

Anna Sierosławska¹, Ewelina Kowalska^{1*}, Anna Rymuszka¹, Renata D bowska²

¹ Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Instytut Biotechnologii, Katedra Fizjologii Zwierz t i Toksykologii, ul. Konstantynów 1 I, 20-708 Lublin

² Centrum Naukowo-Badawcze Dr Irena Eris, ul. Puławska 107A, 02-595 Warszawa

Dyrektywa 2003/15/UE wprowadziła zakaz testowania kosmetyków i surowców kosmetycznych z wykorzystaniem zwierz t. Ocena bezpiecze stwa przeprowadzana jest obecnie w oparciu o dost pne metody alternatywne. W przypadku badania potencjalnej genotoksyczno ci takich metod , zwalidowan i zaakceptowan przez ECVAM, jest test mikrojdrowy (MNI).

Celem pracy była ocena bezpiecze stwa genotoksycznego surowców kosmetycznych z wykorzystaniem testu mikrojdrowego.

Materiał badany:

surowce kosmetyczne zakodowane jako **S1** (ółtobe owe ciało stałe w formie proszku) oraz **S2** (białobe owe ciało stałe w formie proszku), rozpuszczalnik DMSO (najwy sze st . w po ywce - 0,1%); testowany zakres st e 10-1,25 µg/ml;

Metoda:

Test MNI wykonywany wg wytycznych OECD TG 48, z wykorzystaniem komórek linii **V79** (ECACC, nr kat. 86041102). Aktywacja metaboliczna wykonywana frakcj S9 z w troby szczurów z kofaktorami (st . ko cowe 1,5%). Bloker cytokinezy - cytochalazyna B (CytoB, 3 µg/ml).

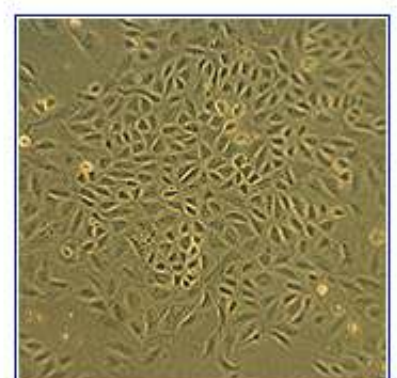
Lymphocytes, primary cells and cell lines treated with cytoB komórki V79  4x10 ⁴ kom./ml	+ S9 Short treatment	Treat for 3-6 hours in the presence of S9; remove the S9 and treatment medium; add fresh medium and cytoB; harvest 1.5 - 2.0 normal cell cycle lengths after the beginning of treatment. 24 godz. => 2 cykle
	- S9 Short treatment	Treat for 3-6 hours; remove the treatment medium; add fresh medium and cytoB; harvest 1.5 - 2.0 normal cell cycle lengths after the beginning of treatment.
	- S9 Extended treatment	Treat for 1.5 - 2.0 normal cell cycle lengths in the presence of cytoB; harvest at the end of the treatment period.

Fig. 1.

Schemat przebiegu do wiadczenia (OECD TG 487)

Kontrole pozytywne

Bez frakcji S9:

Działanie klastogenne:

mitomycyna C (MitC) - 0,5 µg/ml

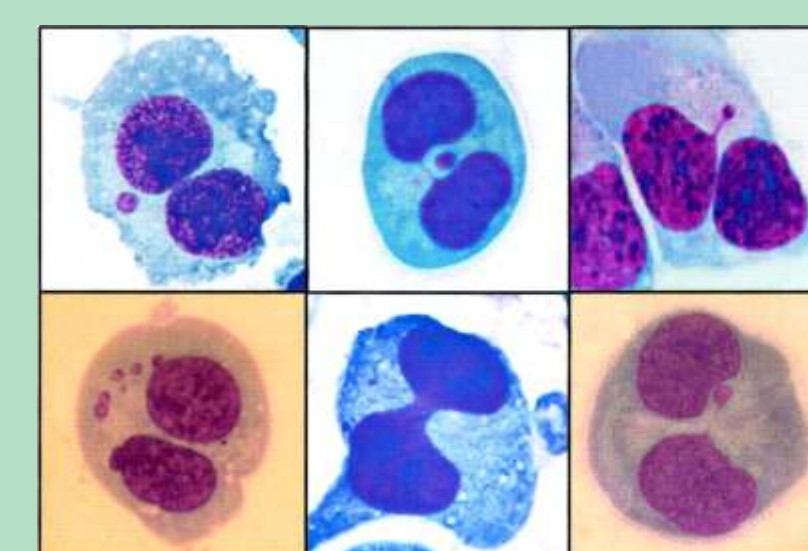
Działanie aneugenne:

kolchicyna (Kol) - 0,08 µg/ml

Z frakcją S9:

Działanie klastogenne:

cyklofosfamid (Cyklo) 5 µg/ml



Nat Protoc. 2007;2(5):1084-104.Fenech M.

Oznaczenie cytotoksyczno ci: Wyznaczanie współczynnika **CBPI** (Cytokinesis-Block Proliferation Index) wg wzoru: $CBPI = ((K1) + (2 \times K2) + (3 \times Km)) / n$ gdzie: K1-komórki jednej drzaste; K2-dwuj drzaste; Km-wieloj drzaste; n-całkowita liczba analizowanych komórek (>500 dla oznaczenia).

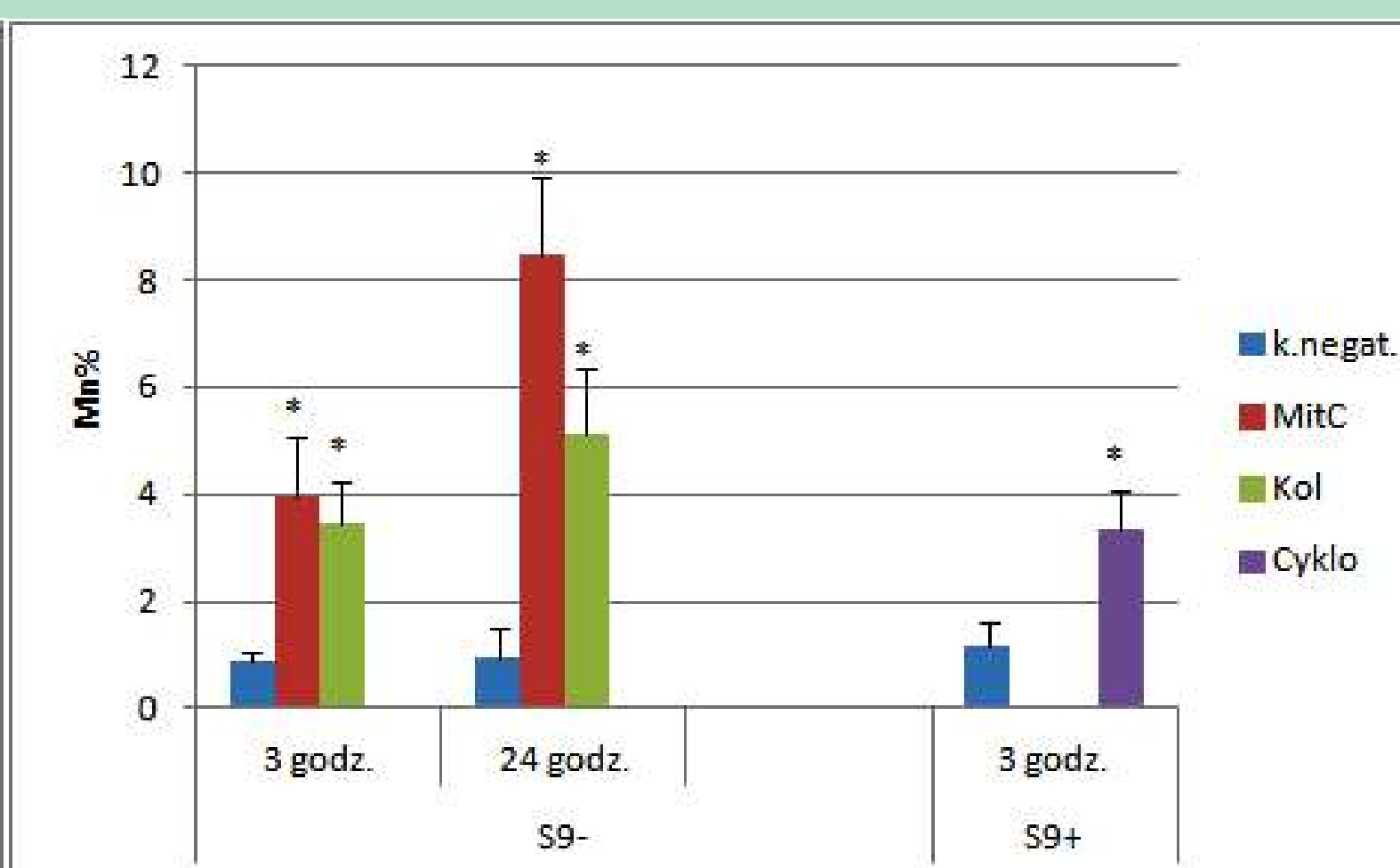
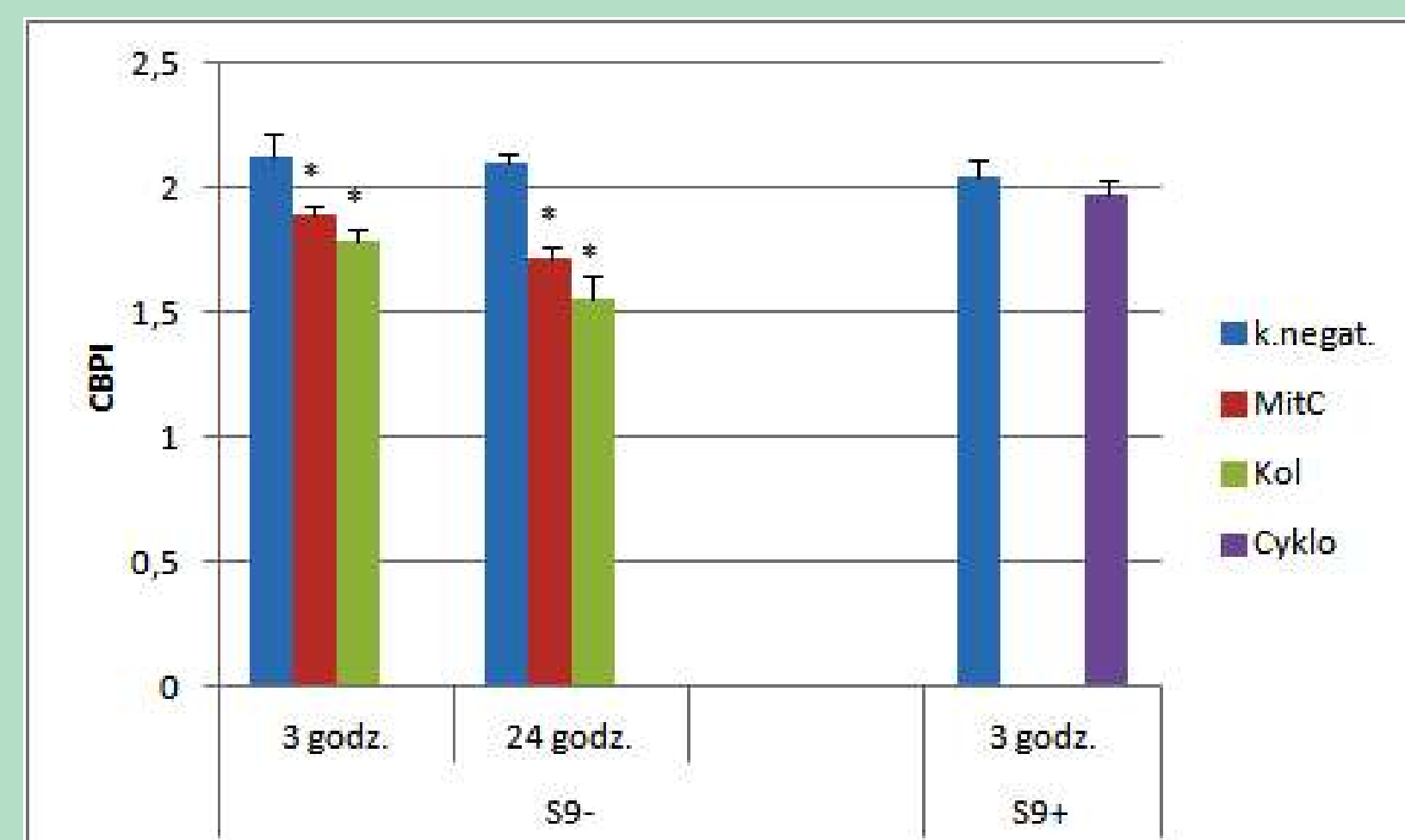
Oznaczenie Mn:

Wyznaczanie redniej procentowej zaw. Mn (Mn%) przez zliczanie w >2000 kom. dwuj drzastych dla oznaczenia.

Analiza statystyczna:

ANOVA z testem Tukeya (post hoc), $P < 0,05$.

WYNIKI



CBPI	S9-		S9+
	3 godz.	24 godz.	3 godz.
S1			
$\bar{X} \pm SD$	2,063±0,063	2,019±0,082	1,998±0,028
S2			
$\bar{X} \pm SD$	1,993±0,036	2,055±0,036	1,990±0,019

Mn%	S9-		S9+
	3 godz.	24 godz.	3 godz.
S1			
$\bar{X} \pm SD$	0,824±0,063	1,063±0,258	1,061±0,138
S2			
$\bar{X} \pm SD$	0,961±0,138	1,052±0,126	1,287±0,206

WNIOSKI

- Na podstawie ró nic istotnych statystycznie pomi dzy warto ciami CBPI w kontrolach neg. i próbach badanych, nie stwierdzono działania cytotoksycznego substancji S1 i S2 w przyj tym zakresie st e .
- Na podstawie ró nic istotnych statystycznie pomi dzy warto ciami Mn% w komórkach ekspozowanych na substancje S1 i S2 w badanym zakresie koncentracji, a Mn% w kontroli neg. oraz kontrolach poz., nie stwierdzono działania klastogenne/aneugenne badanyc substancji.
- W kontrolach poz. obserwowano istotny wzrost Mn% w stosunku do kontroli neg., co wiadczy o prawidłowym przebiegu testu.
- Do pełnej oceny genotoksyczno ci substancji badanych potrzebna jest bateria testów, umo liwiaj ca wykrywanie mutacji genowych oraz chromosomowych aberracji strukturalnych i numerycznych. Dalsze etapy bada obejmuj wykonanie testu Ames'a (testu mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych).

Fig. 2.

Schemat powstawania mikrojdrow (Fenech, 2007 zmodyf.)

Fig. 3.

Cytotoksyczno w kontrolach neg. i poz. oznaczana jako współczynniki CBPI (>500 kom./ozn.)

Procentowa obecno Mn w komórkach w kontrolach neg. i poz. oznaczana jako Mn% w komórkach dwuj drzastych (>2000 kom./ozn.) ($\bar{X} \pm SD$, * $p < 0,05$)

Fig. 4.

Cytotoksyczno (CBPI) oraz procentowa obecno Mn (Mn%) w komórkach ekspozowanych na substancje badane w przyj tym zakresie st e (podane warto ci rednie) ($\bar{X} \pm SD$, * $p < 0,05$)