

ZSF, PF a ZF JU 2006/2007

Genotoxické látky -
mutageny a karcinogeny
v životním prostředí

Další informace ke genotoxicitě,
mutagenitě a karcinogenitě
najdete na [www:](http://www.medik.cz/medik/kocarek/)

- <http://www.medik.cz/medik/kocarek/>

nebo

<http://camelot2.lf2.cuni.cz/turnovec/ublg/vyuka/>

- a jinde pod heslem: genotoxicita, karcinogenita, mutagenita apod.

Trochu terminologie

Genotox. látky $\longrightarrow$ genotoxicita $\Rightarrow$ změny genetického materiálu

Mutageny $\longrightarrow$ mutagenita $\Rightarrow$ změny genetického materiálu
(změna = mutace)

Karcinogeny $\longrightarrow$ karcinogenita $\Rightarrow$ specifické změny genetického materiálu

Teratogeny $\longrightarrow$ teratogenita $\Rightarrow$ vývojové anomálie

genotoxicita = mutagenita $\neq$ karcinogenita $\neq$ teratogenita

Mutageny

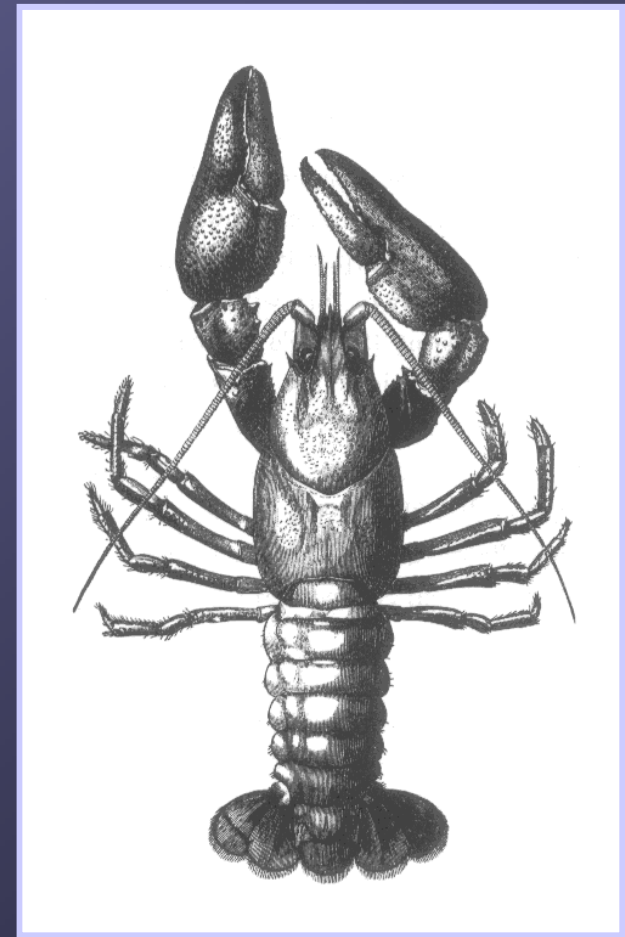
- Chemické, fyzikální nebo biologické látky, popř. jiné faktory schopné vyvolat poškození DNA
- Genotoxické látky = genotoxické faktory = mutagenní faktory
- Mutagenita = genotoxicita
- Mutace určitých genů vede ke vzniku nádoru, proto byla u mnoha mutagenů prokázána karcinogenní aktivita (karcinogeny).

Teratogeny

- Látky indukující vrozenou vývojovou vadu (chemické, fyzikální, biologické)
- Uplatňují se zejména v počátku embryogeneze
- Vrozené vývojové vady nejsou dědičné
- Fenotyp vrozené vývojové vady může být totožný s genetickou chorobou (např. roštěpové vady)

Karcinogeny (kancerogeny)

- *Karkinos* (řec.) – rak
- *Cancer* (lat.) – rak, krab
- Látky, popř. jiné faktory způsobující změnu (transformaci) normální buňky na buňku nádorovou



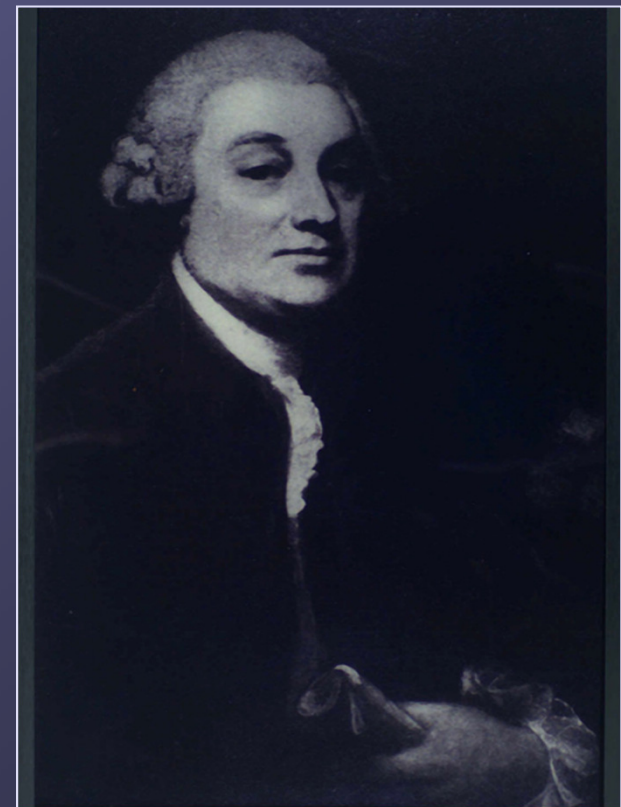
Krátce k historii

aneb začalo to kominíky...

Londýnský chirurg Percival Pott se ve 2. polovině 18. století zabýval mimo jiné také zdravotním stavem kominíků...



Dr. Percival Pott (1713 – 1788)



...a zjistil, že:

- u kominíků se ve zvýšené míře vyskytuje rakovina (karcinom dlaždicových buněk) šourku, které se dokonce dostalo označení „kominický nádor“

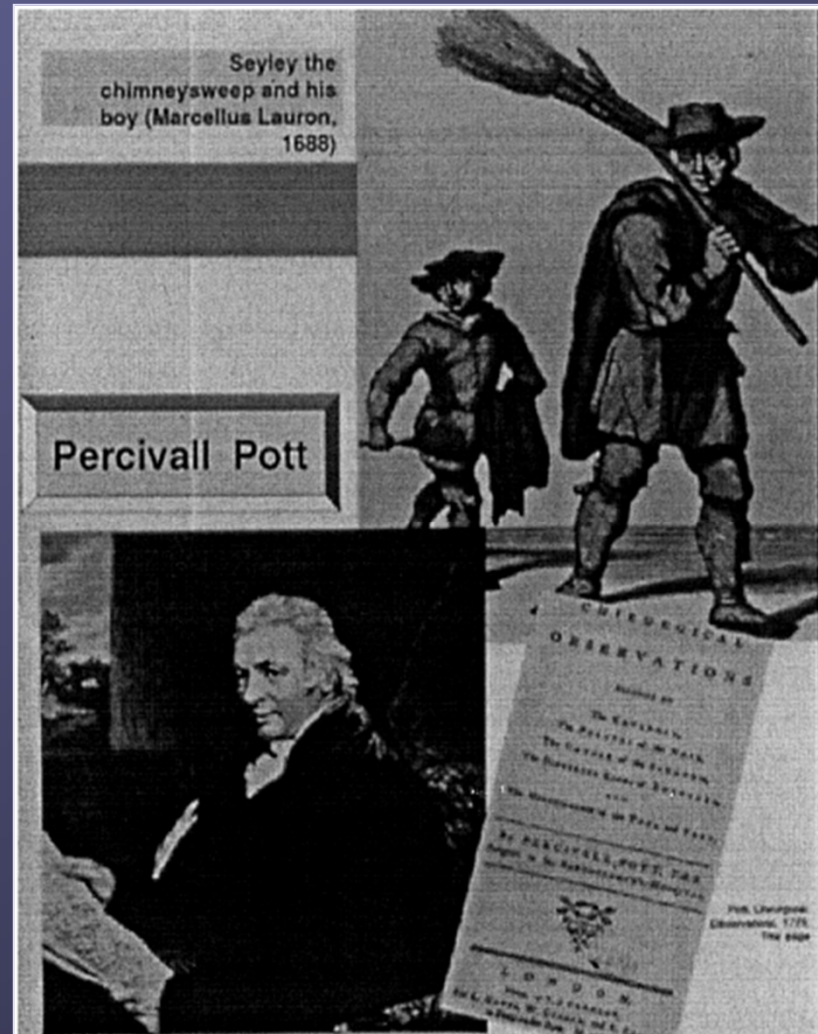


Podobnou malignitou (na ruce) byl postižen i zahradník, jenž používal saze ke hnojení zahrady.

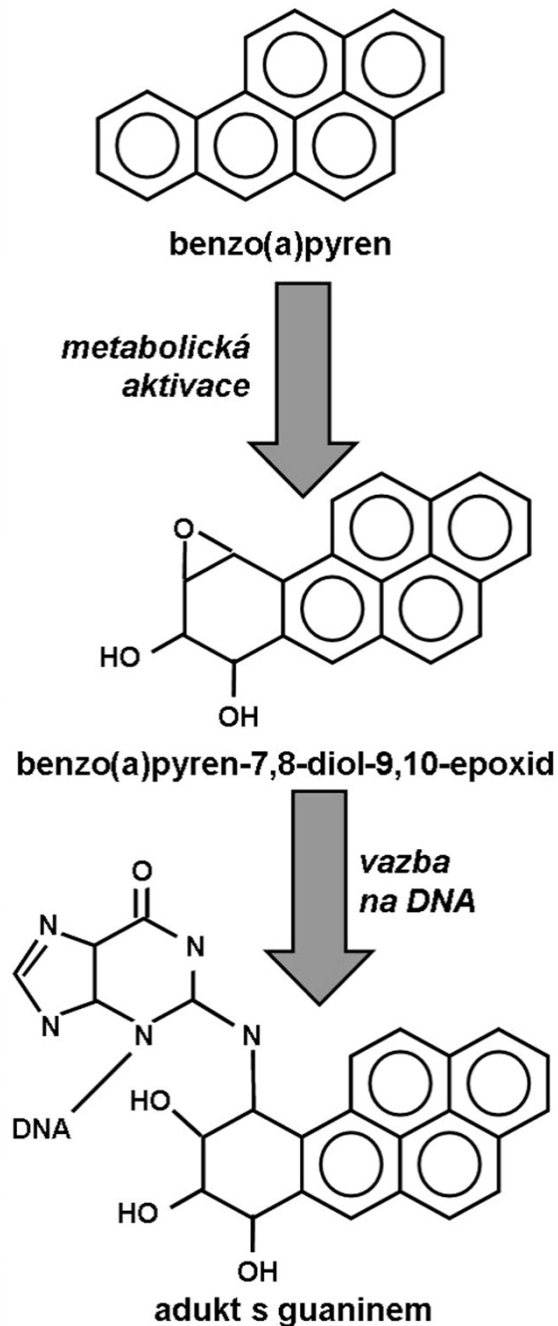


Ve svém pojednání z roku 1775 Percival Pott předpokládá, že:

- nádor šourku je vyvolán vnějšími faktory – zřejmě látkami obsaženými v sazích nebo v dehtu.
- Teprve ve 20. století byly ze sazí a dehtu izolovány a chemicky identifikovány látky, které mají vsutku karcinogenní účinek.



Benzo(a)pyren



- Polycyklický aromatický uhlovodík s prokazatelnou karcinogenní aktivitou.
- Obsažen v dehtu, v sazích, v kouři i jiných produktech spalovacích procesů.
- Po vstupu do organismu dochází k metabolické konverzi (připojení epoxidové skupiny a dvou hydroxylových skupin).
- Vzniklý reaktivní derivát se váže na báze nukleových kyselin a vytváří tzv. adukt (částice vzniklá adicí).
- Adukt může být příčinou vzniku mutace.
- Mutace může být příčinou přeměny normální buňky na buňku nádorovou.

Objev Percivala Potta byl tak
prvním důkazem karcinogenní
aktivity chemické látky.

Mutagenní účinky vnějších faktorů
byly prokázány daleko později...

Objevy indukovaných mutací

- 1927 – Herrman Joseph Muller prokázal mutagenní účinky ionizujícího záření.
- 40. léta 20. století – Charlotte Auerbachová zjistila, že yperit vyvolává u octomilek stejné mutace jako ionizující záření (radiomimetické látky).
- Brzy byl mutagenní účinek prokázán u mnoha dalších sloučenin.

