontroli negatywnej (DMSO lub H₂O) (Biso i wsp., 2010; Espanha i wsp., 2014; Resende i wsp., 2015). Na podstawie analizy statystycznej uzyskanych wyników wykazano, że w stężeniu 50 $\mu\text{g}\%$ średnia liczba kolonii rewertantów *his*⁺ dla badanych związków: **7**, **8**, **9**, **12**, **16**, **17**, **19**, **23**, **25** i **ARP** była znamienne podwyższona ($p < 0,05$) w stosunku do kontroli rozpuszczalnika

(DMSO) (Tabela 15). Podobną zależność zaobserwowano w stężeniu 40 µg% dla połączeń: **5**, **9** i **27**, co może sugerować aktywność mutagenną wskazanych związków w teście Ames.

Tabela 15. Aktywność mutagenna związków (1-36) w teście Ames.

Nr zw.	Test Ames			
	Liczba rewertantów <i>his+</i> /płytkę			
	4 µg%		50 µg%	
	Średnia ± SD	MI	Średnia ± SD	MI
DMSO	18 ± 2		18 ± 2	
H ₂ O	20 ± 2		20 ± 2	
1	10 ± 2	0,6	22 ± 4	1,2
2 ^a	28 ± 3	1,4	24 ± 5	1,2
3	21 ± 6	1,2	21 ± 3	1,2
4	25 ± 6	1,4	21 ± 3	1,2
5	30 ± 2*	1,7	17 ± 5	0,9
6	20 ± 6	1,1	19 ± 5	1,0
7	19 ± 3	1,0	31 ± 2*	1,7
8	13 ± 4	0,7	33 ± 4*	1,8
9	30 ± 3*	1,7	30 ± 6*	1,7
10	27 ± 6	1,5	22 ± 4	1,2
11	13 ± 5	0,7	28 ± 4	1,6
12	14 ± 2	0,8	31 ± 4*	1,7
13	17 ± 4	0,9	15 ± 6	0,8
14	17 ± 3	0,9	28 ± 2	1,6
15 ^a	25 ± 5	1,3	29 ± 3	1,5
16	19 ± 6	1,0	32 ± 3*	1,8
17	21 ± 4	1,2	30 ± 3*	1,7
18	21 ± 5	1,2	26 ± 5	1,5
19	15 ± 7	0,8	34 ± 5**	1,9
20	13 ± 5	0,7	22 ± 2	1,2
21	15 ± 4	0,8	18 ± 5	1,0
22	18 ± 4	1,0	25 ± 3	1,4
23	14 ± 3	0,8	30 ± 1*	1,7

cd. Tab. 15

24	16 ± 2	0,9	27 ± 3	1,5
25	17 ± 5	0,9	33 ± 5**	1,8
26	14 ± 6	0,8	12 ± 3	0,7
27	29 ± 3*	1,6	8 ± 1	0,5
28	18 ± 2	1,0	28 ± 3	1,6
29	10 ± 2	0,6	13 ± 6	0,7
30	9 ± 1*	0,5	20 ± 4	1,1
31	8 ± 4*	0,4	13 ± 2	0,7
32	18 ± 2	1,0	4 ± 1**	0,2
33	12 ± 2	0,7	11 ± 3	0,6
34	19 ± 2	1,0	18 ± 3	1,0
35	14 ± 5	0,8	11 ± 2	0,6
36	7 ± 3**	0,4	10 ± 4	0,6
ARP	14 ± 4	0,8	31 ± 1*	1,7
NQNO	36 ± 7***##	2,0	98 ± 12***###	5,4

Średnią obliczono na podstawie eksperymentów wykonanych niezależnie w trzykrotnych powtórzeniach w tripletach ± odchylenie standardowe(SD); liczba kolonii jest średnią liczbą kolonii na szalce wyrosłych w obecności mutagenu wzorcowego (NQNO) lub substancji badanej; **DMSO**, **H₂O** – kontrola negatywna; **NQNO** (*N*-tlenek-*N*-nitrochinoliny, 4 µg%; 50 µg%) – kontrola pozytywna; **ARP** – arypiprazol. Różnica statystycznie istotna w stosunku do DMSO: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; różnica statystycznie istotna w stosunku do H₂O: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$.^aRoztwory podstawowe związków testowych przygotowano w wodzie.

2.2. Test *Vibrio harveyi*

Test *Vibrio harveyi* przeprowadzono stosując do wykrycia aktywności mutagennej szczep dziki BB7 oraz 3 jego genetyczne modyfikacje BB7M, BB7X i BB7XM. Każdy ze szczepów wykazuje odmienną wrażliwość na działanie mutagenów, co umożliwia wykrywanie szerokiego spektrum czynników modyfikujących strukturę DNA. Test *Vibrio harveyi* w swojej konstrukcji przypomina klasyczny test Amesa. Test ten został opracowany przede wszystkim z myślą o ocenie działania mutagennego zanieczyszczeń wody morskiej, gdyż szczepy *S. typhimurium* stosowane w teście Amesa mają ograniczoną przeżywalność w tym środowisku (Czyż i wsp., 2002).

Vibrio harveyi to Gram ujemne bakterie, żyjące w środowisku morskim. Bakterie *V. harveyi* są naturalnie wrażliwe na neomycynę, antybiotyk aminoglikozydowy, który wiąże się nieodwracalnie z podjednostką 30S bakteryjnego rybosomu, zaburzając proces translacji. Powoduje to syntezę białek o niewłaściwej sekwencji aminokwasowej. Zatem obecność neomycyny w podłożu hodowlanym uniemożliwia wzrost szczepów *V. harveyi* (Dahlberg, 1989; Podgórska i wsp., 2005). Plazmidowy gen oporności na neomycynę może zostać zaktywowany w wyniku różnorodnych mutacji, prowadzących do modyfikacji rybosomalnego RNA w miejscu odczytu informacji genetycznej. Stąd też pod wpływem danego mutagenu bakterie nabywają oporność na neomycynę, co prowadzi do ich wzrostu na pożywce wzbogaconej o ten antybiotyk (Czyż i Węgrzyn, 2003).

Związki **1-36** badano w zalecanym przez autorów testu stężeniu 4 µg%, względem referencyjnego mutagenu NQNO (Czyż i wsp., 2000; 2002; Piosik i wsp., 2003; Węgrzyn i Czyż 2003; Podgórska i wsp., 2005; Ułanowska i Węgrzyn 2006; Słoczyńska i wsp., 2010).

Interpretację wyników uzyskanych w teście *Vibrio harveyi*, można również przedstawić w oparciu o analizę statystyczną. Analiza statystyczna dotyczyła określenia istotności różnic pomiędzy średnią liczbą kolonii mutantów neomycynoopornych uzyskaną dla badanych związków względem kontroli pozytywnej (NQNO) (Węgrzyn i Czyż 2003; Ułanowska i Węgrzyn 2006; Słoczyńska i wsp., 2014a). Analiza statystyczna zależności między średnią liczbą kolonii mutantów neomycynoopornych dla badanych związków w stosunku do kontroli pozytywnej – NQNO, dała wartości istotne statystycznie ($p < 0,05$), co wskazuje na brak właściwości mutagennych badanych związków (Tabela 16, str. 93). Jedynie dla zw. **13**, w przypadku tylko jednego szczepu (BB7XM), nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy między średnią liczbą kolonii mutantów neomycynoopornych względem NQNO, co może świadczyć o jego potencjale mutagennym.

Wyniki zinterpretowano także posługując się współczynnikiem mutagenności MI, analogicznie do klasycznego testu Ames. Na podstawie analizy współczynnika mutagenności związków badanych w teście *V. harveyi* (Tabela 16, str. 93) można stwierdzić, że wszystkie badane związki **1-36** były pozbawione

właściwości mutagennych. Nie obserwowano, aby liczba kolonii mutantów neomycynoopornych wyrosłych na podłożu BOSS z neomycyną w obecności badanych związków przekroczyła liczbę mutantów neomycynoopornych indukowanych w obecności NQNO. Wszystkie badane związki wykazywały $MI < 2$, co wskazuje na brak właściwości mutagennych.

Tabela 16. Aktywność mutagenna związków (1-36) w teście *Vibrio harveyi*.

Nr zw.	Test <i>Vibrio harveyi</i>							
	Liczba mutantów/płytkę							
	BB7		BB7X		BB7M		BB7XM	
	Średnia ± SD	MI	Średnia ± SD	MI	Średnia ± SD	MI	Średnia ± SD	MI
NQNO	45 ± 3	2,1	38 ± 5	2,1	45 ± 4	2,0	37 ± 3	2,1
1	26 ± 4***	1,4	23 ± 4***	1,4	21 ± 2***	1,1	23 ± 2***	1,4
2 ^a	21 ± 3***	1,0	25 ± 4***	1,4	27 ± 2***	1,2	11 ± 1***	0,6
3	15 ± 2***	0,8	22 ± 2***	1,4	30 ± 3***	1,5	18 ± 3***	1,1
4	21 ± 2***	1,1	23 ± 4***	1,4	24 ± 4***	1,2	27 ± 4***	1,7
5	20 ± 5***	1,1	24 ± 3***	1,5	23 ± 2***	1,2	30 ± 2*	1,9
6	22 ± 3***	1,2	25 ± 4***	1,6	27 ± 4***	1,4	28 ± 5**	1,8
7	24 ± 3***	1,3	13 ± 3***	0,8	16 ± 2***	0,8	26 ± 2***	1,6
8	25 ± 3***	1,3	15 ± 3***	0,9	20 ± 3***	1,0	26 ± 4***	1,6
9	16 ± 3***	0,8	20 ± 2***	1,3	26 ± 5***	1,3	24 ± 2***	1,5
10	26 ± 4***	1,4	26 ± 3***	1,6	13 ± 3***	0,7	28 ± 3**	1,8
11	26 ± 3***	1,4	25 ± 5***	1,6	26 ± 2***	1,3	26 ± 4***	1,6
12	29 ± 3***	1,5	23 ± 2***	1,4	14 ± 2***	0,7	29 ± 4*	1,8
13	25 ± 4***	1,3	16 ± 2***	1,0	17 ± 3***	0,9	31 ± 2	1,9
14	22 ± 2***	1,2	17 ± 3***	1,1	21 ± 2***	1,1	26 ± 3***	1,6
15 ^a	21 ± 3***	1,0	24 ± 2***	1,3	28 ± 3***	1,3	29 ± 4*	1,6
16	25 ± 2***	1,3	18 ± 2***	1,1	18 ± 2***	0,9	26 ± 3***	1,6
17	24 ± 2***	1,3	22 ± 5***	1,4	23 ± 3***	1,2	27 ± 3***	1,7
18	19 ± 3***	1,0	23 ± 2***	1,4	21 ± 3***	1,1	27 ± 1***	1,7
19	26 ± 3***	1,4	20 ± 2***	1,3	18 ± 3***	0,9	25 ± 3***	1,6
20	18 ± 2***	0,9	20 ± 3***	1,3	27 ± 2***	1,4	22 ± 1***	1,4
21	35 ± 5**	1,8	27 ± 2***	1,7	31 ± 4***	1,6	27 ± 2***	1,7

cd. Tab. 16

22	30 ± 4***	1,6	29 ± 3***	1,8	33 ± 3***	1,7	26 ± 3***	1,6
23	34 ± 4***	1,8	22 ± 3***	1,4	38 ± 2*	1,9	28 ± 4**	1,8
24	29 ± 3***	1,5	30 ± 3**	1,9	34 ± 4***	1,7	30 ± 4*	1,9
25	32 ± 5***	1,7	22 ± 3***	1,4	31 ± 3***	1,6	22 ± 3***	1,4
26	16 ± 1***	0,8	20 ± 2***	1,3	17 ± 1***	0,9	19 ± 3***	1,2
27	20 ± 3***	1,1	7 ± 2***	0,4	32 ± 3***	1,6	29 ± 2*	1,8
28	18 ± 3***	0,9	10 ± 2***	0,6	33 ± 3***	1,7	24 ± 3***	1,5
29	28 ± 2***	1,5	29 ± 3**	1,8	36 ± 2**	1,8	30 ± 3*	1,9
30	27 ± 3***	1,4	24 ± 2***	1,5	33 ± 4***	1,7	16 ± 3***	1,0
31	28 ± 4***	1,5	18 ± 3***	1,1	35 ± 5**	1,8	26 ± 2***	1,6
32	30 ± 4***	1,6	23 ± 4***	1,4	36 ± 4**	1,8	26 ± 4***	1,6
33	17 ± 3***	0,9	10 ± 2***	0,6	24 ± 2***	1,2	20 ± 3***	1,3
34	18 ± 2***	0,9	23 ± 3***	1,4	30 ± 3***	1,5	28 ± 3**	1,8
35	32 ± 4***	1,7	18 ± 3***	1,1	29 ± 1***	1,5	22 ± 2***	1,4
36	29 ± 4***	1,5	24 ± 3***	1,5	33 ± 4***	1,7	27 ± 4***	1,7
ARP	12 ± 3***	0,6	22 ± 3***	1,4	17 ± 3***	0,9	20 ± 2***	1,3
DMSO	19 ± 3***		16 ± 2***		20 ± 3***		16 ± 2***	
H₂O	21 ± 4***		18 ± 3***		22 ± 2***		18 ± 2***	