Příklad benzo(a)pyrenu ukazuje, že
suspektní karcinogeny je třeba
hledat mezi látkami s mutagenní
(genotoxickou) aktivitou.

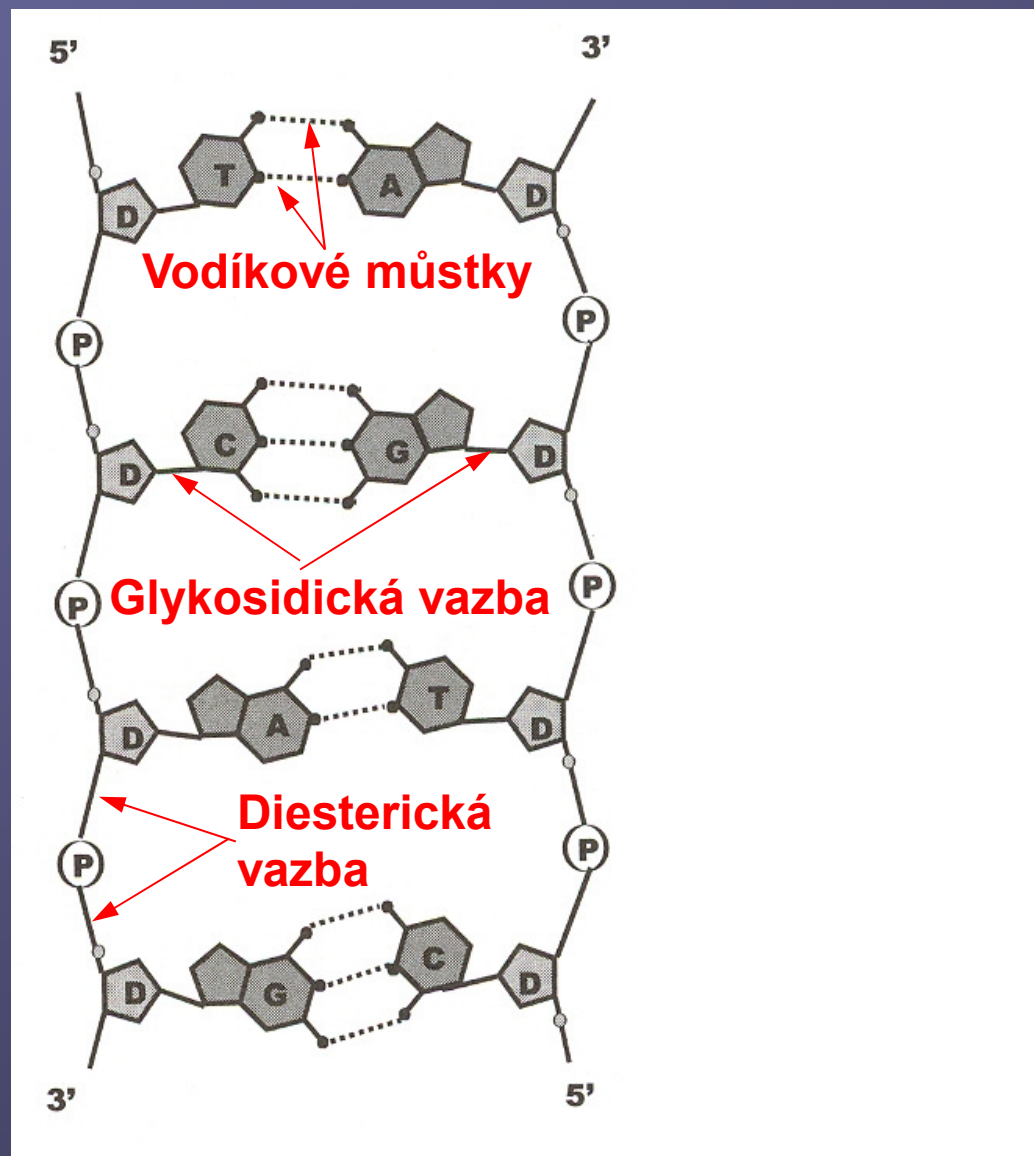
Základní rozdělení mutagenů

- **chemické mutageny** – způsobují poškození DNA na základě chemické modifikace bází, popř. jiných složek polynukleotidového řetězce;
- **fyzikální mutageny** (např. ionizační záření, UV-záření);
- **biologické mutageny** (viry).

Chemické mutageny

- **Alkylační a arylační látky** (např. yperit, benzo(a)pyren) – vytvářejí adukty s bázemi nukleových kyselin
- Látky způsobující **chemickou modifikaci nukleových kyselin** jinými mechanismy (interkalací, štěpením vazeb v polynukleotidovém řetězci, chemickou přeměnou bází).
- **Syntetické analogy bází**, které se po svém zařazení do DNA chybně párují s jinými bázemi a způsobují tak substituční mutace.

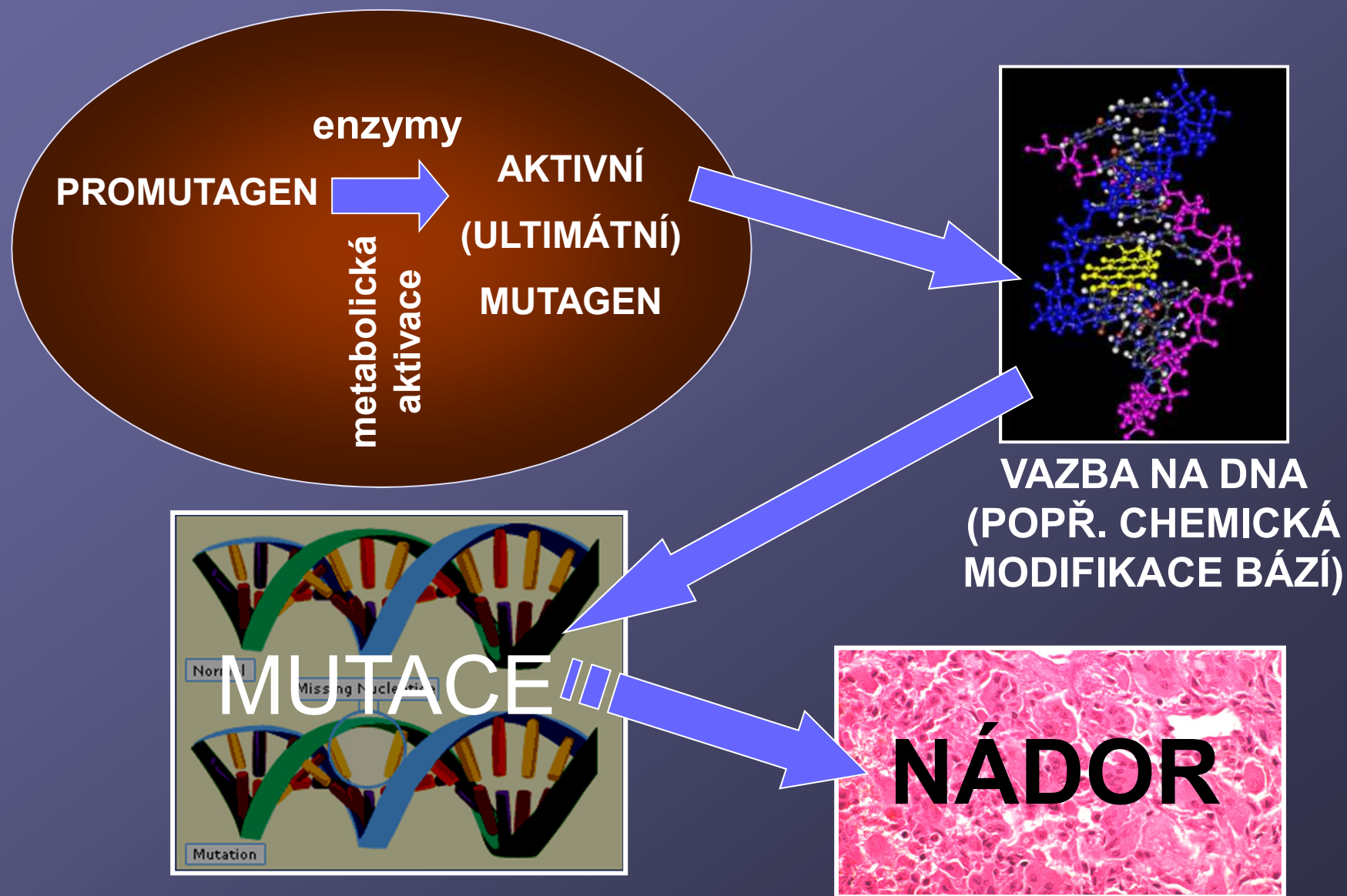
Porušení vazeb v DNA



Z biochemického hlediska dělíme mutageny do dvou skupin :

- **a) přímé mutageny** („direct acting“) – způsobují mutaci bez předchozí metabolické přeměny
- **b) promutageny**
 - nejsou samy o sobě mutagenní
 - k jejich přeměně na aktivní (tzv. ultimátní) mutageny dochází působením detoxifikačních enzymů v lidském organismu
 - tyto biotransformační procesy se označují jako **metabolická aktivace promutagenů**

Metabolická aktivace mutagenů



Testy genotoxicity

- Testy na **molekulární** úrovni – studujeme změny na úrovni DNA (mutace, reparační syntézu, chemické modifikace bází)
- Testy na **genové** úrovni – studujeme vznik genových mutací zjistitelných ve fenotypu, na biochemické bázi (např. použitím selekčního média, sledováním exprese určitých genů atd.)
- Testy na **chromozomové** úrovni – studujeme vznik chromozomových aberací (strukturních, popř. numerických)

Testy na molekulární úrovni

- Studium vzniku konkrétních mutací
- Stanovení aduktů
- Neplánovaná syntéza DNA – UDS
(Unscheduled DNA Synthesis)
- Comet assay neboli SSGE (Single Cell Gel Electrophoresis)

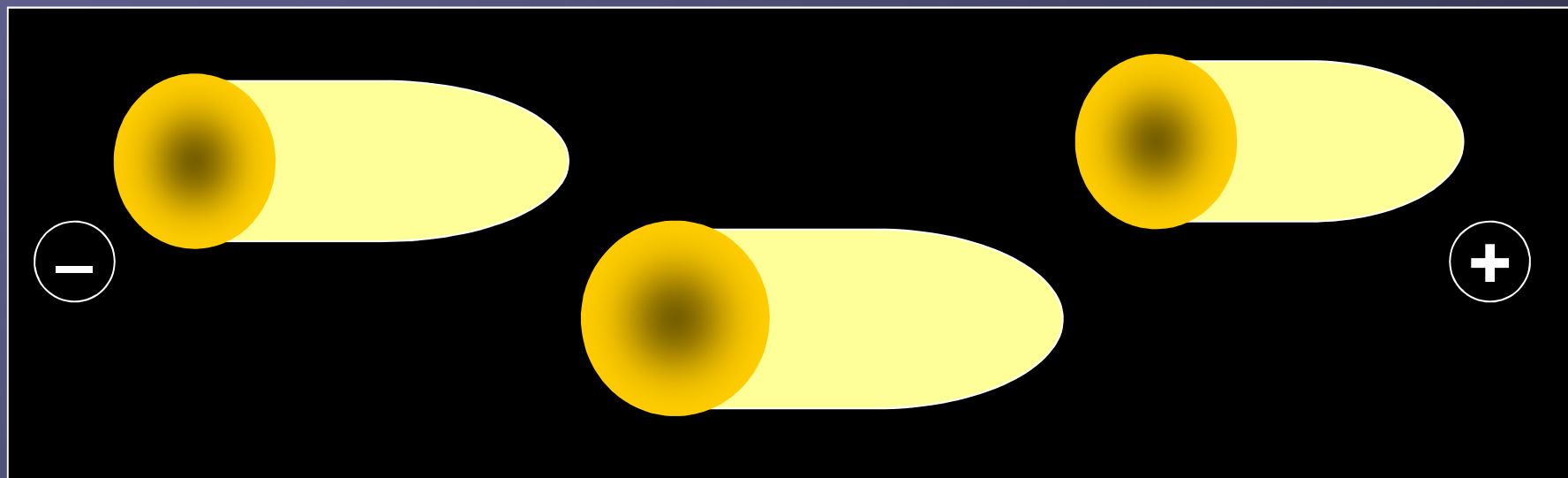
Comet assay („kometový test“)

- Single Cell Gel Electrophoresis (SSGE)
- Stanovení malých fragmentů DNA v jádrech jednotlivých buněk
- Fragmenty vznikají poškozením genetického materiálu vlivem mutagenů.

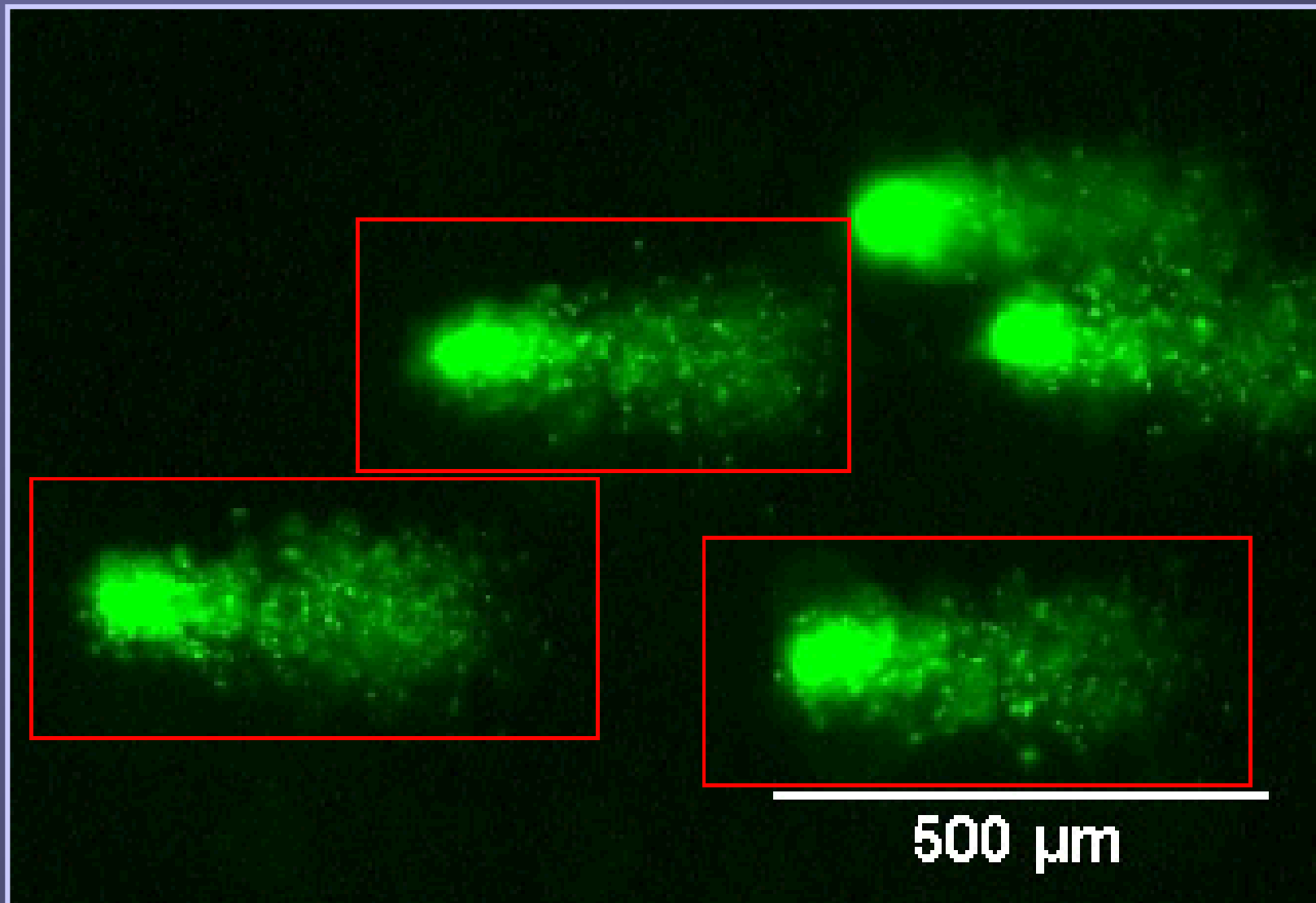
Comet assay (kometový test)



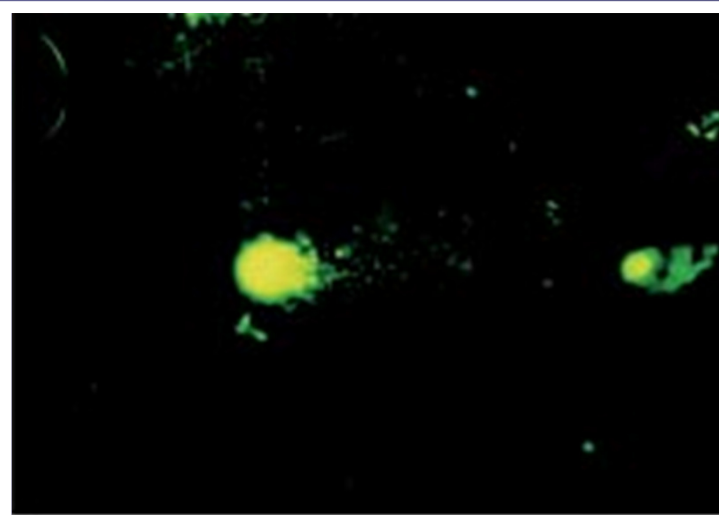
- Jádra buněk převedeme do gelu a případné fragmenty DNA uvolníme z jader pomocí elektroforézy.
- Pak obarvíme jádra fluoreskující látkou a prohlédneme pod fluorescenčním mikroskopem.
- Pokud jsou fragmenty přítomny, vytvářejí v sousedství jádra fluoreskující útvar připomínající ohon komety.