Średnią obliczono na podstawie eksperymentów wykonanych niezależnie w trzykrotnych powtórzeniach w tripletach ± odchylenie standardowe; liczba kolonii jest średnią liczbą kolonii na szalce wyrosłych w obecności mutagenu wzorcowego (NQNO) lub substancji badanej; **NQNO** (*N*-tlenek-*N*-nitrochinoliny, 4 µg%) – kontrola pozytywna; **DMSO**, **H₂O** – kontrola negatywna; **MI** – współczynnik mutagenności, **ARP** – arypiprazol. Różnica statystycznie istotna w stosunku do kontroli pozytywnej (NQNO): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. ^aRoztwory podstawowe związków testowych przygotowano w wodzie.

2.3. Test *Vibrio harveyi* w wersji mikroplótkowej

W celu skrócenia 4-dniowej procedury i zwiększenia przepustowości testu *Vibrio harveyi* podjęto próbę opracowania mikroplótkowej jego wersji. Eksperymenty przeprowadzono wykorzystując szczep dziki *V. harveyi* BB7, który odznacza się optymalnym tempem wzrostu i stanowi nieodłączny element panelu szczepów *V. harveyi* wykorzystywanych w ocenie działania mutagennego zanieczyszczeń środowiskowych. Związki **1-36** testowano w stężeniu 4 µg% względem 3 diagnostycznych mutagenów: *N*-tlenku-*N*-nitrochinoliny (NQNO), azydku sodu (AS) oraz 4-nitro-*O*-fenylenodiaminy (4-NPD).

Doświadczalnie ustalono wartości kilku kluczowych parametrów dla wersji mikroplótkowej testu *Vibrio harveyi*:

- optymalną gęstość optyczną hodowli wstępnej *V. harveyi* ($OD_{600} \approx 2$)
- objętość hodowli wstępnej *V. harveyi* (15 µl), którą należy odpipetować do poszczególnych dołków mikroplótki
- gęstość optyczną hodowli *V. harveyi*, przy której komórki zostają poddawane działaniu neomycyny ($OD_{600} \approx 0,2$)
- czas trwania inkubacji związków badanych na podłożu BOSS z neomycyną (2 godz.).

Na podstawie analizy przyrostu biomasy (OD_{600}) hodowli *V. harveyi* z badanym związkiem w obecności neomycyny (Δ_B i Δ_M) (Tabela 17, str. 96) stwierdzono, że substancje **1-36** podobnie, jak w przypadku testu *Vibrio harveyi* w wersji kolbkowo-plótkowej, nie wykazywały potencjału mutagennego względem żadnego z testowanych mutagenów wzorcowych (NQNO, AS, 4-NPD), $\Delta_B < \Delta_M$.

Interpretację wyników uzyskanych w mikroplótkowym teście *Vibrio harveyi*, przedstawiono także w oparciu o analizę statystyczną. Analiza statystyczna dotyczyła określenia istotności różnic pomiędzy średnią wartością OD_{600} uzyskaną dla hodowli *V. harveyi* w obecności badanych związków względem kontroli pozytywnej, którą stanowiły trzy, niezależnie testowane mutageny wzorcowe (NQNO, AS, 4-NPD) wspólnie z neomycyną. Dla wszystkich testowanych połączeń **1-36** średnia wartość OD_{600} była istotnie niższa w porównaniu do kontroli pozytywnej (NQNO, AS, 4-NPD), co wskazuje na brak właściwości mutagennych badanych związków (Tabela 17, str. 96).

Tabela 17. Aktywność mutagenna związków (1-36) w mikropłytkowym teście *Vibrio harveyi*.

Nr zw.	Mikropłytkowy test <i>Vibrio harveyi</i>	
	Średnia OD ₆₀₀ ± SD	Δ
NQNO	0,38 ± 0,02	0,18
AS	0,43 ± 0,01	0,23
4-NPD	0,4 ± 0,03	0,20
1	0,24 ± 0,01*****^^^	0,04
2	0,23 ± 0,01*****^^^	0,03
3	0,28 ± 0,02*****^^^	0,08
4	0,23 ± 0,01*****^^^	0,03
5	0,22 ± 0,01*****^^^	0,02
6	0,27 ± 0,02*****^^^	0,07
7	0,28 ± 0,03*****^^^	0,08
8	0,24 ± 0,01*****^^^	0,04
9	0,24 ± 0,02*****^^^	0,04
10	0,26 ± 0,01*****^^^	0,06
11	0,21 ± 0,02*****^^^	0,01
12	0,22 ± 0,01*****^^^	0,02
13	0,26 ± 0,01*****^^^	0,06
14	0,23 ± 0,01*****^^^	0,03
15	0,25 ± 0,03*****^^^	0,05
16	0,3 ± 0,02*****^^^	0,10
17	0,29 ± 0,03*****^^^	0,09
18	0,22 ± 0,02*****^^^	0,02
19	0,25 ± 0,05*****^^^	0,05
20	0,27 ± 0,02*****^^^	0,07
21	0,23 ± 0,03*****^^^	0,03
22	0,21 ± 0,02*****^^^	0,01
23	0,23 ± 0,03*****^^^	0,03
24	0,26 ± 0,03*****^^^	0,06
25	0,22 ± 0,06*****^^^	0,02
26	0,26 ± 0,03*****^^^	0,06
27	0,27 ± 0,02*****^^	0,07
28	0,26 ± 0,07*****^^^	0,06
29	0,2 ± 0,02*****^^^	0,00
30	0,21 ± 0,03*****^^^	0,01

cd. Tab. 17

31	0,26 ± 0,02#####^^^	0,06
32	0,22 ± 0,01#####^^^	0,02
33	0,22 ± 0,02#####^^^	0,02
34	0,3 ± 0,03#####^^^	0,1
35	0,32 ± 0,02#####^^^	0,12
36	0,22 ± 0,02#####^^^	0,02
ARP	0,27 ± 0,02#####^^^	0,07
∅	0,36 ± 0,02###	0,16

Średnią obliczono na podstawie eksperymentów wykonanych niezależnie w trzykrotnych powtórzeniach w tripletach ± odchylenie standardowe, **∅** (hodowla bakteryjna na podłożu BOSS) – próba ślepa, **NQNO** (*N*-tlenek-4-nitrochinoliny, 4 µg%) – kontrola pozytywna, **AS** – azydek sodu, **4-NPD** – 4-nitro-*O*-fenylenodiamina, **ARP** – arypiprazol. **Δ** = OD₆₀₀ związku **1-36** lub mutagenu – 0,2. Różnica statystycznie istotna w stosunku do kontroli pozytywnej (NQNO): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Różnica statystycznie istotna w stosunku do AS: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$. Różnica statystycznie istotna w stosunku do 4-NPD: ^ $p < 0,05$; ^^ $p < 0,01$; ^^ ^ $p < 0,001$.

3. Ocena aktywności genotoksycznej

Do oszacowania aktywności genotoksycznej wybranych związków projektowych użyto komercyjnego testu SOS/*umu*, który opiera się na indukcji ekspresji genu *UmuC* w operonie SOS przez czynniki uszkodzające DNA. Genotoksyczność w tym teście objawia się wzrostem aktywności wewnątrzkomórkowej β -galaktozydazy, a jej miarą jest współczynnik IR. Szczep testowy *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002, dzięki licznym modyfikacjom genetycznym posiada wysoką czułość względem szerokiego spektrum genotoksyn.

Do oceny aktywności genotoksycznej wytypowano spośród badanych związków, przedstawicieli z grupy aminoalkanoli: **3-5**, **7-12**, **14-20** oraz z grupy pochodnych aryloksyetylo amin alicyklicznych: **21-28**. Związki testowano w dwóch stężeniach: 4 $\mu\text{g}\%$ i 50 $\mu\text{g}\%$, a potencjał genotoksyczny oceniano względem NQNO.

Na podstawie analizy wyników otrzymanych dla testowanych połączeń w mikroplótkowym teście SOS/*umu* stwierdzono, że badane związki w zastosowanych stężeniach nie wykazywały aktywności genotoksycznej. Ich współczynnik indukcji IR nie przekroczył wartości granicznej wynoszącej 1,5, a aktywność β -galaktozydazy wahała się w granicach od 0,2 do 1,8. Dla połączeń **12** i **24** w żadnym z zastosowanych stężeń nie odnotowano aktywności β -galaktozydazy, co świadczy o braku indukcji układu *UmuC-LacZ*, związki te nie naruszyły stabilności nici DNA. Natomiast w stężeniu 50 $\mu\text{g}\%$ współczynnik biomasy (GF) dla związku **12** wynosił 0,3 co oznacza, że związek ten posiada właściwości cytotoksyczne (Tabela 18).

Tabela 18. Genotoksyczność związków **3-5**, **7-12**, **14-28** w teście SOS/*umu*.

Nr zw.	Test SOS/ <i>umu</i>					
	4 $\mu\text{g}\%$			50 $\mu\text{g}\%$		
	GF	U_{β}	IR	GF	U_{β}	IR
NQNO	0,5	5,4	9,0	0,7	1,8	2,8
3	1,3	0,7	1,1	1,3	0,4	0,6
4	1,4	0,7	1,2	1,3	0,7	1,0
5	1,0	0,5	0,9	0,8	0,6	0,9
7	1,4	0,7	1,1	1,3	0,4	0,6

cd. Tab. 18

8	1,3	0,5	0,9	1,4	0,6	1,0
9	1,2	1,8	1,4	1,3	0,7	1,1
10	0,9	0,4	0,7	0,8	0,5	0,8
11	1,0	0,4	0,7	0,8	0,5	0,8
12	0,9	-	-	0,3	-	-
14	1,3	0,6	0,9	1,4	0,6	1,0
15	1,1	0,8	1,4	1,0	0,6	1,0
16	0,8	0,2	0,3	1,0	0,2	0,4
17	0,6	0,7	1,2	0,5	0,4	0,6
18	1,1	0,7	0,8	0,8	0,6	0,9
19	0,9	0,3	0,4	0,9	0,8	1,4
20	1,0	0,6	1,1	1,0	0,7	1,2
21	1,3	0,3	0,3	0,5	0,4	0,6
22	1,3	0,5	0,9	1,4	0,6	1,0
23	1,1	1,5	1,4	1,0	0,6	1,0
24	0,8	-	-	0,4	-	-
25	0,9	0,6	0,8	1,4	0,6	1,0
26	1,0	0,5	0,8	1,1	0,7	1,2
27	0,9	0,1	0,2	1,0	0,2	0,4
28	1,0	0,2	0,4	0,9	0,4	0,7

NQNO (*N*-tlenek-*N*-nitrochinoliny, 4 µg%; 50 µg%) – kontrola pozytywna; **IR** – współczynnik indukcji, **U_β** – aktywności β-galaktozazy, **GF** – współczynnik biomasy. GF < 0,5 – efekt cytotoksyczny, IR > 1,5 – efekt genotoksyczny.

4. Ocena aktywności antymutagennej

Test Ames oraz test *Vibrio harveyi* pozwalają ocenić także inną, bardzo korzystną właściwość związków chemicznych, jaką jest antymutagenność. Działanie antymutagenne jest uznawane za jeden z mechanizmów aktywności chemoprewencyjnej. Związki o aktywności antymutagennej zapobiegają powstawaniu mutacji, co może stanowić jeden z pierwszych mechanizmów hamowania karcynogenezy.

Z badań nad właściwościami antymutagennymi wyeliminowano związki, dla których w teście Ames analiza statystyczna zasugerowała potencjał mutageny. Badanie potencjału antymutagennego przeprowadzono tylko dla tych połączeń, które nie wykazywały właściwości mutagennych zarówno w testach Ames i *Vibrio harveyi* (**1-4, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 18, 20-22, 24, 26, 28, 29, 32-36**). Do oszacowania działania antymutagennego wskazanych związków wykorzystano zmodyfikowaną wersję testu Ames oraz testu *Vibrio harveyi*. Modyfikacja ta polega na wspólnej inkubacji, w jednej pożywce hodowlanej, badanego związku z mutagenem.

Wytypowane związki wykazywały potencjał antymutageny od słabego do silnego, wobec szczepu testowego *S. typhimurium* TA100. Inhibicja działania mutagennego wynosiła od 6 – 71 %. Silnym działaniem antymutagennym w teście Ames, w obu badanych stężeniach charakteryzowało się sześć pochodnych: **1-3, 22, 29 i 33** (inhibicja działania mutagennego na poziomie 41 – 69 %) (Tabela 19, str. 101).

W teście *Vibrio harveyi* silnym działaniem antymutagennym charakteryzowało się dziewięć pochodnych: **1, 2, 4, 10, 11, 15, 26, 32 i 33** (% hamowania działania mutagennego zanotowano na poziomie 42 – 84 %) (Tabela 19, str. 101).

Na podstawie uzyskanych wyników, wyselekcjonowano trzy pochodne: **1, 2 i 33** o wysokiej aktywności antymutagennej, potwierdzonej w obu przeprowadzonych testach.

Tabela 19. Aktywność antymutagenna wyselekcjonowanych związków w teście Ames i teście *Vibrio harveyi*.

Nr zw.	Test Ames				Test <i>Vibrio harveyi</i>							
					Liczba mutantów/płytkę							
	4 µg%		50 µg%		BB7		BB7X		BB7M		BB7XM	
	Średnia ± SD	Inhib (%)	Średnia ± SD	Inhib (%)	Średnia ± SD	Inhib (%)	Średnia ± SD	Inhib (%)	Średnia ± SD	Inhib (%)	Średnia ± SD	Inhib (%)
NQNO	34 ± 3		85 ± 7		38 ± 3		31 ± 2		45 ± 5		31 ± 4	
1	20 ± 5**	(41)	45 ± 5***	(47)	11 ± 3***	(71)	23 ± 5	(26)	11 ± 1***	(75)	16 ± 4**	(48)
2	16 ± 3***	(53)	38 ± 8***	(55)	9 ± 2***	(76)	29 ± 3	(7)	14 ± 3***	(69)	18 ± 4**	(42)
3	19 ± 3**	(44)	26 ± 5***	(69)	11 ± 3***	(71)	29 ± 4	(7)	14 ± 2***	(69)	29 ± 12	(6)
4	27 ± 4	(21)	67 ± 10	(21)	16 ± 3***	(58)	16 ± 1**	(48)	12 ± 3***	(73)	18 ± 4**	(42)
6	17 ± 5***	(50)	61 ± 13*	(28)	5 ± 2***	(87)	24 ± 4	(23)	22 ± 2***	(51)	27 ± 3	(13)
10	20 ± 5**	(41)	77 ± 8	(9)	7 ± 2***	(82)	19 ± 3*	(39)	17 ± 4***	(62)	18 ± 2**	(42)
11	21 ± 3**	(38)	70 ± 11	(18)	7 ± 1***	(82)	15 ± 1***	(52)	11 ± 2***	(75)	21 ± 3*	(32)
13	22 ± 3*	(35)	25 ± 4***	(71)	14 ± 2***	(63)	49 ± 5***	(0)	28 ± 4***	(38)	27 ± 2	(13)
14	28 ± 4	(18)	33 ± 4***	(61)	6 ± 2***	(84)	27 ± 3	(13)	30 ± 5***	(33)	23 ± 6	(26)
15	10 ± 4***	(71)	66 ± 5	(22)	16 ± 3***	(58)	11 ± 3***	(65)	12 ± 2***	(73)	29 ± 5	(6)
18	25 ± 7	(26)	25 ± 4***	(71)	10 ± 2***	(74)	47 ± 15***	(0)	22 ± 3***	(51)	33 ± 2	(0)
20	22 ± 3*	(35)	27 ± 4***	(68)	15 ± 3***	(61)	49 ± 3***	(0)	28 ± 3***	(38)	38 ± 4	(0)
21	21 ± 3**	(38)	42 ± 10***	(51)	20 ± 3***	(47)	21 ± 3*	(32)	16 ± 4***	(64)	25 ± 2	(19)
22	12 ± 3***	(65)	46 ± 5***	(46)	19 ± 5***	(50)	24 ± 5	(23)	19 ± 7***	(58)	20 ± 4**	(35)
24	21 ± 5**	(38)	51 ± 6***	(40)	32 ± 4	(16)	22 ± 6*	(29)	18 ± 5***	(60)	21 ± 5*	(32)

cd. Tab. 19

26	18 ± 4***	(47)	59 ± 7**	(31)	16 ± 1***	(58)	20 ± 2**	(36)	17 ± 1***	(62)	16 ± 4***	(48)
28	36 ± 5	(6)	76 ± 11	(11)	30 ± 6	(21)	30 ± 7	(3)	28 ± 2***	(38)	24 ± 6	(23)
29	17 ± 2***	(50)	48 ± 9***	(44)	17 ± 7***	(55)	19 ± 5**	(39)	34 ± 4**	(24)	18 ± 4***	(42)
32	25 ± 4**	(26)	37 ± 6***	(56)	19 ± 6***	(50)	17 ± 7***	(45)	28 ± 5***	(38)	16 ± 5***	(48)
33	17 ± 3***	(50)	43 ± 3***	(49)	6 ± 5***	(84)	8 ± 2***	(74)	9 ± 4***	(80)	14 ± 1***	(55)
34	27 ± 2*	(21)	56 ± 13**	(34)	18 ± 2***	(53)	30 ± 3	(3)	31 ± 7***	(31)	23 ± 3**	(26)
35	24 ± 3**	(29)	47 ± 7***	(45)	24 ± 4**	(37)	23 ± 5	(26)	29 ± 5***	(36)	18 ± 2***	(42)
36	25 ± 3**	(26)	43 ± 9***	(49)	14 ± 6***	(63)	20 ± 6*	(36)	34 ± 4**	(24)	12 ± 2***	(61)
DMSO	14 ± 2		17 ± 3		12 ± 4		13 ± 2		16 ± 2		14 ± 1	
H₂O	17 ± 3		12 ± 3		17 ± 3		21 ± 5		14 ± 2		18 ± 2	

Średnią obliczono na podstawie eksperymentów wykonanych niezależnie w dwu lub trzykrotnych powtórzeniach w tripletach ± odchylenie standardowe (SD); liczba kolonii jest średnią liczbą kolonii na szalce wyrosłych w obecności mutagenu wzorcowego (NQNO) i substancji badanej; **DMSO**, **H₂O** – kontrola negatywna; **NQNO** (*N*-tlenek-4-nitrochinoliny, 4 µg%, 50 µg%) – kontrola pozytywna; **Inhib (%)** – procent hamowania mutagenyzy (%), **ARP** – arypiprazol.

V Diskusja

Działania toksyczne, obok braku efektywności i niewłaściwego profilu ADME są jedną z głównych przyczyn niepowodzeń podczas rozwoju nowych potencjalnych leków. Wybór molekuł do dalszych etapów badań zależy od zbalansowania ich aktywności w miejscu działania, selektywności, preferowanych właściwości ADME z ich bezpieczeństwem. Obowiązujące prawo wymaga, aby wszystkie nowe związki o charakterze potencjalnych leków, podlegały szeroko zakrojonym badaniom w celu oceny aktywności mutagennej i genotoksycznej, przed skierowaniem ich do badań klinicznych. Wytyczne OECD dotyczące metod oceny bezpieczeństwa potencjalnych leków, kładą duży nacisk na rozwój i walidację metod alternatywnych w stosunku do badań na zwierzętach (Cimino i wsp., 2006; MacGregor i wsp., 2015b).

Podstawą badań alternatywnych są eksperymenty prowadzone w warunkach *in silico* oraz *in vitro*. Ocena działań toksycznych w warunkach *in silico* jest obecnie wykorzystywana jako dodatkowe, równoległe do doświadczeń *in vitro* źródło informacji (Erickson, 2010; Gollapudi i wsp., 2013). Zastosowanie tego rodzaju metod pozwala na zminimalizowanie użycia zwierząt doświadczalnych przez ukierunkowanie badań lub eliminację cząsteczek toksycznych już na wczesnych etapach projektu. Drugim kierunkiem badań alternatywnych są metody oceny bezpieczeństwa w warunkach *in vitro*. Opierają się na fakcie uniwersalności DNA, jako materiału genetycznego wszystkich organizmów żywych. Pozwala to na wykrywanie właściwości mutagennych związków chemicznych i ich mieszanin dzięki zastosowaniu różnych systemów badawczych, np. bakterii, drożdży, owadów, czy kultur komórek ssaków, a następnie ekstrapolowanie otrzymanych wyników na organizm człowieka. W badaniach tych kluczową pozycję zajmują bakteryjne testy krótkoterminowe, które służą do wstępnej selekcji związków chemicznych przed dalszymi badaniami. Jednak, żadna z obecnie znanych metod oceny mutagenności i genotoksyczności związków chemicznych nie spełnia warunków idealnego systemu badawczego i dlatego też jedynie wyniki uzyskane w doświadczeniach wielotestowych pozwalają na identyfikację większości mutagenów (MacGregor i wsp., 2015a).

Wraz z rozwojem biologii molekularnej powstają wciąż nowe testy bakteryjne, w których precyzyjnie można określić rodzaj uszkodzeń DNA wywoływanych przez konkretny związek chemiczny. Najczęściej stosowanymi testami bakteryjnymi są test Ames, SOS-Chromotest oraz test SOS/*umu* (Reifferscheid i wsp., 1991; Gee i wsp., 1998; Kaur i wsp., 2012). Test Ames uznawany za referencyjny, jest powszechnie wykorzystywany w laboratoriach do oszacowania aktywności mutagennej zarówno nowych związków chemicznych, jak i kandydatów na lek (Mortelmans i Zeiger 2000). Określa poziom mutacji powrotnych z histydynowej auktrofii do protrofii u specjalnie skonstruowanych mutantów szczepów *Salmonella typhimurium* LT2. Test Ames jest łatwy do wykonania, tani i szybki. Wadą jest to, że nie identyfikuje wszystkich zmian w DNA komórkowym zachodzących pod wpływem substancji mutagennych. Dlatego stosuje się go, jako jeden spośród kilku testów oceniających mutagenność określonych związków chemicznych (Gollapudi i wsp., 2013; Johnson i wsp., 2014; MacGregor i wsp., 2015a). Zaletą testu jest możliwość wstępnego metabolizowania badanych związków chemicznych lub mieszanin, otrzymanie odpowiedzi w ciągu 48 godzin, duża zgodność z testami prowadzonymi na zwierzętach, szacowana w przypadku halogenków na 54 %, a dla pozostałych badanych substancji do 93 % (Fluckiger-Isler i wsp., 2004). Został on wprowadzony na dużą skalę w połowie lat siedemdziesiątych i przebadano nim największą liczbę związków chemicznych.