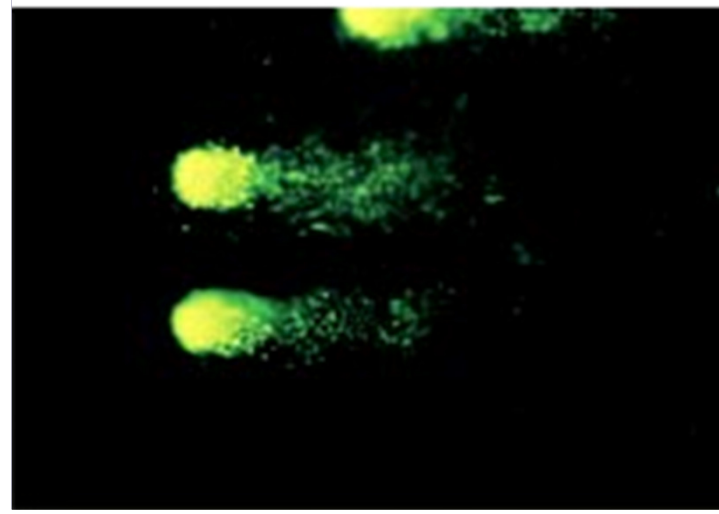
Kometový test



Možné výsledky kometového testu

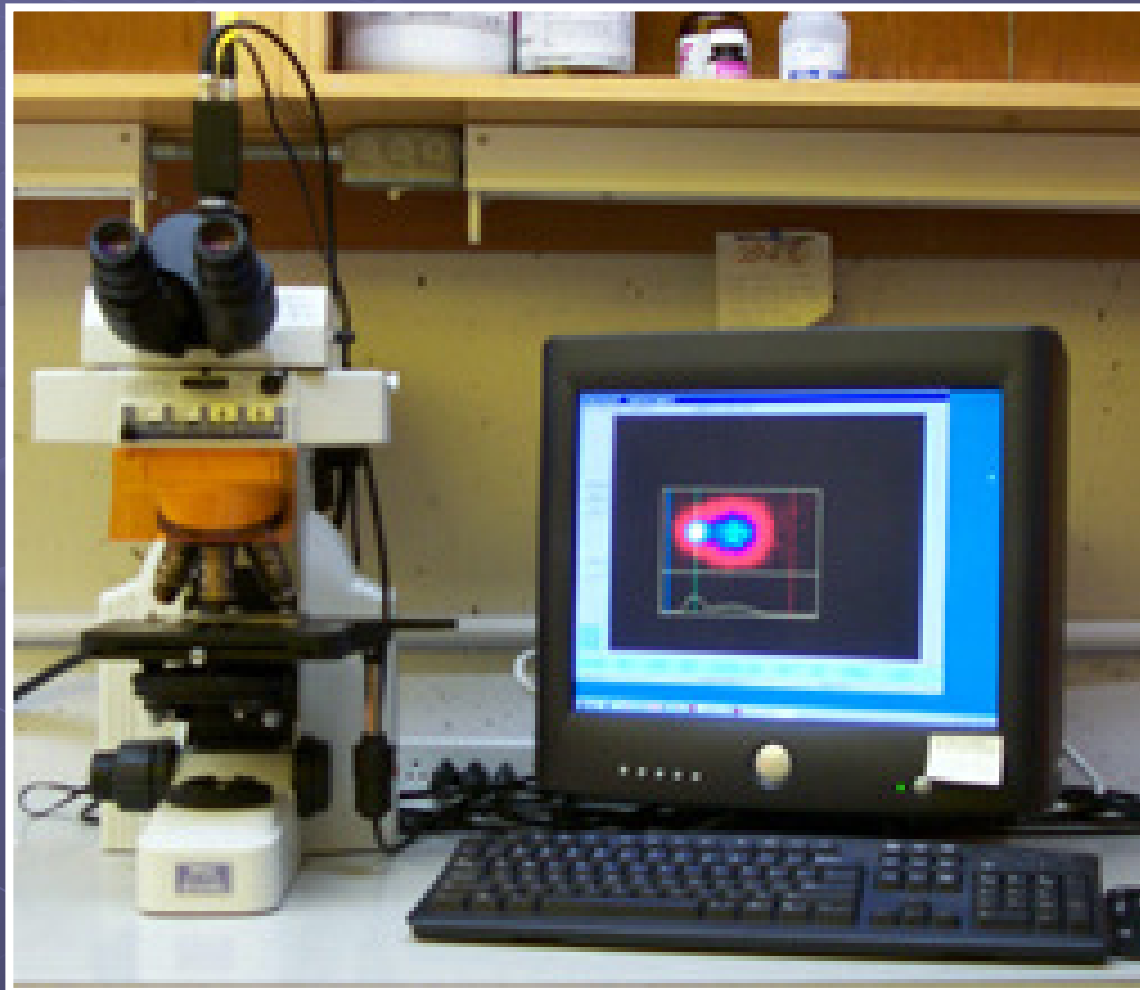


Normální jádro
s nepoškozenou DNA

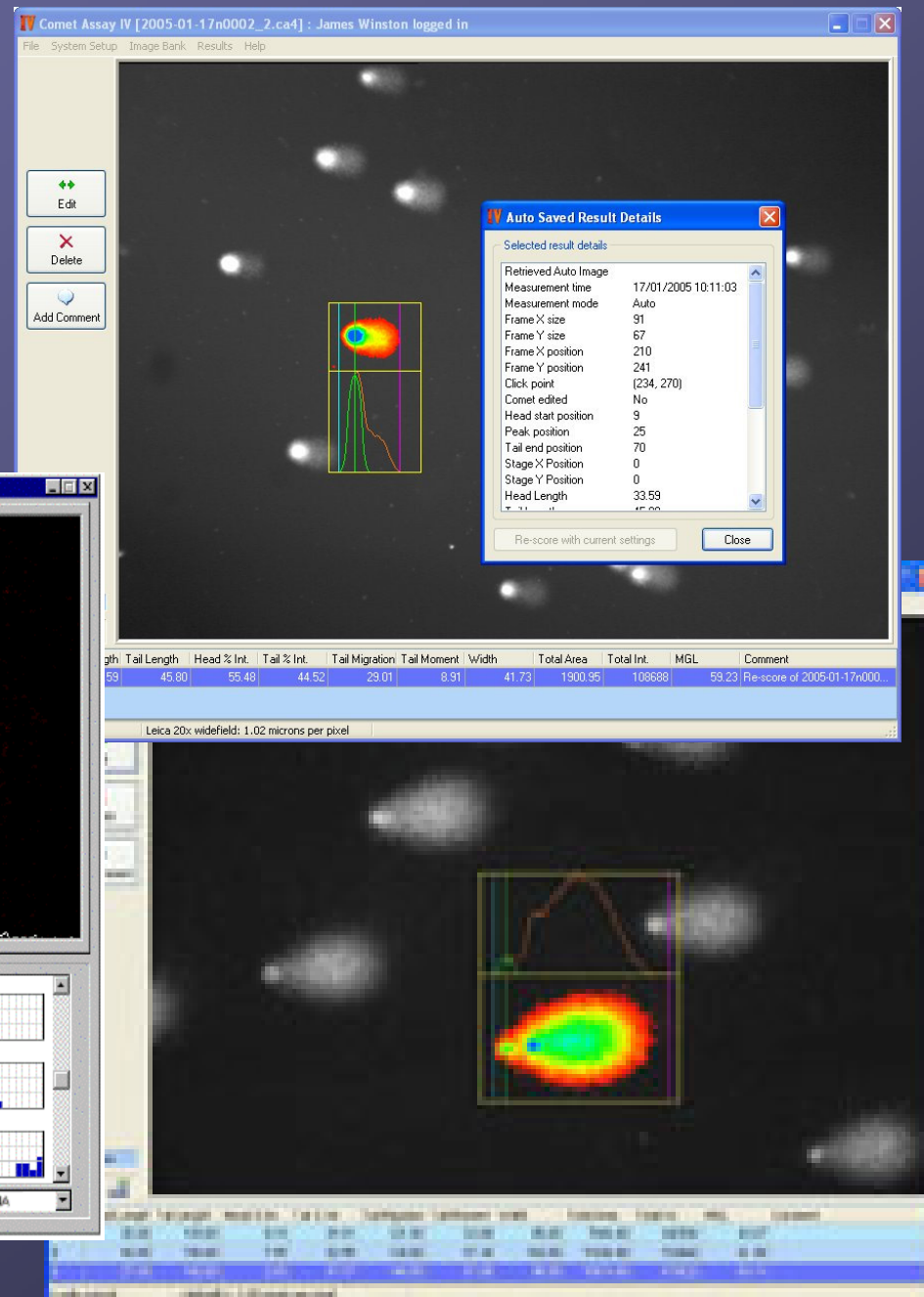
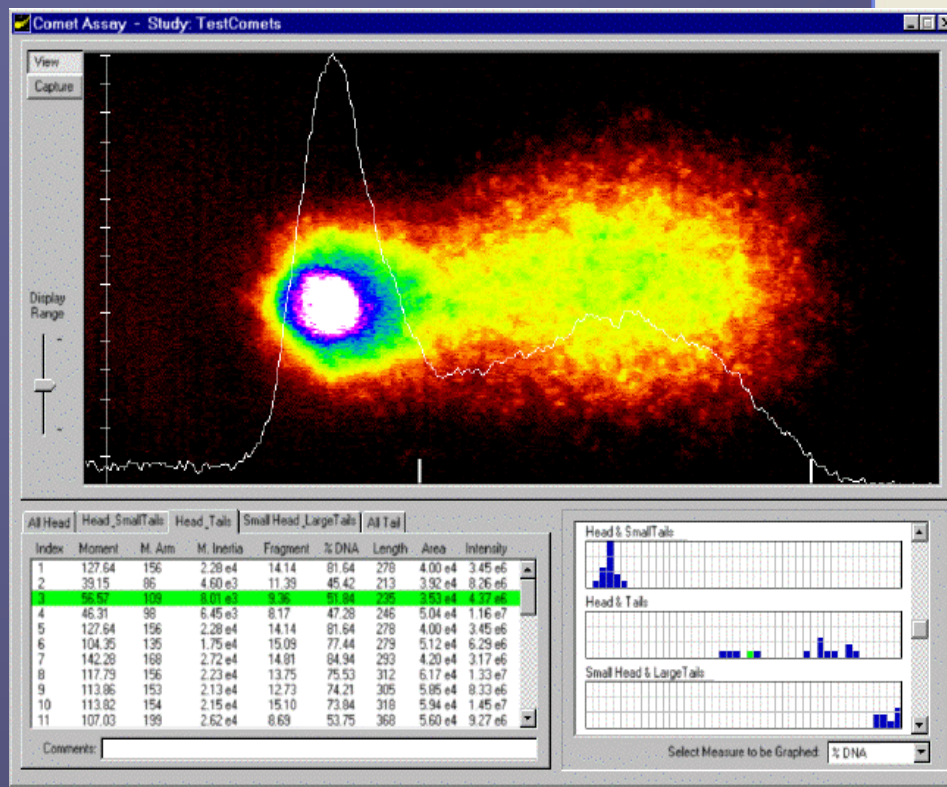


Dvě jádra
s poškozenou DNA

Vyhodnocení kometového testu



Kometový test – počítačové zpracování



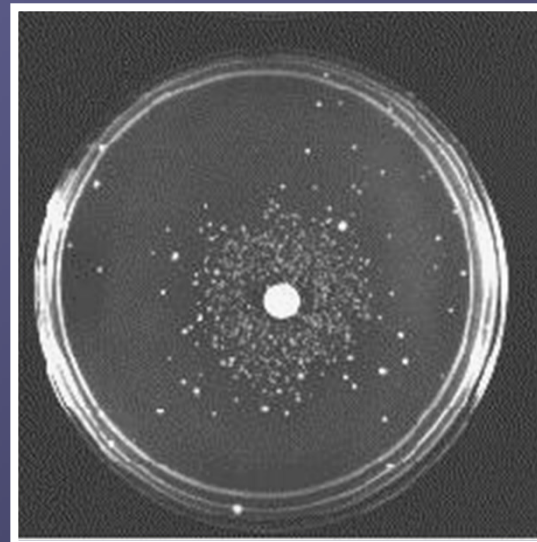
Testy na genové úrovni

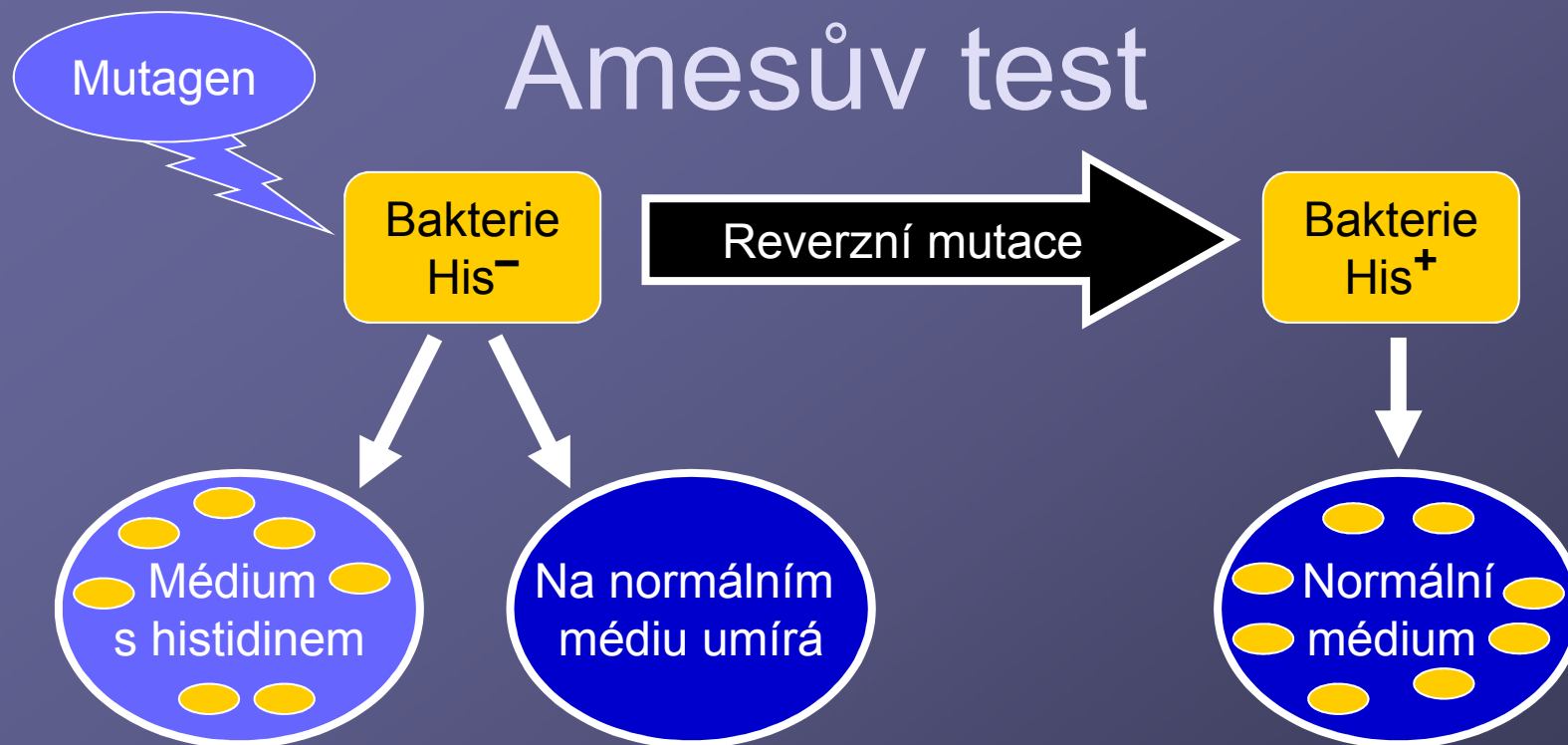
- Využívají zejména bakterií a kultur savčích buněk
 - Indukce resistantních mutant u savčích buněk *in vitro*
 - SOS/umu test
 - Amesův test (jeden z dosud nejpoužívanějších testů genotoxicity)

Amesův test



Bruce Ames (nar. 1928)

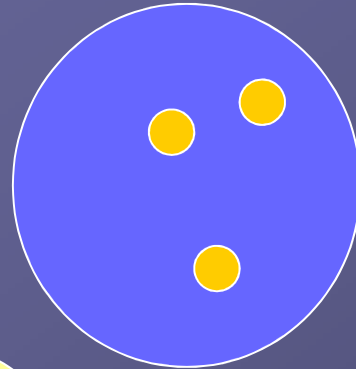




- Umožňuje studium reverzních mutací u histidin – deficientních kmenů bakterie *Salmonella typhimurium*. Tyto auxotrofní mutanty přežívají pouze na médiu obsahujícím histidin.
- Působením mutagenu dojde u některých buněk k reverzní mutaci, která způsobí „opravu“ genu pro syntézu histidinu. Bakterie s touto mutací tak znovu získají schopnost tvorby histidinu a přežívají i na médiu, které histidin neobsahuje.

Amesův test

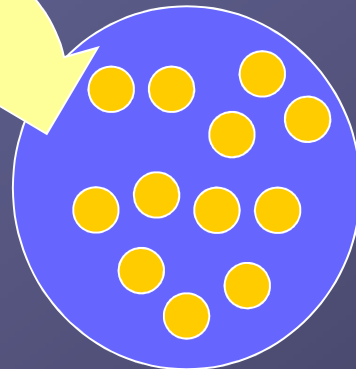
0



Negativní kontrola
SPONTÁNNÍ REVERTANTI

?

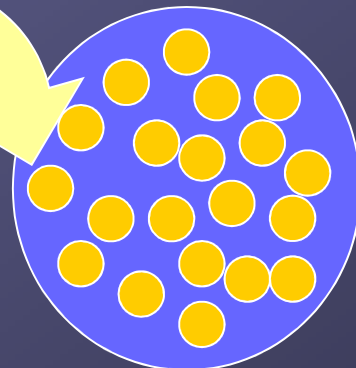
Proč lze i na negativní kontrole (tj. na misce bez jakéhokoliv mutagenu) pozorovat nárůst bakterií?



Miska s testovanou látkou
GENOTOXICITA PROKÁZÁNA

?

Interpretujte výsledek testu? Lze tímto výsledkem potvrdit genotoxicitu látky?