W ramach pracy do oznaczenia właściwości mutagennych badanych związków wybrano test *Vibrio harveyi*, który do tej pory był wykorzystywany przede wszystkim do wykrywania mutagenów wody morskiej w zakresie badań środowiskowych (Piosik i wsp., 2003; Ułanowska i wsp., 2005a; Ułanowska i wsp., 2005b; Ułanowska i Węgrzyn, 2006; Ułanowska i wsp., 2007). W 2000 roku grupa naukowców z Zakładu Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego we współpracy z Instytutem Oceanologii Polskiej Akademii Nauk z Gdańska pod kierunkiem profesora Grzegorza Węgrzyna opracowała i zoptymalizowała ten test, pozwalający na detekcję substancji o charakterze mutagennym w oparciu o zmodyfikowane genetycznie szczepy morskiej bakterii *V. harveyi* (Czyż i wsp., 2000; Podgórska i wsp., 2005). Test *Vibrio harveyi* jest metodą prostą, szybką i nie wymagającą specjalnych nakładów finansowych. Wśród jego zalet wymienia się m.in. niepatogenność szczepu dla człowieka oraz łatwość namnażania bakterii

w warunkach laboratoryjnych (Ułanowska i wsp., 2005a). Ponadto wykazano, iż czułość testu jest porównywalna z czułością testu Ames, a w przypadku niektórych mutagenów może być wyższa (Czyż i wsp., 2002). Fakt ten można wytłumaczyć znacznie większą przepuszczalnością otoczki *V. harveyi* dla dużych molekuł, w porównaniu do otoczki *Salmonella typhimurium* (Podgórska i wsp., 2005; Ułanowska i wsp., 2005b; Ułanowska i wsp., 2007).

Badanie mutagenności

Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej objęły bardzo zróżnicowaną pod względem strukturalnym grupę związków wykazujących aktywność w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, od działania przeciwdrgawkowego przez przeciwdepresyjne, przeciwlękowe po przeciwpsychotyczne. Dla związków **1-36** oszacowano aktywność mutageną stosując metody alternatywne *in silico* i *in vitro*.

Wysymulowane komputerowo wyniki (OSIRIS) poddano weryfikacji poprzez porównanie z danymi otrzymanymi eksperymentalnie (test Ames i *Vibrio harveyi*). Wyniki oceny potencjału mutagennego zaproponowane dla związków **1-36** w badaniu *in silico* nie były całkowicie zgodne z rezultatami *in vitro*. Program OSIRIS wytypował spośród testowanych związków cztery (**15, 20, 33, 34**), które są obdarzone potencjałem mutagennym, jednak wyniki badań *in vitro* tych przewidywań nie potwierdziły.

W ramach badań *in vitro* doświadczalnie oszacowano potencjał mutageny związków **1-36** stosując test *Vibrio harveyi*, najpierw w wersji kolbkowo-płytkowej, a następnie mikropłytkowej. W celu ustalenia przydatności tego testu do badania mutagenności nowych związków o potencjalnym działaniu biologicznym, uzyskane wyniki odniesiono do tych, które otrzymano w teście Ames w stosunku do podstawowego szczepu *S. typhimurium* TA100, należącego do standardowego panelu szczepów testowych w tej metodzie oraz w teście SOS/*umu* wykorzystanego do badania genotoksyczności (*S. typhimurium* TA1535/pSK1002).

Interpretacji wyników aktywności mutagennej zarówno w teście Ames, jak i *Vibrio harveyi* dla związków **1-36** dokonano w oparciu o analizę statystyczną oraz analizę wartości współczynnika MI, ze względu na dużą dowolność

prezentowania wyników przez różnych autorów w literaturze (Biso i wsp., 2010; Turhan i wsp., 2012; Espanha i wsp., 2014; Resende i wsp., 2015).

Analiza wyników mutagenności w oparciu o wartość współczynnika MI związków **1-36** zarówno w teście Ames, jak i *Vibrio harveyi* dowiodła, że w badanych stężeniach żaden ze związków nie był obdarzony aktywnością mutageną, ponieważ wartości MI < 2.

Interpretacja wyników badań nad mutagennością uzyskanych w teście Ames oraz *Vibrio harveyi* na podstawie analizy statystycznej nie była już tak jednoznaczna. Wyniki analizy statystycznej uzyskane dla testu *Vibrio harveyi* potwierdziły bezsprzecznie rezultaty otrzymane w oparciu o analizę współczynnika mutagenności MI. Tylko dla związku **13**, w przypadku jednego szczepu (BB7XM) na cztery nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy średnią liczbą kolonii mutantów neomycynoopornych względem wzorcowego mutagenu, NQNO.

Natomiast w teście Ames, analiza statystyczna zależności między średnią liczbą kolonii rewertantów *his⁺* w stosunku do DMSO (rozpuszczalnika), aż dla jedenastu związków i leku referencyjnego dała wartości znamienne wyższe, co mogłoby sugerować właściwości mutagenne. Jednak na podstawie otrzymanych wyników nie stwierdzono zależności pomiędzy liczbą rewertantów *his⁺*, a wzrostem stężenia substancji badanej (Biso i wsp., 2010; Turhan i wsp., 2012; Espanha i wsp., 2014; Akyıl i wsp., 2015; Resende i wsp., 2015; Silveira i wsp., 2016). Potwierdzeniem działania mutagennego dla testowanych związków jest wykazanie istotności wyników dla więcej niż jednego stężenia badanej substancji i wykazanie zależności typu stężenie-aktywność mutagenna (Mortlemans i Zeiger, 2000).

Rzetelność i wiarygodność wyników uzyskanych w teście *Vibrio harveyi* zweryfikowano także przez porównanie z danymi otrzymanymi w teście SOS/*umu*. Badane związki (**3-5**, **7-12**, **14-28**) w stężeniach 4 µg% i 50 µg% nie wykazywały potencjału genotoksycznego. Współczynnik indukcji IR, dla tych związków nie przekroczył wartości granicznej wynoszącej 1,5. Jedynie związek **12** w wyższym stężeniu posiadał właściwości cytotoksyczne, co mogłoby skutkować poważnymi zaburzeniami na poziomie tkankowym.

Badanie antymutagenności

W środowisku człowieka stale wzrasta liczba czynników genotoksycznych, które są przyczyną uszkodzeń DNA i mogą prowadzić do powstawania mutacji i karcynogenezy (Miadokova i wsp., 2002; Gulluce i wsp., 2010). Egzo- i endogenne czynniki genotoksyczne mogą zwiększać ryzyko rozwoju nowotworów. Dlatego niezbędne jest poszukiwanie nowych związków, naturalnych bądź syntetycznych, które zapobiegają lub hamują proces karcynogenezy (Melo-Cavalcante i wsp., 2008; Słoczyńska i wsp., 2010; Słoczyńska i wsp., 2014b). Jednym z najbardziej obiecujących działań na rzecz zmniejszania ryzyka wystąpienia nowotworu jest chemoprewencja (Greenwald, 2001). Dzięki licznym obserwacjom klinicznym, jak również modelom doświadczalnym wiadomo, że nowotworzenie jest procesem wieloetapowym, mogącym rozpocząć się mutacją onkogeną (protoonkogenu i/lub genu supresorowego) DNA pojedynczej komórki. Zjawisko chemoprewencji zostało zdefiniowane, jako wykorzystanie naturalnych lub syntetycznych związków chemicznych w celu zahamowania, opóźnienia lub odwrócenia procesu karcynogenezy (Kelloff i wsp., 1994). Związki chemoprewencyjne charakteryzują się niską toksycznością, zdolnością unieszkodliwienia karcynogenów, jak również negatywnych skutków wywoływanych przez nie w komórce. Związki chemoprewencyjne można podzielić na dwie klasy: pierwsze, tzw. związki blokujące – hamujące etap inicjacji poprzez inhibicję aktywacji karcynogenów, drugie, tzw. związki supresyjne – hamujące proliferację komórek złośliwych podczas etapów promocji i progresji (Tsai i wsp., 1996; Dion i wsp., 1997; Ikken i wsp., 1999). Większość z tych substancji wykazuje złożony mechanizm działania. Czynniki chemoprewencyjne mogą działać przede wszystkim przez:

1. wiązanie mutagenów i zapobieganie ich wnikaniu do komórek
2. hamowanie replikacji DNA i proliferacji komórek
3. nasilanie procesów naprawy uszkodzeń DNA
4. „zmiatanie” wolnych rodników i niwelowanie stresu oksydacyjnego
5. hamowanie metabolicznej aktywacji promutagenów – hamowanie enzymów cytochromu P-450 oraz wzmaganie detoksykacji mutagenów przez indukcję enzymów II fazy

6. kierowanie zmienionych komórek na drogę apoptozy (Pesarini i wsp., 2013; Gulluce i wsp., 2010; Kaur i wsp., 2010; Hoffmann i wsp., 2003; Orhan i wsp., 2013; Turhan i wsp., 2012; Słoczyńska i wsp., 2014b).

Obecnie prowadzone są intensywne badania nad poszukiwaniem związków antymutagennych zdolnych do hamowania procesu nowotworowego. (Ferguson i Philpot 2008; El-Sayed i Hussin 2013a; El-Sayed i wsp., 2013b). W ostatnich latach podkreśla się także udział wolnych rodników i stresu oksydacyjnego w powstawaniu uszkodzenia mózgu przyczyniającego się do tworzenia sprzyjających warunków dla procesu epileptogenezy (Mishra i wsp., 2015; Tutanc i wsp., 2015). Kilkadziesiąt przeprowadzonych klinicznych i doświadczalnych badań wskazuje na znaczenie czynników stresu oksydacyjnego/obrony antyoksydacyjnej w padaczce. Nadprodukcja RFT podczas niedokrwienia i reperfuzji jest jedną z głównych przyczyn neurodegeneracji w komórkach hipokampa mogących prowadzić do epileptogenezy. Z tego powodu uzasadnione wydaje się poszukiwanie nowych związków chemoprewencyjnych, w tym także z grupy antymutagennych.

Możliwość badania właściwości antymutagennych połączeń **1-4, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 18, 20-22, 24, 26, 28, 29, 32-36**, które daje prosta modyfikacja testu Ames i *Vibrio harveyi*, zwłaszcza w powyższym kontekście, wydała się niezwykle interesująca. Okazało się, że związki te zarówno w teście Ames, jak i *Vibrio harveyi* wykazywały umiarkowane i silne działanie antymutagenne odpowiednio wobec szczepów *S. typhimurium* TA100 oraz *V. harveyi*: BB7, BB7M, BB7XM, BB7X.

Bardzo silnym działaniem antymutagennym w obu przeprowadzonych testach charakteryzowały się dwie pochodne z grupy aminoalkanoli: (*R*)-2-(2-(2-(2,6-dimetylofenoksy)etoksy)etyloamino)propan-1-ol (**1**), (*S*)-2-(2-(2-(2,6-dimetylofenoksy)etoksy)etyloamino)propan-1-ol (**2**) oraz związek (*N*-(3-(4-(2,3-dichlorofenylo)piperazin-1-yl)propylo)-7-chinolinosulfonamid) (**33**) należący do grupy pochodnych arypiprazolu. Związki te, jako substancje antymutagenne rokują bardzo dobrze, jako jedyne wykazywały wysoki procent hamowania potencjału mutagennego w stosunku do wszystkich testowanych szczepów. Otrzymane wyniki w zakresie szacowania antymutagenności, dla związków **1, 2** i **33**, zachęcają do dalszych poszerzonych badań nad ich mechanizmem działania chemoprewencyjnego. Związki te można uznać za struktury wiodące, które mogą

podlegać dalszej optymalizacji w celu osiągnięcia jeszcze korzystniejszego działania antymutagennego.

WNIOSKI:

1. Potwierdzono przydatność mikrobiologicznego testu *Vibrio harveyi* do szybkiej skryningowej oceny aktywności mutagennej nowych związków chemicznych o aktywności biologicznej.
2. Opracowano test mutagenności *Vibrio harveyi* w formie mikroplątki, pozwalający na skrócenie czasu trwania procedury oraz zwiększenie przepustowości badań.
3. Ustalono dużą przydatność mikrobiologicznego testu *Vibrio harveyi* w selekcji związków o wysokim potencjale antymutagennym.
4. Potwierdzono, że metody *in silico* pomagają wstępnie oszacować właściwości mutagenne, ale wyniki muszą być weryfikowane danymi eksperymentalnymi.

VI Podsumowanie

W części teoretycznej pracy przedstawiono zasadę alternatywnych metod oceny toksyczności potencjalnych substancji leczniczych, zamieszczono informacje zawarte w wytycznych OECD i ICH dotyczące metod oceny bezpieczeństwa substancji chemicznych oraz przybliżono zasady strategii badań przesiewowych mutagenności i genotoksyczności. Przedstawiono najważniejsze wymagania europejskiego standardu doświadczeń na zwierzętach (zasada 3R) wyznaczonego przez źródła międzynarodowe i unijne ze szczególnym uwzględnieniem aspektów humanitarno-prawnych zawartych w dyrektywie 2010/63/UE. Dokonano przeglądu literaturowego testów bakteryjnych i eukariotycznych oraz metod komputerowych, wykorzystywanych do oceny mutagenności i genotoksyczności potencjalnych substancji leczniczych.

Celem projektu obejmującego pracę doktorską było przeprowadzenie badań szacujących właściwości mutagenne i genotoksyczne dla 36 nowych związków chemicznych o ustalonej aktywności w ośrodkowym układzie nerwowym wybranymi metodami *in silico* oraz *in vitro*. Przedmiot badań stanowiły pochodne aminoalkanolowe wykazujące działanie przeciwdrgawkowe, sulfonamidowe pochodne aryloksyetylo amin alicyklicznych oraz sulfonamidowe pochodne aripiprazolu wykazujące potencjał terapeutyczny w leczeniu depresji, lęku oraz schizofrenii.

W ramach pracy przeprowadzono, także ocenę przydatności mikrobiologicznego testu *Vibrio harveyi* do szybkiej skryningowej oceny właściwości mutagennych nowych związków chemicznych o aktywności biologicznej.

W ramach badań własnych opracowano mikropłytkowy test *Vibrio harveyi*, pozwalający na wstępną ocenę działania mutagennego nowych połączeń chemicznych o aktywności biologicznej. Opracowanie mikropłytkowego testu *Vibrio harveyi* ma wiele zalet, wśród których wymienić należy m.in.: znaczne ograniczenie objętości wykorzystywanych mediów hodowlanych i odczynników, zmniejszenie ilości testowanych substancji mutagenów, szansa na jednoczesne testowanie wielu substancji, czy możliwość uzyskania wyniku w krótszym czasie.

Ze względu na prostą możliwość modyfikacji metodyki testu Ames oraz *Vibrio harveyi*, zbadano aktywność antymutagenną badanych związków (1-36).

Zgodność otrzymanych wyników w teście mutagenności *Vibrio harveyi* z testem Ames potwierdza bezpieczeństwo badanych połączeń (1-36) w odniesieniu do materiału genetycznego komórki. Brak aktywności mutagennej w teście *Vibrio harveyi* oraz w referencyjnym teście Ames, świadczy o prawidłowym funkcjonowaniu testu *Vibrio harveyi*, który może być wykorzystywany konkurencyjnie do powszechnie stosowanego i uznanego testu Ames.

Bakterie *V. harveyi* nie są patogene w stosunku do ludzi, zatem warunkują bezpieczeństwo pracy w laboratoriach. Ponadto są bardzo dobrymi bioindykatorami ze względu na łatwość przenikania mutagenów przez ich ściany komórkowe, dlatego mogą być wykorzystywane w testach szacujących mutagenność związków biologicznie aktywnych. Udowodniono także, że wykazuje on większą wrażliwość i czułość na substancje mutagenne niż test Ames.

Uzyskane wyniki uprawniają do stwierdzenia, że test *Vibrio harveyi* jest przydatnym i wiarygodnym narzędziem skринningowym potwierdzającym oraz wykrywającym aktywność mutagenną badanych połączeń.

Opracowanie testu w formie mikropłytki pozwoliło m.in. na znaczne ograniczenie objętości wykorzystywanych mediów hodowlanych i odczynników; jednoczesne testowanie wielu substancji oraz uzyskanie wyników w krótszym czasie niż w klasycznym teście *Vibrio harveyi*.

Zarówno w teście Ames, jak i teście *Vibrio harveyi* badane związki charakteryzowała korzystna aktywność antymutagenna, a związki 1, 2 i 33, wykazywały najwyższy potencjał antymutageny.

Otrzymane wyniki w zakresie szacowania mutagenności w grupie związków 1-36, zostały wykorzystane przy selekcji i rekomendacji do dalszych badań przedklinicznych, pozwoliły także wyłonić spośród badanej grupy struktury o bardzo wysokiej korzystnej aktywności antymutagennej.

VII Piśmiennictwo

Abudayyak M, Jannuzzi AT, Özhan G, Alpertunga B. Investigation on the toxic potential of *Tribulus terrestris* *in vitro*. *Int J Toxicol*. 2015; 34: 31–43.

Achary VMM, Panda BB. Aluminium-induced DNA damage and adaptive response to genotoxic stress in plant cells are mediated through reactive oxygen intermediates. *Mutagenesis*. 2010; 25: 201–209.

Adibhatla RM, Hatcher JF. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 12: 125–169.

ADMET Predictor. www.simulationsplus.com. Dostępność dnia: 10.03.2016.

Ajith TA, Janardhanan KK. Antimutagenic effect of *Phellinus rimosus* Berk Pilat against chemical induced mutations of histidine dependent *Salmonella typhimurium* strains. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49: 2676–2680.

Akyl D, Eren Y, Konuk M, Tepekozcan A, Sağlam E. Determination of mutagenicity and genotoxicity of indium tin oxide nanoparticle using the Ames test and micronucleus assay. *Toxicol Ind Health*. 2015. pii: 0748233715579804.

Alam MS, Lee DU. Synthesis, biological evaluation, drug-likeness, and *in silico* screening of novel benzylidene-hydrazone analogues as small molecule anticancer agents. *Arch Pharm Res*. 2016; 392: 191–201.

Amosova O, Coulter R, Fresco JR. Self-catalyzed site-specific depurination of guanine residues within gene sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 4392–4397.

Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids*. 2010; 2010: 201367.

Birosova, L, Mikulasova, M, Vaverkova, S. Antimutagenic effect of phenolicacids. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2005; 149, 489–491.

Biso FI, Rodrigues CM, Rinaldo D, Reis MB, Bernardi CC, de Mattos JC, Caldeira-de-Araújo A, Vilegas W, Cólus IM, Varanda EA. Assessment of DNA damage induced by extracts, fractions and isolated compounds of *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae). *Mutat Res*. 2010; 702: 92–99.

Braun R. Systems analysis of high-throughput data. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 844: 153–187.

Bui VN, Nguyen TT, Bettarel Y, Nguyen TH, Pham TL, Hoang TY, Nguyen VT, Nghiem NM, Wölfl S. Genotoxicity of chemical compounds identification and

assessment by yeast cells transformed with GFP reporter constructs regulated by the PLM2 or DIN7 promoter. *Int J Toxicol.* 2015; 34 :31–43.

Bulusu KC, Guha R, Mason DJ, Lewis RP, Muratov E, Kalantar Motamedi Y, Cokol M, Bender A. Modelling of compound combination effects and applications to efficacy and toxicity: state-of-the-art, challenges and perspectives. *Drug Discov Today.* 2016; 21: 225–238.

Cao, X, Mittelstaedt, RA, Pearce, MG, Allen, BC, Soeteman–Hernandez, LG, Johnson, GE, Bigger, CA, and Heflich, RH. Quantitative dose–response analysis of ethyl methanesulfonate genotoxicity in adult gpt–delta transgenic mice. *Environ Mol Mutagen.* 2014, 55, 385–399.

Chong ZZ, Li F, Maiese K. Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol.* 2005; 75: 207–246.

Cimino, MC. Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes. *Environ and Molec Mutagenesis.* 2006; 47: 362–390.

Claxton L, Stewart–Hook V, Warren S. Methods for the Spiral *Salmonella* mutagenicity assay including specialised applications. *Mutat Res.* 2001; 488: 241–257.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003; 17: 1195–1214.

Cornforth MN. Perspectives on the formation of radiation–induced exchange aberrations. *DNA Repair (Amst).* 2006; 5: 1182–1191.

CSGenoTox. www.chemsilico.com. Dostępność dnia: 5.02.2016.

Czyż A, Jasiocki J, Bogdan A, Szpilewska H, Węgrzyn G. Genetically modified *Vibrio harveyi* strains as potential bioindicators of mutagenic pollution of marine environments. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 599–605.

Czyż A, Szpilewska H, Dutkiewicz R, Kowalska W, Biniewska–Godlewska A, Węgrzyn G. Comparison of the Ames test and a newly developed assay for detection of mutagenic pollution of marine environments. *Mutat Res.* 2002; 519: 67–74.

De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis.* 2004; 19: 169–185.

DEREK for Windows. <http://www.lhasalimited.org>. Dostępność dnia: 3.03.2016.

Di Sotto A, Evandri MG, Mazzanti G. Antimutagenic and mutagenic activities of some terpenes in the bacterial reverse mutation assay. *Mutat Res.* 2008; 653: 130–133.

Dion ME, Agler M, Milner JA. S-allyl cysteine inhibits nitrosomorpholine formation and bioactivation. *Nutr Cancer.* 1997; 28: 1–6.

Doganlar O, Doganlar ZB, Tabakcioglu K. Effects of permissible maximum-contamination levels of VOC mixture in water on total DNA, antioxidant gene expression, and sequences of ribosomal DNA of *Drosophila melanogaster*. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015; 22: 15610–15620.

Doida Y, Miller MW. Failure to confirm increase in unscheduled DNA synthesis in sonicated mammalian cells *in vitro*. *Ultrasonics.* 1992; 30:35–39.

Dopierała A, Wrosz P, Mazerski J. Akrydyny jako związki aktywne przeciwnowotworowo. *Postepy Hig Med Dosw.* 2011; 65: 263–269.

Drablos F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Diaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE. Alkylation damage in DNA and RNA–repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst).* 2004; 3:1389–1407.

Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Dz.U. UE L 276/33 z 20.10.2010.

Eastmond DA, Hartwig A, Anderson D, Anwar WA, Cimino MC, Dobrev I, Douglas GR, Nohmi T, Phillips DH, Vickers C. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis.* 2009;24: 341–349.

El-Sayed WM, Hussin WA. Antimutagenic and antioxidant activity of novel 4-substituted phenyl-2,2'-bichalcophenes and aza-analogs. *Drug Des Devel Ther.* 2013a; 7: 73–81.

El-Sayed WM, Hussin WA, Al-Faiyz YS, Ismail MA. The position of imidazopyridine and metabolic activation are pivotal factors in the antimutagenic activity of novel imidazo[1,2-a]pyridine derivatives. *Eur J Pharmacol.* 2013b; 715: 212–218.

El-Zein RA, Fenech M, Lopez MS, Spitz MR, Etzel CJ. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases amongst smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17: 1111–1119.

Epics. Dwujędrzaste komórki zawierające mikrojądro. <http://reconstructed-human-epidermis.com/epics/genotox/>. Dostępność dnia: 15. 02.2016.

Erickson RP, , Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update. *Mutat. Res.* 2010; 705, 96–106.

Espanha LG, Resende FA¹, de Sousa Lima Neto J, Boldrin PK, Nogueira CH, de Camargo MS, De Grandis RA, dos Santos LC, Vilegas W, Varanda EA. Mutagenicity and antimutagenicity of six Brazilian Byrsonima species assessed by the Ames test. BMC Complement Altern Med. 2014; 14: 182.