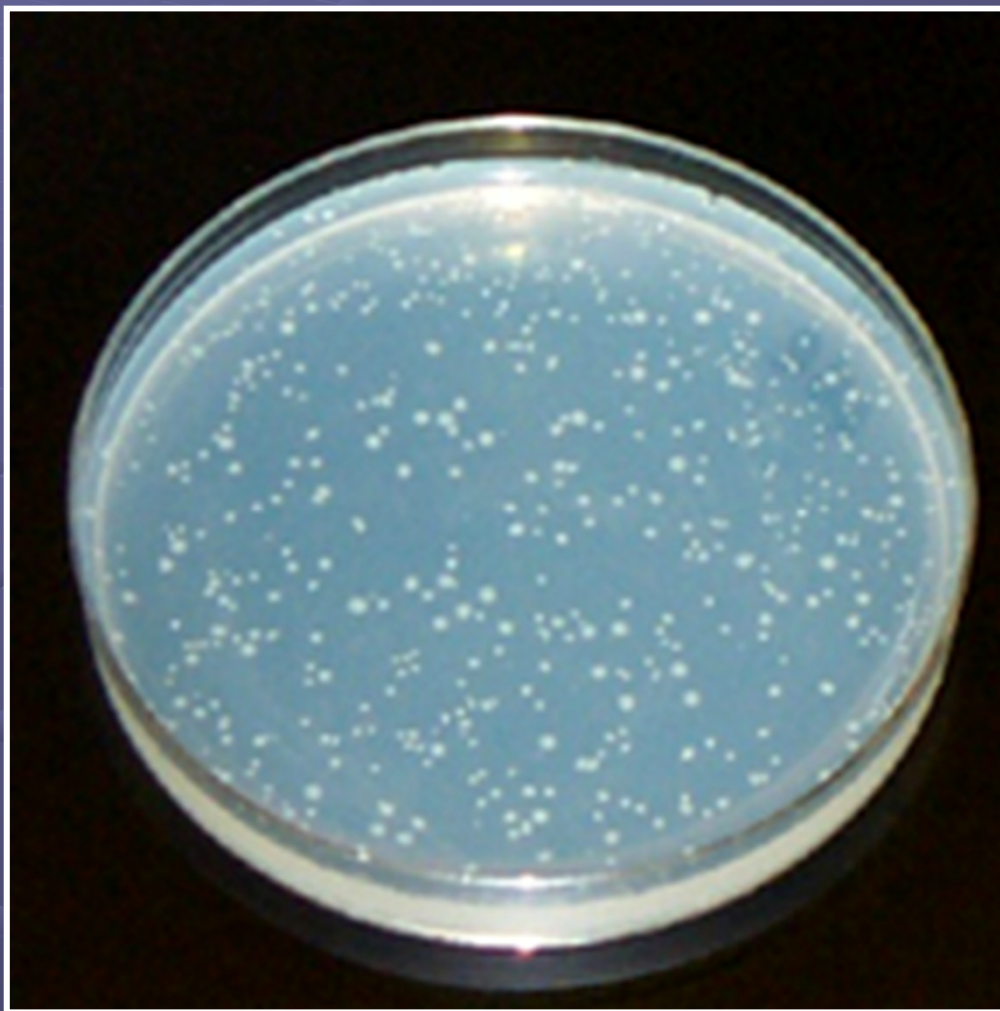


Pozitivní kontrola
SLOUŽÍ KE KONTROLE PRŮBĚHU TESTU A PRO SROVNÁNÍ

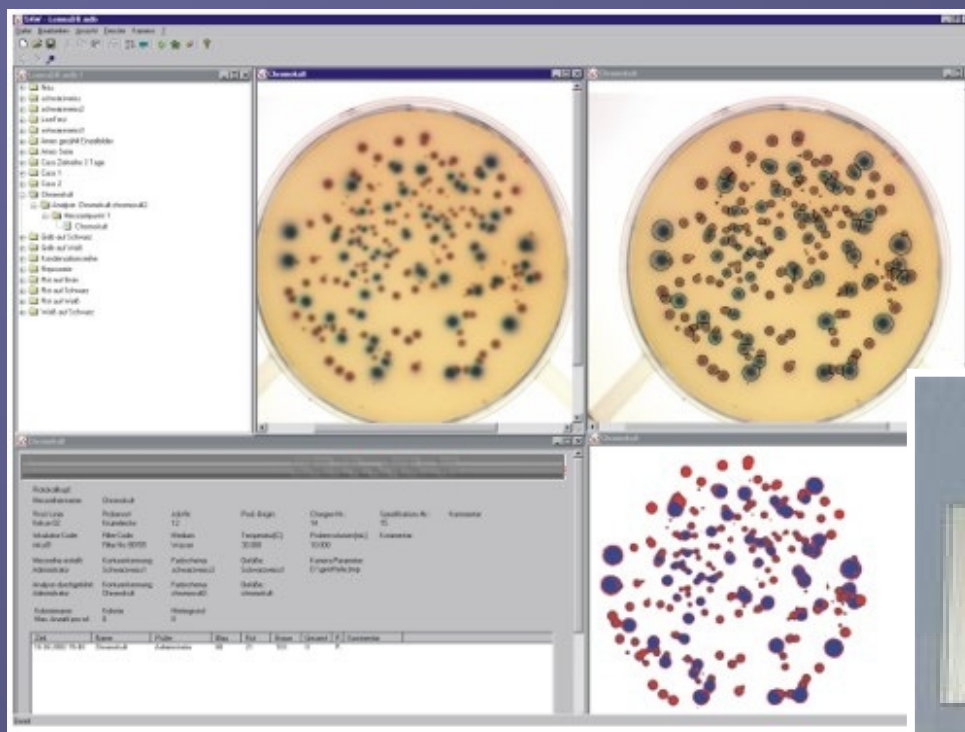
?

Vysvětlete, jaký význam má pozitivní kontrola (tj. aplikace známého mutagenu).