EURL ECVAM DataBase Service on Alternative Methods DB-ALM. Baza danych metod alternatywnych do eksperymentów na zwierzętach. <http://ecvam-dbal.m.jrc.ec.europa.eu>. Dostępność dnia: 4.03.2016.

Europejska konwencja o ochronie zwierząt kręgowych używanych do doświadczeń i innych celów naukowych przyjęta w Strasburgu 18 marca 1986 roku. ETS No. 123. <http://www.coe.int/pl/web/conventions/>. Dostępność dnia: 11.04.2016.

Fei C, Zhang J, Lin Y, Wang X, Zhang K, Zhang L, Zheng W, Wang M, Li T, Xiao S, Xue F, Wang C. Safety evaluation of a triazine compound nitromezuril by assessing bacterial reverse mutation, sperm abnormalities, micronucleus and chromosomal aberration. Regul Toxicol Pharmacol. 2015; 71: 585–589.

Ferguson LR, Philpot M. Nutrition and mutagenesis. Annu Rev Nutr. 2008; 28: 313–329.

Fluckiger-Isler S, Baumeister M, Braun K, Gervais V, Hasler-Nguyen N, Reimann R, Van Gompel J, Wunderlich HG, Engelhardt G. Assessment of the performance of the Ames II assay: a collaborative study with 19 coded compounds. Mutat. Res. 2004; 558, 181–197.

Fronza G, Campomenosi P, Iannone R, Abbondandolo A. The 4– nitroquinoline 1–oxide mutational spectrum in single stranded DNA is characterized by guanine to pyrimidine transversions. Nucleic Acids Res. 1992; 20: 1283–1287.

Gajski G, Gerić M, Garaj-Vrhovac V. Evaluation of the *in vitro* cytogenotoxicity profile of antipsychotic drug haloperidol using human peripheral blood lymphocytes. Environ Toxicol Pharmacol. 2014; 38: 316–324.

Galea AM, Murray V. The anti-tumour agent, cisplatin, and its clinically ineffective isomer, transplatin, produce unique gene expression profiles in human cells. Cancer Inform. 2008; 6: 315–355.

Gee P, Sommers CH, Melick AS, Gidrol XM, Todd MD, Burris RB, Nelson ME, Klemm RC, Zeiger E. Comparison of responses of base-specific *Salmonella* tester strains with the traditional strains for identifying mutagens: the results of a validation study. Mutat Res. 1998; 412: 115–130.

Genetics Home Reference. Chromosomes and mtDNA. <http://ghr.nlm.nih.gov/>, Dostępność dnia: 11.12.2015.

Genetic toxicology: DNA damage and repair, unscheduled DNA synthesis in mammalian cells *in vitro*. OECD Guidelines for the testing of chemicals. 1986; Test No. 482: Section 4, OECD, Paris.

Gherghi ICh, Girousi ST, Voulgaropoulos AN, Tzimou-Tsitouridou R. Study of interactions between DNA–ethidium bromide (EB) and DNA–acridine orange (AO), in solution, using hanging mercury drop electrode (HMDE). *Talanta*. 2003; 61: 103–112.

Girardello F, Custódio Leite C, Vianna Villela I, da Silva Machado M, Luiz Mendes Juchem A, Roesch–Ely M, Neves Fernandes A, Salvador M, Antonio Pêgas Henriques J. Titanium dioxide nanoparticles induce genotoxicity but not mutagenicity in golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Aquat Toxicol*. 2016; 170: 223–228.

Gollapudi BB, Johnson GE, Hernandez LG, Pottenger LH, Dearfield KL, Jeffrey AM, Julien E, Kim JH, Lovell DP, Macgregor JT, Moore MM, van Benthem J, White PA, Zeiger E, Thybaud V. Quantitative approaches for assessing dose–response relationships in genetic toxicology studies. *Environ Mol Mutagen*. 2013; 54: 8–18.

Greene N, Dobo KL, Kenyon MO, Cheung J, Munzner J, Sobol Z, Sluggett G, Zelesky T, Sutter A, Wichard J. A practical application of two *in silico* systems for identification of potentially mutagenic impurities. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015; 72: 335–349.

Greenwald P. From carcinogenesis to clinical interventions for cancer prevention. *Toxicology*. 2001; 166: 37–45.

Guénet JL. Chemical mutagenesis of the mouse genome: an overview. *Genetica*. 2004; 122: 9–24.

Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use; ICH Guideline S2R1, 2011.

Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines, OECD. 2015; Paris.

Gulluce M, Agar G, Baris O, Karadayi M, Orhan F, Sahin F. Mutagenic and antimutagenic effects of hexane extract of some *Astragalus* species grown in the eastern Anatolia region of Turkey. *Phytother Res*. 2010; 24: 1014–1018.

Gulluce M, Agar G, Aslan A, Karadayi M, Bozari S, Orhan F. Protective effects of methanol extracts from *Cladonia rangiformis* and *Umbilicaria vellea* against known mutagens sodium azide and 9–aminoacridine. *Toxicol. Ind. Health*. 2011; 27: 675–682.

Guo X, Heflich RH, Dial SL, Richter PA, Moore MM, Mei N. Quantitative analysis of the relative mutagenicity of five chemical constituents of tobacco smoke in the mouse lymphoma assay. *Mutagenesis*. 2015; pii: gev039.

Hanlon SL, Li JJ. Re-replication of a centromere induces chromosomal instability and aneuploidy. *PLoS Genet.* 2015; 11: e1005039.

Hatzi VI, Karakosta M, Barszczewska K, Karachristou I, Pantelias G, Terzoudi GI. Low concentrations of caffeine induce asymmetric cell division as observed *in vitro* by means of the CBMN-assay and iFISH. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015; 793: 71–78.

HazardExpert. <http://www.compudrug.com/>. Dostępność dnia: 4.02.2016.

Hoff Brait DR, Mattos Vaz MS, da Silva Arrigo J, Borges de Carvalho LN, Souza de Araújo FH, Vani JM, da Silva Mota J, Cardoso CA, Oliveira RJ, Negrão FJ, Kassuya CA, Arena AC. Toxicological analysis and anti-inflammatory effects of essential oil from *Piper vicosanum* leaves. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2015; 73: 699–705.

Hoffmann GR, Calciano MA, Lawless BM, Mahoney KM. Frameshift mutations induced by three classes of acridines in the lacZ reversion assay in *Escherichia coli*: potency of responses and relationship to slipped mispairing models. *Environ Mol Mutagen.* 2003; 42: 111–121.

Houck KA, Kavlock RJ. Understanding mechanisms of toxicity: insights from drug discovery research. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; 227: 163–178.

Ikken Y, Morales P, Martínez A, Marín ML, Haza AI, Cambero MI. Antimutagenic effect of fruit and vegetable ethanolic extracts against N-nitrosamines evaluated by the Ames test. *J Agric Food Chem.* 1999; 47: 3257–3264.

In vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test. OECD Guidelines for the testing of chemicals. 2014; Test No. 473: Section 4, OECD, Paris.

In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. OECD Guidelines for the testing of chemicals. 2014, Test No. 487: Section 4, OECD, Paris.

In vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 2014; Test No. 489: Section 4, OECD, Paris.

In vitro mammalian cell gene mutation tests using the Hprt and xprt genes. OECD Guidelines for the testing of chemicals. 2015; Test No. 476: Section 4, OECD, Paris.

In vitro mammalian cell gene mutation tests using the thymidine kinase gene, OECD Guidelines for the testing of chemicals. 2015; Test No. 490: Section 4, OECD, Paris.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH. <http://www.ich.org/home.html>. Dostępność dnia: 23.02.2016.

ISO 13829:2000, Water quality — Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test. <https://www.iso.org/>. Dostępność dnia: 5.02.2016.

Izzotti A, Saccà SC, Cartiglia C, De Flora S. Oxidative deoxyribonucleic acid damage in the eyes of glaucoma patients. *Am J Med.* 2003; 114: 638–646.

Jacociunas LV, Dihl RR, Lehmann M, de Barros Falcão Ferraz A, Richter MF, da Silva J, de Andrade HH. Effects of artichoke (*Cynara scolymus*) leaf and bloom head extracts on chemically induced DNA lesions in *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Biol.* 2014; 37: 90–104.

Johnson GE. Mammalian cell HPRT gene mutation assay: test methods. *Methods Mol Biol.* 2012; 817: 55–67.

Johnson GE, Soeteman-Hernandez LG, Gollapudi BB, Bodger OG, Dearfield KL, Heflich RH, Hixon JG, Lovell DP, MacGregor JT, Pottenger LH, Thompson CM, Abraham L, Thybaud V, Tanir JY, Zeiger E, van Benthem J, White PA. Derivation of point of departure PoD estimates in genetic toxicology studies and their potential applications in risk assessment. *Environ Mol Mutagen.* 2014; 55: 609–623.

Kaur S, Kumar S, Kaur P, Chandel M. Study of antimutagenic potential of phytoconstituents isolated from *Terminalia arjuna* in the Salmonella/microsome assay. *Am J Biomed Sci.* 2010; 2: 164–177.

Kaur P, Sharma N, Singh B, Kumar S, Kaur S. Modulation of genotoxicity of oxidative mutagens by glycyrrhizic acid from *Glycyrrhiza glabra* L. *Pharmacognosy Res.* 2012; 4: 189–195.

Kayraldız A, Dönbak L, Yavuz Kocaman A, Köker E, Gökçe Ş. Evaluation of Possible Genotoxic Activity of Dirithromycin in Cultured Human Lymphocytes. *J Toxicol.* 2015; 2015: 535490.

Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Fay JR, Lubet RA, Crowell JA, Sigman CC. Mechanistic considerations in chemopreventive drug development. *J Cell Biochem Suppl.* 1994; 20: 1–24.

Khoronenkova SV, Dianov GL. ATM prevents DSB formation by coordinating SSB repair and cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112: 3997–4002.

Kocak E. Investigation of potential genotoxic activity using the SOS Chromotest for real paracetamol wastewater and the wastewater treated by the Fenton process. *J Environ Health Sci Eng.* 2015; 13: 66.

Koutkias VG, Jaulent MC. Computational approaches for pharmacovigilance signal detection: toward integrated and semantically-enriched frameworks. *Drug Saf.* 2015; 38: 219–232.

Kouvelis VN, Wang C, Skrobek A, Pappas KM, Typas MA, Butt TM. Assessing the cytotoxic and mutagenic effects of secondary metabolites produced by several fungal biological control agents with the Ames assay and the VITOTOX® test. *Mutat Res.* 2011; 722 :1–6.

Laboratorium referencyjne Unii Europejskiej ds. metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach EURL ECVAM – European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing EURL ECVAM. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>. Dostępność dnia: 2.01.2016.

Lan J, Gou N, Gao C, He M, Gu AZ. Comparative and mechanistic genotoxicity assessment of nanomaterials via a quantitative toxicogenomics approach across multiple species. *Environ Sci Technol.* 2014; 48: 12937–12945.

Lazar. <http://lazar.in-silico.de/>. Dostępność dnia: 3.03.2016.

Le Hégarat L, Nessler F, Mourot A, Marzin D, Fessard V. Lack of DNA damage induction by okadaic acid, a marine toxin, in the CHO–Hprt and the *in vitro* UDS assays. *Mutat Res.* 2004; 564: 139–147.

Lehoczký P, McHugh PJ, Chovanec M. DNA interstrand cross-link repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 2007;31:109–133.

Longhese MP, Bonetti D, Guerini I, Manfrini N, Clerici M. DNA double-strand breaks in meiosis: checking their formation, processing and repair. *DNA Repair (Amst).* 2009; 8: 1127–1138.

McDaniels AE, Reyes AL, Wymer LJ, Rankin CC, Stelma GN Jr. Comparison of the *Salmonella* Ames test, umu tests, and the SOS Chromotests for detecting genotoxins. *Environ Mol Mutagen.* 1990; 16: 204–215.

MacGregor JT, Frötschl R, White PA, Crump KS, Eastmond DA, Fukushima S, Guérard M, Hayashi M, Soeteman–Hernández LG, Kasamatsu T, Levy DD, Morita T, Müller L, Schoeny R, Schuler MJ, Thybaud V, and Johnson GE. IWGT report on quantitative approaches to genotoxicity risk assessment I. Methods and metrics for defining exposure–response relationships and points of departure (PoDs). *Mutat Res.* 2015a; 783: 55–65.

MacGregor JT, Frötschl R, White PA, Crump, KS, Eastmond DA, Fukushima S, Guérard M, Hayashi M, Soeteman–Hernández LG, Johnson GE, Kasamatsu T, Levy DD, Morita T, Müller L, Schoeny R, Schuler MJ, Thybaud V. IWGT report on quantitative approaches to genotoxicity risk assessment II. Use of point-of-departure (PoD) metrics in defining acceptable exposure limits and assessing human risk. *Mutat Res.* 2015b; 783: 66–78.

Maisanaba S, Prieto AI, Puerto M, Gutiérrez–Praena D, Demir E, Marcos R, Cameán AM. *In vitro* genotoxicity testing of carvacrol and thymol using the micronucleus

and mouse lymphoma assays. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015; 784–785: 37–44.

Mammalian erythrocyte micronucleus test. OECD Guidelines for the testing of chemicals. 1997; Test No. 474: Section 4, OECD, Paris.

Mammalian bone marrow chromosome aberration test. OECD Guidelines for the testing of chemicals. 1997; Test No. 475: Section 4, OECD, Paris.

Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res*. 1983; 113: 173–215.

Maurici D, Aardema M, Corvi R, Kleber M, Krul C, Laurent C, Loprieno N, Pasanen M, Pfuhler S, Phillips B, Sabbioni E, Sanner T, Vanparys P. Genotoxicity and mutagenicity. *Altern Lab Anim*. 2005; 33 Suppl 1:117–130.

Melo-Cavalcante AA, Picada JN, Rubensam G, Henriques JAP. Antimutagenic activity of cashew apple (*Anacardium occidentale* Sapindales, Anacardiaceae) fresh juice and processed juice (cajuína) against methyl methanesulfonate, 4-nitroquinoline N-oxide and benzo[a]pyrene. *Genet Mol Biol*. 2008; 31: 759–766.

Miadokova E, Masterova I, Vlckova V, Duhova V, Toth J. Antimutagenic potential of homoisoflavonoids from *Muscari racemosum*. *J Ethnopharmacol*. 2002; 81: 381–386.

Micińska-Bojarek M. Europejski standard doświadczeń na zwierzętach. Aspekty humanitarne–prawne. *PPOŚ*. 2012; 3: 111–127.

Migliore L, Coppedè F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mutat Res*. 2002; 512: 135–153.

Minko IG, Kozekov ID, Harris TM, Rizzo CJ, Lloyd RS, Stone MP. Chemistry and biology of DNA containing 1,N(2)-deoxyguanosine adducts of the alpha,beta-unsaturated aldehydes acrolein, crotonaldehyde, and 4-hydroxynonenal. *Chem Res Toxicol*. 2009; 22: 759–778.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004; 56: 185–229.

Mishra V, Shuai B, Kodali M, Shetty GA, Hattiangady B, Rao X, Shetty AK. Resveratrol Treatment after Status Epilepticus Restrains Neurodegeneration and Abnormal Neurogenesis with Suppression of Oxidative Stress and Inflammation. *Sci Rep*. 2015; 5: 17807.

Mol A, Stolarek M. Induced DNA damage and mechanisms their formation. *PBK*. 2011; 38: 491–505.

Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 2000; 455: 29–60.

Mortelmans K, Riccio ES. The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutat Res.* 2000; 455: 61–69.

Mousavian Z, Masoudi-Nejad A. Drug–target interaction prediction via chemogenomic space: learning–based methods. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014; 10: 1273–1287.

Muster W, Breidenbach A, Fischer H, Kirchner S, Müller L, Pähler A. Computational toxicology in drug development. *Drug Discov Today.* 2008; 13: 303–310.

National Human Genome Research Institute. Chromosome Abnormalities. <http://www.genome.gov>. Dostępność dnia: 15.12.2015

Negi PS, Jayaprakasha GK, Jena BS. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem.* 2003; 80: 393–397.

Noll DM, Mason TM, Miller PS. Formation and repair of interstrand cross–links in DNA. *Chem Rev.* 2006; 106: 277–301.

Saska S, Souza Mendes L, Minarelli Gaspar AM, Sidorenko de Oliveira Capote T. Bone Substitute Materials in Implant Dentistry, Current Concepts in Dental Implantology. InTech. 2015. doi: 10.5772/59487. <http://www.intechopen.com/books/current-concepts-in-dental-implantology/>. Dostępność dnia: 18.02.2016.

Oda Y, Nakamura S, Oki I, Kato T, Shinagawa H. Evaluation of the new system umu–test for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat Res.* 1985; 147: 219–229.

Omer A, Singh P, Yadav NK, Singh RK. An overview of data mining algorithms in drug induced toxicity prediction. *Mini Rev Med Chem.* 2014; 14: 345–354.

Organization for Economic Co–operation and Development, OECD. <http://www.oecd.org/>. Dostępność dnia: 20.02.2016.

Orhan F, Gulluce M, Ozkan H, Alpsoy L. Determination of the antigenotoxic potencies of some luteolin derivatives by using a eukaryotic cell system, *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem.* 2013; 141: 366–372.

OSIRIS Property Explorer. <http://www.organic–chemistry.org/prog/peo/>. Dostępność dnia: 23.01.2016

Palermo AM, Mudry MD. Genotoxic damage induced by isopropanol in germinal and somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* 2011; 726: 215–221.

Pesarini JR, Zaninetti PT, Mauro MO, Carreira CM, Dichi JB, Ribeiro LR, Mantovani MS, Oliveira RJ. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of wheat bran in vivo. *Genet Mol Res.* 2013; 12: 1646–1659.

Pękala E, Liana P, Kubowicz P, Powroźnik B, Obniska J, Chlebek I, Węgrzyn A, Węgrzyn G. Evaluation of mutagenic and antimutagenic properties of new derivatives of pyrrolidine-2,5-dione with anti-epileptic activity, by use of the *Vibrio harveyi* mutagenicity test. *Mutat Res.* 2013; 758: 18–22.

Pfuhler S, Kirkland D, Kasper P, Hayashi M, Vanparys P, Carmichael P, Dertinger S, Eastmond D, Elhajouji A, Krul C, Rothfuss A, Schoening G, Smith A, Speit G, Thomas C, van Benthem J, Corvi R. Reduction of use of animals in regulatory genotoxicity testing: Identification and implementation opportunities—Report from an ECVAM workshop. *Mutat Res.* 2009; 680: 31–42.

Pietrzykowski T. Nowa dyrektywa o doświadczeniach na zwierzętach – wątpliwości, wyzwania i szanse. *Prawo i Medycyna.* 2011; 2/32: 23.

Piosik J, Ulanowska K, Gwizdek-Wiśniewska A, Czyż A, Kapuściński J, Węgrzyn G. Alleviation of mutagenic effects of polycyclic aromatic agents (quinacrine mustard, ICR-191 and ICR-170) by caffeine and pentoxifylline. *Mutat Res.* 2003; 530: 47–57.

Piosik J, Gwizdek-Wiśniewska A, Ulanowska K, Ochociński J, Czyż A, Węgrzyn G. Methylxanthines caffeine, pentoxifylline and theophylline decrease the mutagenic effect of daunomycin, doxorubicin and mitoxantrone. *Acta Biochim Pol.* 2005; 52: 923–926.

Podgórska B, Chęć E, Ulanowska K, Węgrzyn G. Optimisation of the microbiological mutagenicity assay based on genetically modified *Vibrio harveyi* strains. *J Appl Genet.* 2005; 46: 241–246.

Podgórska B, Węgrzyn G. A modified *Vibrio harveyi* mutagenicity assay based on bioluminescence induction. *Lett. Appl. Microbiol.* 2006; 42, 578–582.

Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev.* 2007; 33: 9–23.

RajaSekhar KK, RajendraPrasad Y, Shankarananth V, Swetha Harika K, Rajani K, Padmavathamma M. *In silico* prediction of selected pharmacokinetic, biological and toxic properties of some 1, 3, 5-trisubstituted-2-pyrazolines derived from isonicotinic acid. *J Glob Trends Pharm. Sci.* 2011; 2: 489–512.

Räschle M, Knipscheer P, Enoiu M, Angelov T, Sun J, Griffith JD, Ellenberger TE, Schärer OD, Walter JC. Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair. *Cell.* 2008; 134: 969–980.

Rastkhah E, Zakeri F, Ghoranneviss M, Rajabpour MR, Farshidpour MR, Mianji F, Bayat M. The cytokinesis-blocked micronucleus assay: dose-response calibration curve, background frequency in the population and dose estimation. *Radiat Environ Biophys.* 2016; 55: 41–51.

Reifferscheid G, Heil J, Oda Y, Zahn RK. A microplate version of the SOS/*umu*-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples. *Mutat Res.* 1991; 253: 215–222.

Resende FA, Barbosa LC, Tavares DC, de Camargo MS, de Souza Rezende KC, E Silva ML, Varanda EA. Mutagenicity and antimutagenicity of (-)-hinokinin a trypanosomicidal compound measured by Salmonella microsome and comet assays. *BMC Complement Altern Med.* 2012; 12: 203.

Resende FA, da Silva Almeida CP, Vilegas W, Varanda EA. Differences in the hydroxylation pattern of flavonoids alter their chemoprotective effect against direct- and indirect-acting mutagens. *Food Chem.* 2014; 155: 251–255.

Resende FA, Campos DL, da Silva VC, De Grandis RA, Souza LP, Leonardo Junior CS, da Rocha CQ, dos Santos LC, Vilegas W, Varanda EA. Mutagenicity and chemopreventive activities of Astronium species assessed by Ames test. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2015; 72: 506–513.

Roldán-Arjona T, Ariza RR. Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutat Res.* 2009; 681: 169–179.

Rozporządzenie Komisji WE Nr 440/2008 z dnia 30 maja 2008 r. ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem WE nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów RECH. *Dz.U. L 142: 1–739.*

Russell W, Burch R: *The Principles of Humane Experimental Technique.* Methuen, Londyn 1959.

Sangamwar AT, Deshpande UD, Pekamwar SS, Vadvalkar SM. Improving decision making for drug candidates: A computational approach for benzthiazoles as antifungal. *Indian J Biotechnol.* 2007; 6: 389–396.

Sawhney M, Rohatgi N, Kaur J, Gupta SD, Deo SV, Shukla NK, Ralhan R. MGMT expression in oral precancerous and cancerous lesions: correlation with progression, nodal metastasis and poor prognosis. *Oral Oncol.* 2007; 43: 515–522.

Sedgwick B, Bates PA, Paik J, Jacobs SC, Lindahl T. Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair (Amst).* 2007; 6: 429–442.

Sharma P, Mathur N, Singh A, Sogani M, Bhatnagar P, Atri R, Pareek S. Monitoring hospital wastewaters for their probable genotoxicity and mutagenicity. *Environ Monit Assess.* 2015; 187: 4180.

Silveira JE, Pereda MC, Nogueira C, Dieamant G, Cesar CK, Assanome KM, Silva MS, Torello CO, Queiroz ML, Eberlin S. Preliminary safety assessment of C-8 xylitol monoester and xylitol phosphate esters. *Int J Cosmet Sci.* 2016; 38: 41–51.

Skoneczna A, Kaniak A, Skoneczny M. Genetic instability in budding and fission yeast—sources and mechanisms. *FEMS Microbiol Rev.* 2015; 39: 917–967.

Słoczyńska K, Pękala E, Wajda A, Węgrzyn G, Marona H. Evaluation of mutagenic and antimutagenic properties of some bioactive xanthone derivatives using *Vibrio harveyi* test. *Lett Appl Microbiol.* 2010; 50: 252–257.