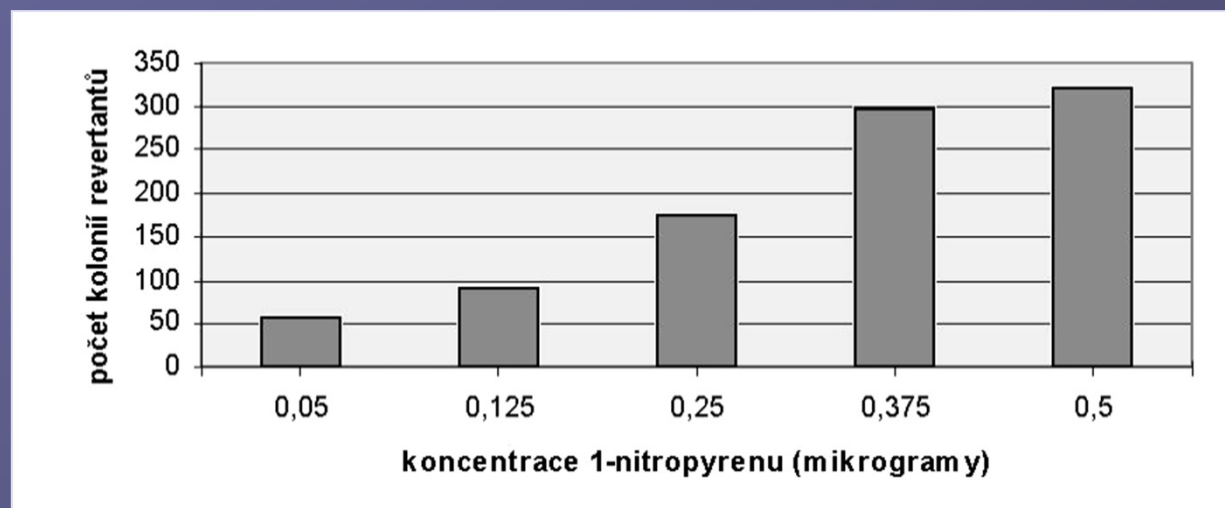
Výsledek Amesova testu



Amesův test – automatické odečtení výsledků

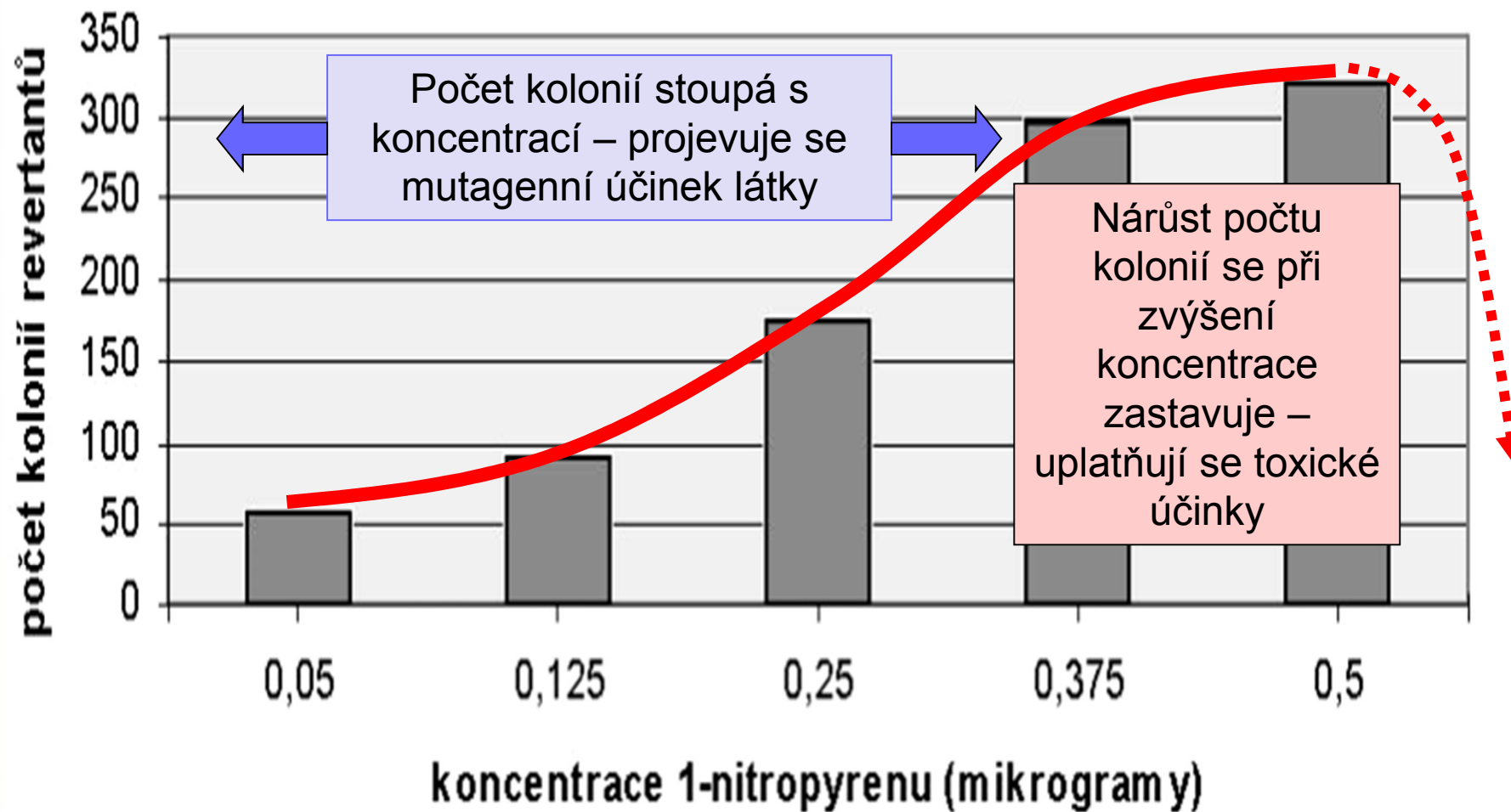


Úkol 1: Stanovení mutagenní aktivity 1-nitropyrenu pomocí Amesova testu

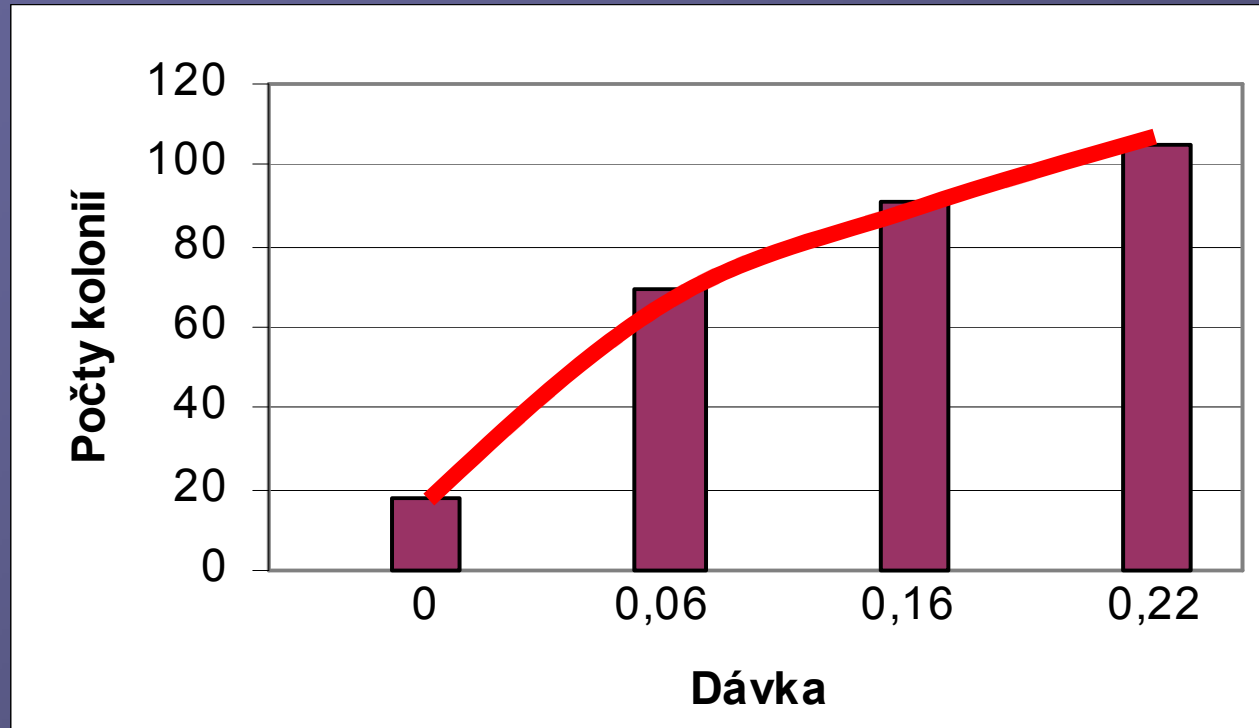


- Graf dokumentuje výsledky testování různých koncentrací 1-nitropyrenu.
- Jaký je vztah mezi koncentrací látky a počtem kolonií revertantů ? Lze v tomto případě prokázat mutagenní aktivitu ?
- Vysvětlete, proč není závislost počtu kolonií na koncentraci látky lineární ? Proč testujeme látku ve více koncentracích ?

Řešení úkolu 1



Řešení úkolu 2

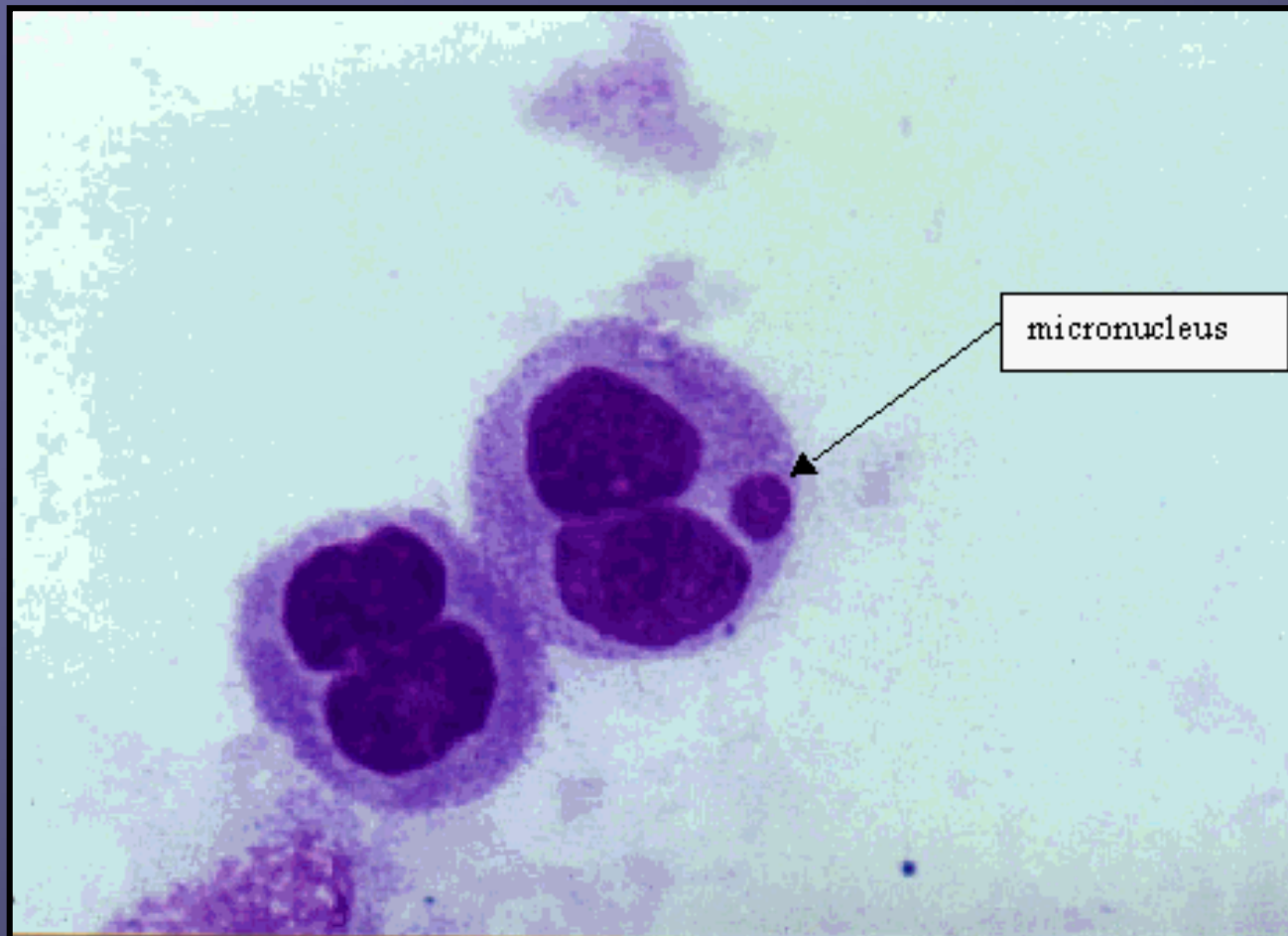


- Vzestup počtu kolonií ve vztahu k dávce jasně prokazuje pravděpodobné genotoxické účinky.
- Genotoxický účinek vůči bakteriím však ještě není spolehlivým důkazem genotoxicity či dokonce karcinogenity pro lidský organismus.

Testy na chromozomové úrovni

- **Micronucleus test** („test tvorby mikrojadér“) je založen na hodnocení výskytu acentrických chromozomových fragmentů. Tyto části jaderné hmoty zpravidla zůstávají po skončení mitózy mimo buněčné jádro a vytvářejí tzv. **mikrojádra**.
- **Studium výměn sesterských chromatid** neboli **SCE** (Sister Chromatid Exchanges)
- **Stanovení frekvence strukturních, popř. numerických chromozomových aberací** u savčích buněk v kultuře, laboratorních zvířat nebo přímo u osob, které přišly do styku se suspektním mutagenem (lze tak monitorovat genotoxickou zátěž u pracovníků v rizikových provozech)

Micronucleus test

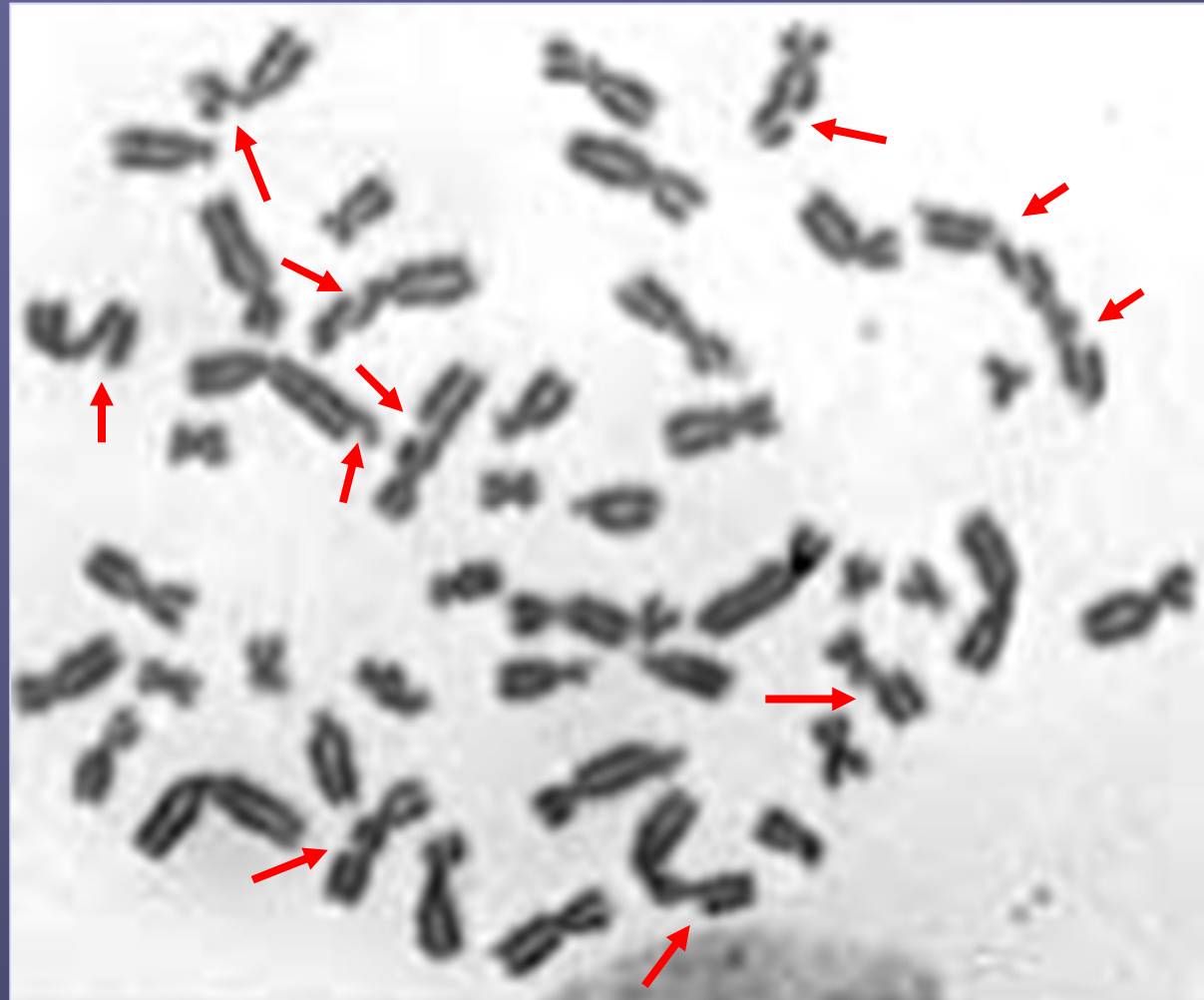


**Provádíme inhibici cytokineze
cytochalasinem B**

Testy na chromozomové úrovni

- **Micronucleus test** („test tvorby mikrojadér“) je založen na hodnocení výskytu acentrických chromozomových fragmentů. Tyto části jaderné hmoty zpravidla zůstávají po skončení mitózy mimo buněčné jádro a vytvářejí tzv. **mikrojádra**.
- **Studium výměn sesterských chromatid** neboli **SCE** (Sister Chromatid Exchanges) – viz skriptu „Klinická cytogenetika 1“ – str. 95
- **Stanovení frekvence strukturních, popř. numerických chromozomových aberací** u savčích buněk v kultuře, laboratorních zvířat nebo přímo u osob, které přišly do styku se suspektním mutagenem (lze tak monitorovat genotoxickou zátěž u pracovníků v rizikových provozech)

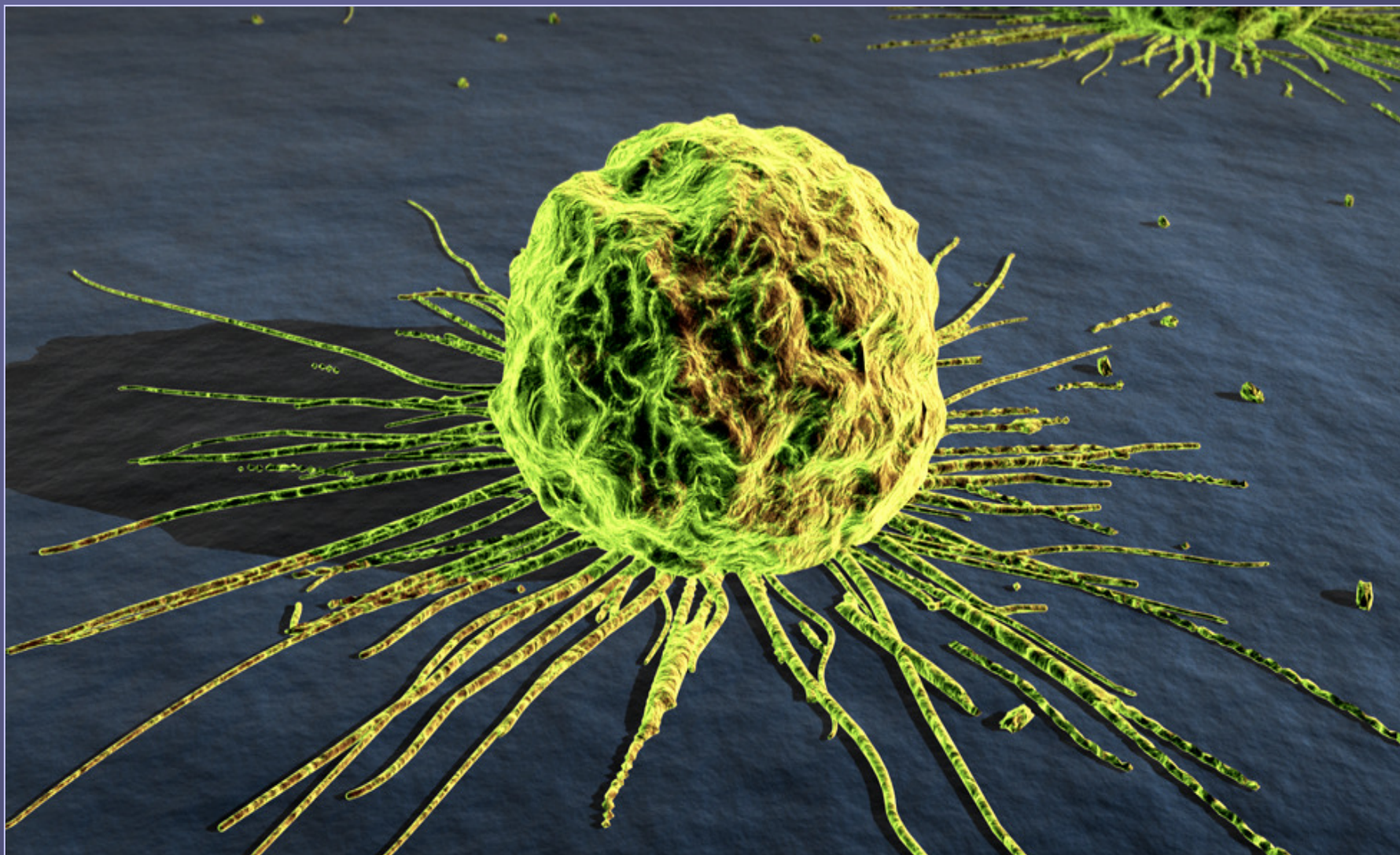
Analýza zlomů a dalších strukturních aberací



Chromozomové aberace jako měřítko genotoxických vlivů

Percentuální zastoupení buněk s chromozomovými aberacemi	Výsledek
do 2%	normální nález, spontánní úroveň aberací
2 – 4%	hraniční výsledek – vliv mutagenu nelze vyloučit
více než 4%	pravděpodobný vliv mutagenu

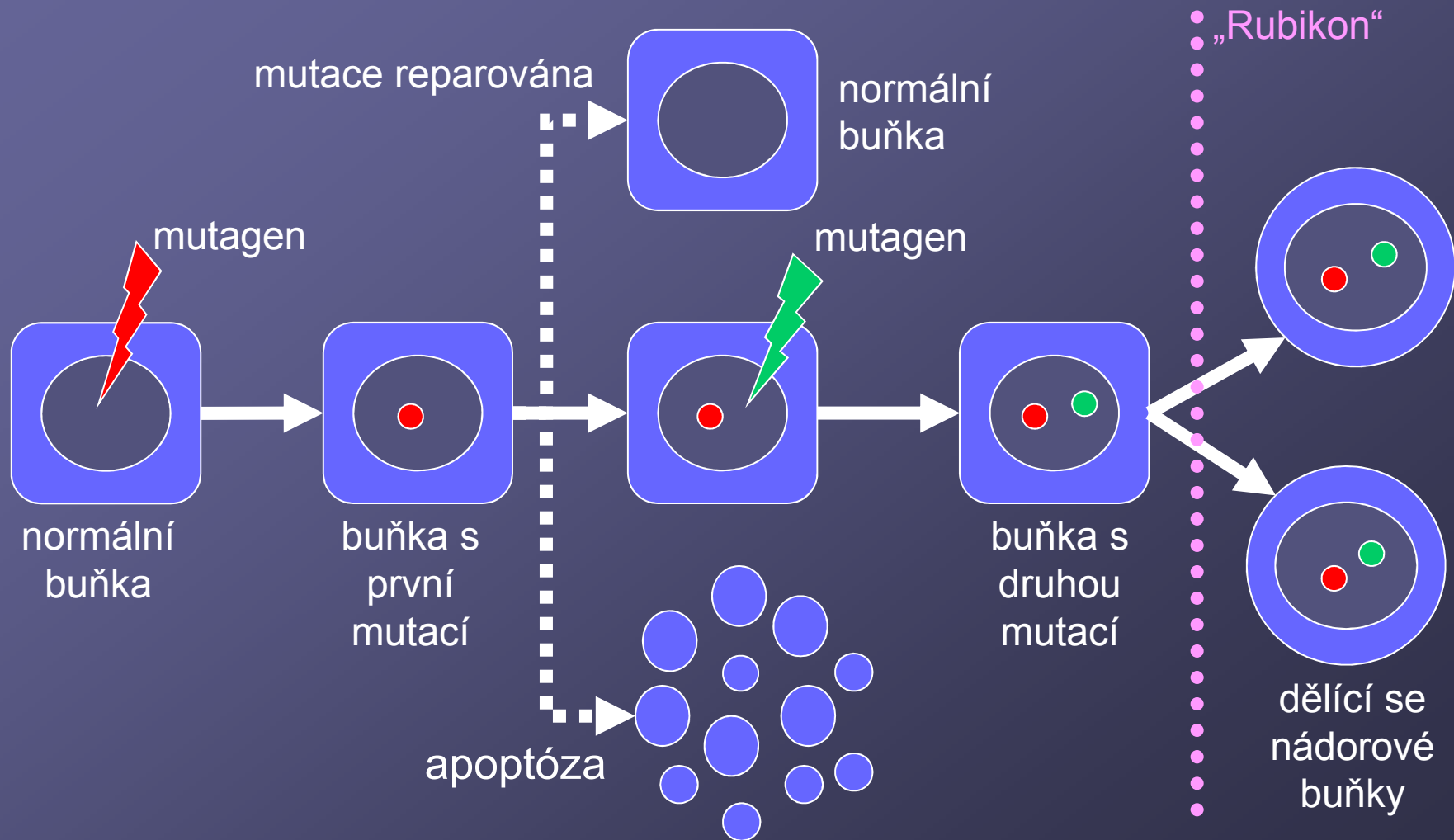
Jak vzniká nádorová buňka?



Karcinogeneze (kancerogeneze)

- Soubor procesů, při nichž dochází k transformaci normální buňky na nádorovou buňku.
- Transformovaná buňka se nekontrolovaně dělí a vytváří **nádor**.
- Nádor se formou metastáz šíří po těle.

Vznik nádorové buňky (zjednodušené schéma)



Mutagen X Karcinogen

- Každý prokázaný mutagen je suspektním karcinogenem.
- Ne všechny karcinogeny jsou rovněž mutagenní.
- Spolehlivé stanovení karcinogenity vůči lidskému organismu bývá složité a v některých případech těžko proveditelné.

Biochemické a molekulárně biologické rozdělení karcinogenů

- **DNA-reaktivní karcinogeny** – všechny mutageny s prokázanou karcinogenní aktivitou.
- **Epigenetické karcinogeny** – nevykazují mutagenní aktivitu, napomáhají však procesu karcinogeneze jinými mechanismy:
 - stimulují buňku k proliferaci;
 - ovlivňují receptory růstových faktorů a inhibitorů na povrchu buněk;
 - ovlivňují metylaci genů, které se účastní regulace buněčné proliferace (methylace genu rozhoduje o tom, zda nastane transkripce nebo nikoliv).

Rozdělení karcinogenů podle charakteru

- chemické

- fyzikální

- biologické

Přímé hodnocení karcinogenity

- Některé karcinogeny jsou epigenetické, proto mají testy genotoxicity jen omezenou výpovědní hodnotu.
- K hodnocení karcinogenní aktivity využíváme speciální testy a studie, k nimž patří:
 - **přímé laboratorní testy**
 - **epidemiologická studia lidské populace** (hodnotíme a srovnáváme výskyt nádorů u různě exponovaných lidských populací).

Databáze IARC

*seznam karcinogenních látek,
hodnocení karcinogenity aj.*

Databáze IARC

(International Agency for Research of Cancer)

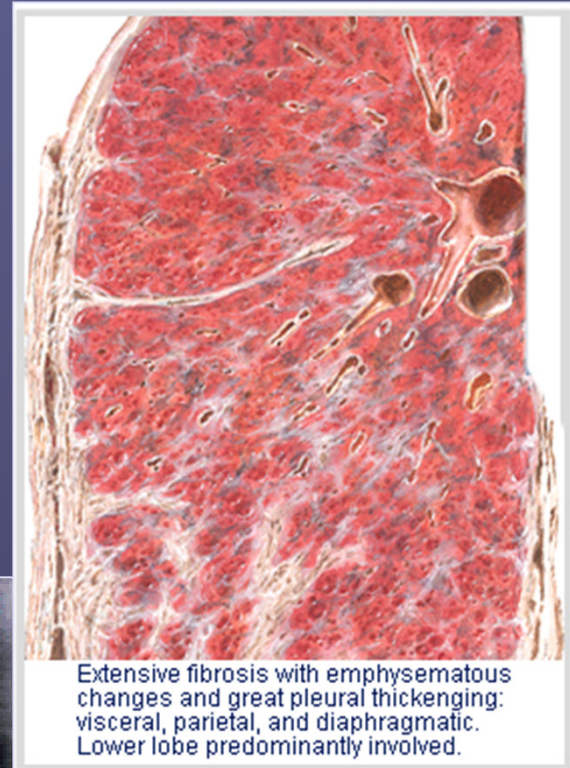
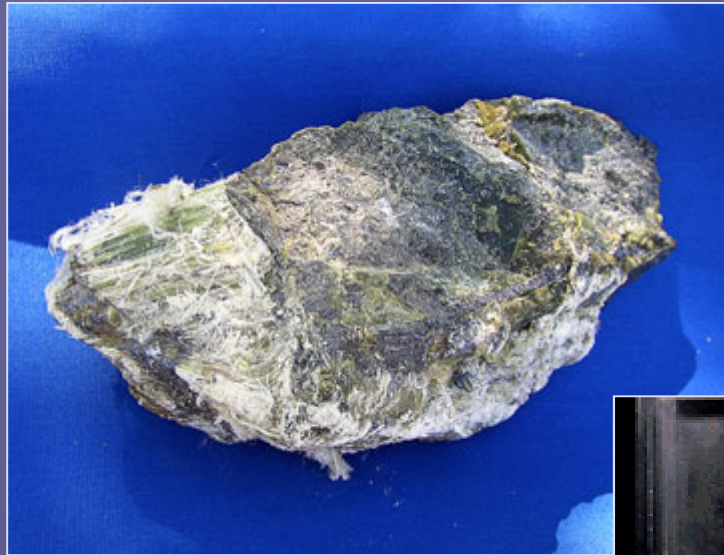
● Pro přímý vstup použijte adresu:

<http://monographs.iarc.fr/index.php>

Klasifikace testovaných látek podle IARC

- **Skupina 1:** Látky (směsi) karcinogenní pro člověka
- **Skupina 2A:** Látky (směsi) pravděpodobně karcinogenní pro člověka
- **Skupina 2B:** Látky (směsi) s možným karcinogenním účinkem
- **Skupina 3:** Látky (směsi), jejichž karcinogenitu pro člověka nelze klasifikovat (důkazy karcinogenity nejsou dostatečné)
- **Skupina 4:** Látky (směsi), které pravděpodobně nevykazují karcinogenní účinek vůči člověku

Asbest



Extensive fibrosis with emphysematous changes and great pleural thickening: visceral, parietal, and diaphragmatic. Lower lobe predominantly involved.