Słoczyńska K, Waszkielewicz AM, Marona H. Preliminary assessment of mutagenic and anti-mutagenic potential of some aminoalkanolic derivatives of xanthone by use of the *Vibrio harveyi* assay. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2014a; 768: 8–13.

Słoczyńska K, Powroźnik B, Pękala E, Waszkielewicz AM. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *J Appl Genet.* 2014b; 55: 273–285.

Smith WA, Gupta RC. Use of a microsome-mediated test system to assess efficacy and mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis.* 1996; 17: 1285–1290.

Solomon EP, Berg LR, Martin DW, Vilee CA. *Biologia. Multico.* Warszawa, 2014.

Sowmithra K, Shetty NJ, Jha SK, Chaubey RC. Evaluation of genotoxicity of the acute gamma radiation on earthworm *Eisenia fetida* using single cell gel electrophoresis technique (Comet assay). *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015; 794: 52–56.

Stanić S, Matić S, Delić G, Mihailović M, Bogojević D, Solujić S. Study of genotoxicity and antigenotoxicity of the *Cotinus coggygria* Scop. methanol extract by *Drosophila melanogaster* sex-linked recessive lethal test. *Genetika.* 2011; 47: 874–878.

Stark C, Steger-Hartmann T. *Nonclinical Safety and Toxicology. Handb Exp Pharmacol.* 2015; doi: 10.1007/164_2015_16.

Sun S, Li L, Li Z. Radical-mediated cytosine and 5-methylcytosine hydrolytic deamination reactions. *Int J Quant Chem.* 2005; 106: 1878–1884.

TOPKAT. <http://accelrys.com/products/discovery-studio/toxicology/>.
Dostępność dnia: 10.03.2016.

Toropov AA, Toropova AP, Raska I Jr, Leszczynska D, Leszczynski J. Comprehension of drug toxicity: software and databases. *Comput Biol Med.* 2014; 45: 20–25.

ToxScope. www.leadscope.com. Dostępność dnia: 16.01.2016.

Tsai SJ, Jeng SN, Lee H. Naturally occurring diallyl disulfide inhibits the formation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in boiled pork juice. *Mutagenesis*. 1996; 11: 235–240.

Tsai JY, Chen FH, Hsieh TY, Hsiao YY. Effects of indirect actions and oxygen on relative biological effectiveness: estimate of DSB induction and conversion induced by gamma rays and helium ions. *J Radiat Res*. 2015; 56: 691–699.

Turhan K, Ozturkcan SA, Turgut Z, Karadayi M, Gulluce M. Protective properties of five newly synthesized cyclic compounds against sodium azide and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine genotoxicity. *Toxicol Ind Health*. 2012; 28 :605–613.

Turhan K, Ozturkcan SA, Turgut Z, Karadayi M, Aslan A, Gulluce M. Genotoxic and antigenotoxic assessment of four newly synthesized dihydropyridine derivatives. *Toxicol Ind Health*. 2014; 30: 275–283.

Tutanc M, Aras M, Dokuyucu R, Altas M, Zeren C, Arica V, Ozturk OH, Motor S, Yilmaz C. Oxidative Status in Epileptic Children Using Carbamazepine. *Iran J Pediatr*. 2015; 25: e3885.

Tuteja N, Ahmad P, Panda BB, Tuteja R. Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutat Res*. 2009; 681: 134–149.

Ułanowska K, Piosik J, Gwizdek-Wiśniewska A, Węgrzyn G. Methylxanthines (caffeine, pentoxifylline and theophylline) decrease the mutagenic effect of daunomycin, doxorubicin and mitoxantrone. *Acta Biochim Pol*. 2005a; 52: 923–926.

Ułanowska K, Piosik J, Gwizdek-Wiśniewska A, Węgrzyn G. Formation of stacking complexes between caffeine (1,2,3-trimethylxanthine) and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine may attenuate biological effects of this neurotoxin. *Bioorg Chem*. 2005b; 33: 402–413.

Ułanowska K, Węgrzyn G. Mutagenic activity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Appl Genet*. 2006; 47: 85–87.

Ulanowska K, Piosik J, Gwizdek-Wiśniewska A, Węgrzyn G. Impaired mutagenic activities of MPDP⁺ (1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium) and MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium) due to their interactions with methylxanthines. *Bioorg Med Chem*. 2007, 15: 5150–5157.

Unscheduled DNA synthesis UDS test with mammalian liver cells *in vivo*. 1997; Test No. 486: OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4, OECD, Paris.

Valencia A, Prous J, Mora O, Sadrieh N, Valerio LG Jr. A novel QSAR model of *Salmonella* mutagenicity and its application in the safety assessment of drug impurities. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 273: 427–434.

Vongchampa V, Dong M, Gingipalli L, Dedon P. Stability of 2'-deoxyxanthosine in DNA. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 1045–1051.

Waszkielewicz AM, Gunia-Krzyżak A, Powroźnik B, Słoczyńska K, Pękala E, Walczak M, Bednarski M, Żesławska E, Nitek W, Marona H. Design, physico-chemical properties and biological evaluation of some new N-[(phenoxy)alkyl]- and N-{2-[2-(phenoxy)ethoxy]ethyl}aminoalkanols as anticonvulsant agents. *Bioorg Med Chem.* 2016; 24: 1793–1810.

Watanabe Y, Kubota Y, Fuma S, Kouichi M, Ichikawa S, Kubota M, Yoshida S. Cytokinesis block micronucleus assay in field plants for monitoring radiation-induced genotoxicity of the environment. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014; 774: 41–46.

Weakley SM, Jiang J, Kougiaris P, Lin PH, Yao Q, Brunicardi FC, Gibbs RA, Chen C. Role of somatic mutations in vascular disease formation. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010; 10: 173–185.

Wyatt MD, Pittman DL. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol.* 2006; 19: 1580–1594.

Yamakage K, Sui H, Ohta R, Toyoizumi T, Kawakami K, Matsumoto H, Takahashi T, Sasaki K, Ikezumi M, Negishi S, Izumi K, Todoriki S, Takashi K, Furuta M. Genotoxic potential and *in vitro* tumour-promoting potential of 2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone, two radiolytic products of fatty acids. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014; 770: 95–104.

Yujra VQ, Moretti EG, Claudio SR, Silva MJ, Oliveira F, Oshima CT, Ribeiro DA. Genotoxicity and mutagenicity induced by acute crack cocaine exposure in mice. *Drug Chem Toxicol.* 2015; 1–4. DOI: 10.3109/01480545.2015.1126843.

Zahin M, Aqil F, Ahmad I. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of punica granatum L. peel extracts. *Mutat Res.* 2010; 703: 99–107.

Zajdel P, Marciniec K, Maślankiewicz A, Satała G, Duszyńska B, Bojarski AJ, Partyka A, Jastrzębska-Więsek M, Wróbel D, Wesołowska A, Pawłowski M. Quinoline- and isoquinoline-sulfonamide derivatives of LCAP as potent CNS multi-receptor-5-HT1A/5-HT2A/5-HT7 and D2/D3/D4-agents: the synthesis and pharmacological evaluation. *Bioorg Med Chem.* 2012a; 20: 1545–1556.

Zajdel P, Kurczab R, Grychowska K, Satała G, Pawłowski M, Bojarski AJ. The multiobjective based design, synthesis and evaluation of the arylsulfonamide/amide derivatives of aryloxyethyl- and arylthioethyl- piperidines

and pyrrolidines as a novel class of potent 5-HT₇ receptor antagonists. *Eur J Med Chem.* 2012b; 56: 348–360.

Zajdel P, Marciniak K, Maślankiewicz A, Grychowska K, Satała G, Duszyńska B, Lenda T, Siwek A, Nowak G, Partyka A, Wróbel D, Jastrzębska-Więsek M, Bojarski AJ, Wesołowska A, Pawłowski M. Antidepressant and antipsychotic activity of new quinoline- and isoquinoline-sulfonamide analogs of aripiprazole targeting serotonin 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}/5-HT₇ and dopamine D₂/D₃ receptors. *Eur J Med Chem.*, 2013; 60: 42–50.

Zajdel P, Canale V, Partyka A, Marciniak K, Kurczab R, Satała G, Siwek A, Jastrzębska-Więsek M, Wesołowska A, Kos T, Popik P, Bojarski AJ. Arylsulfonamide derivatives of (aryloxy)ethylpiperidines as selective 5-HT₇ receptor antagonists and their psychotropic properties. *Med Chem Commun.* 2015; 6: 1272–1277.

Spis tabel

1. Programy komputerowe służące do przewidywania toksyczności...	str. 38
2. Testy oceny mutagenności i genotoksyczności zgodne z wymogami UE i OECD.....	str. 41
3. Charakterystyczne mutacje szczepu <i>S. typhimurium</i>	str. 45
4. Charakterystyka szczepów testowych <i>V. harveyi</i>	str. 59
5. Skład roztworu soli Vogel-Bonner.....	str. 67
6. Skład 0,1 mM buforu fosforanowego.....	str. 68
7. Skład 0,5 mM roztworu histydyny i biotyny.....	str. 68
8. Skład 10 % roztworu glukozy... ..	str. 68
9. Skład agaru powierzchniowego.....	str. 69
10. Składniki podłoża BA.....	str. 69
11. Skład bulionu odżywczego.....	str. 69
12. Skład płynnej pożywki BOSS.....	str. 71
13. Skład pożywki BOSS z agarem.....	str. 72
14. Analiza toksyczności <i>in silico</i> związków 1-36.....	str. 85
15. Aktywność mutagenna związków 1-36 w teście Ames.....	str. 90
16. Aktywność mutagenna związków 1-36 w teście <i>Vibrio harveyi</i>	str. 93
17. Aktywność mutagenna związków 1-36 w mikroplótkowym teście <i>Vibrio harveyi</i>	str. 96
18. Genotoksyczność związków 3-5, 7-12, 14-28 w teście SOS/ <i>umu</i>	str. 98
19. Aktywność antymutagenna związków 1-36 w teście Ames oraz teście <i>Vibrio harveyi</i>	str. 101

Spis rycin

1. Mechanizm inercji na poziomie całego chromosomu.....	str. 1
2. Efekty działania genotoksycznego.....	str. 2
3. Rodzaje uszkodzeń oraz mechanizmy naprawy DNA	str. 3
4. Płaski kompleks cis-diaminoplatyny	str. 4
5. Dezaminacja zasad azotowych: (A) zamiana cytozyny na uracyl, (B) zamiana adeniny na hipoksantynę, (C) zamiana guaniny na ksantynę.....	str. 5
6. Przykłady związków powstałych w reakcji wolnorodnikowej z zasadami azotowymi: (A) glikol tyminy, (B) 8-hydroksyadenina, (C) 5-hydroksycytozyna, (D) FapyGua.....	str. 6
7. Miejsca ataku grup alkilowych (Me) w zasadach azotowych (A) tymina, (B) adenina, (C) cytozyna, (D) guanina	str. 1
8. Addukt metabolitu benzo[a]pirenu z guaniną.....	str. 2
9. Badanie <i>in vitro</i> mutacji genowych komórek ssaków.	str. 3
10. Analiza aberracji strukturalnych w stadium metafazy	str. 4
11. Obraz komet uzyskany w mikroskopie fluorescencyjnym.....	str. 5
12. Dwujądrowe komórki zawierające mikrojądro... ..	str. 6
13. Schemat strategii badań genotoksyczności i mutagenności potencjalnych substancji leczniczych.....	str. 5
14. Pochodne (A) aroksyalkiloaminoalkanoli (1-20), (B) sulfonamidowych pochodnych aryloksyetylo amin alicyklicznych (21-28) oraz (C) sulfonamidowych pochodnych arypirazolu (29-36).....	str. 6
15. Etapy testu Ames.....	str. 1
16. Etapy testu <i>Vibrio harveyi</i>	str. 2
17. Etapy mikropłytkowego testu <i>Vibrio harveyi</i>	str. 3
18. Mikropłytko w teście SOS/ <i>umu</i>	str. 4
19. Etapy testu SOS/ <i>umu</i>	str. 5