Asbestóza

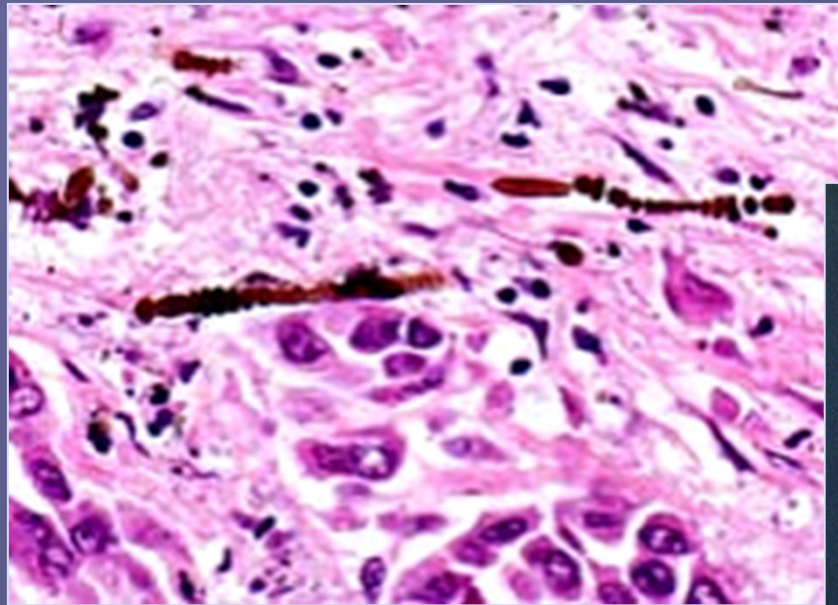
(chronická obstrukční
plicní nemoc)



Emfyzém

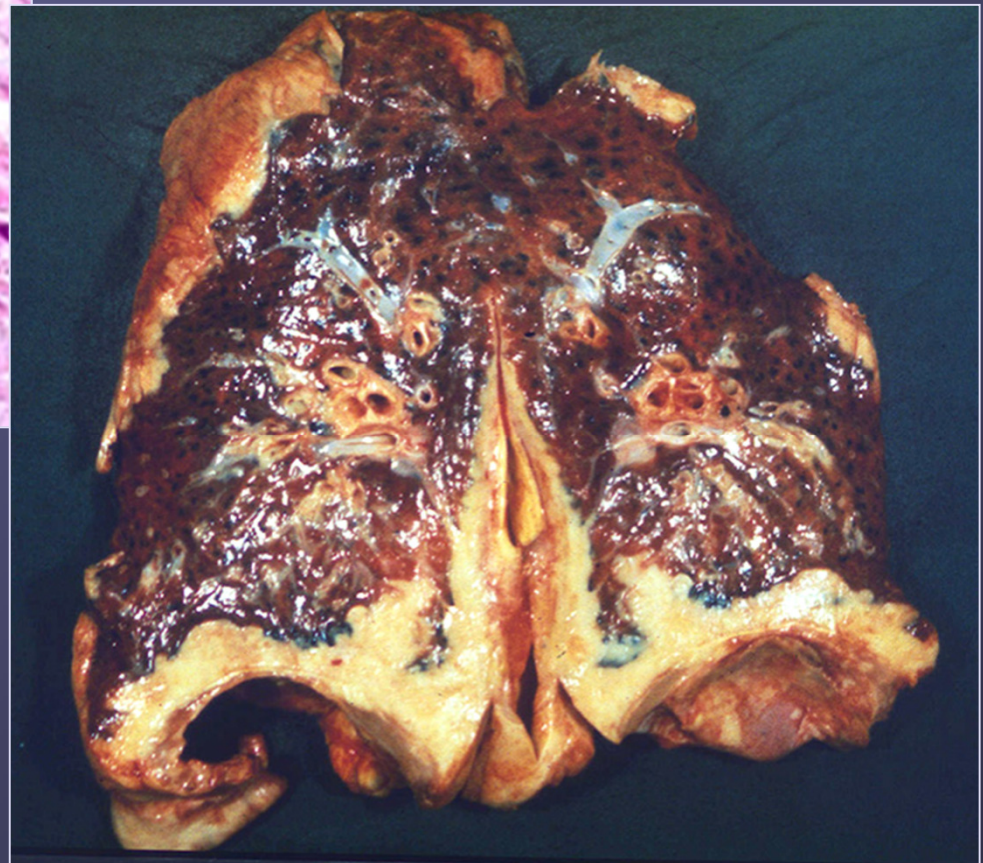


Chronická azbestóza vede ke vzniku mezoteliomu

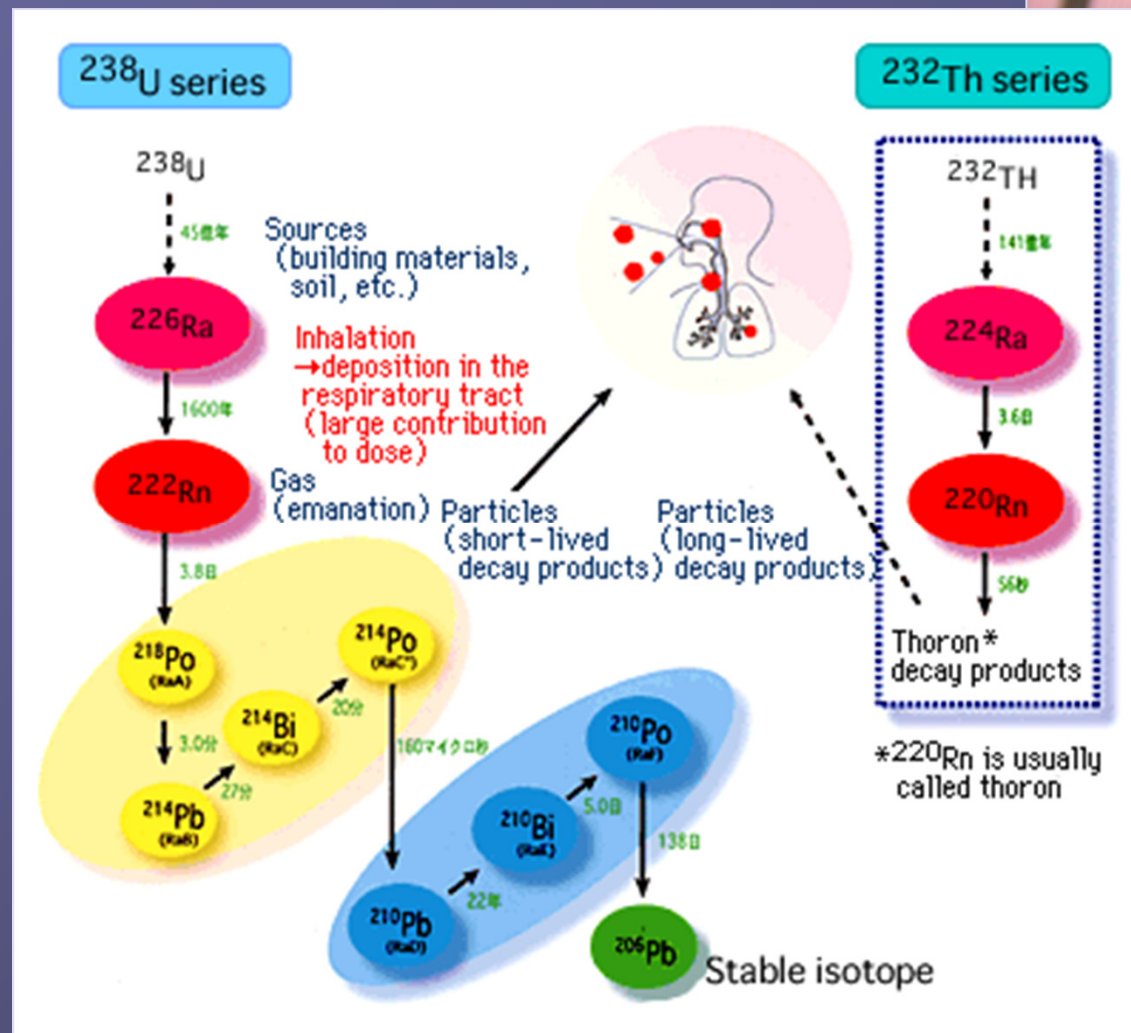


Feruginózní tělíčka v
plicní tkáni

Mezoteliom (nádor vzniklý
z mezotelových buněk)

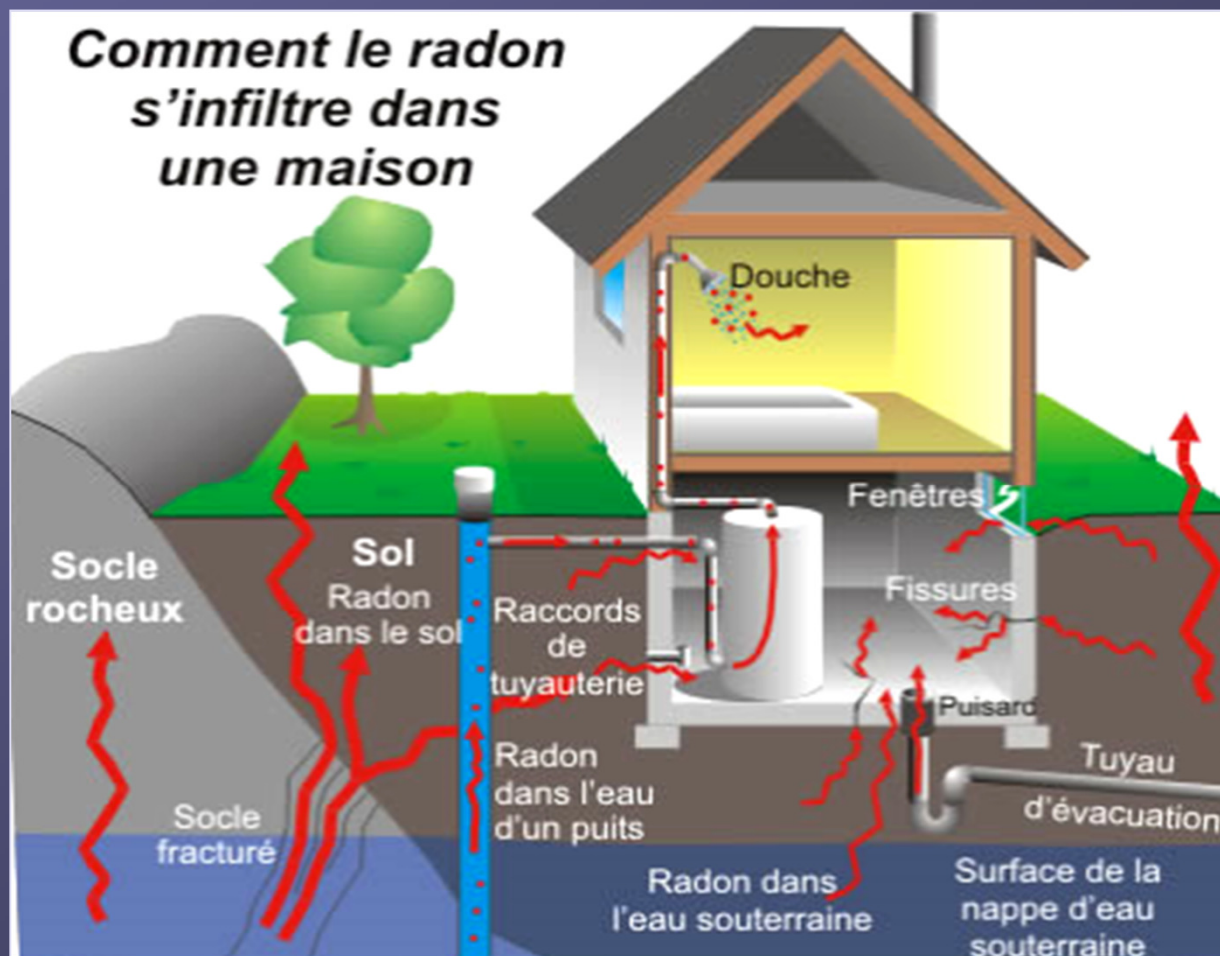


A close-up photograph of the element Radon (Rn) on a periodic table. The element's symbol "Rn" is prominently displayed in the center, with its atomic number "86" below it. Above the symbol, the mass number "(222)" is visible. To the left of the element, a portion of another element's box is visible, showing the symbol "O" and a red background. Below the element box, a small blue box contains the word "series" in white text. The overall image is slightly blurred, focusing on the element Rn.

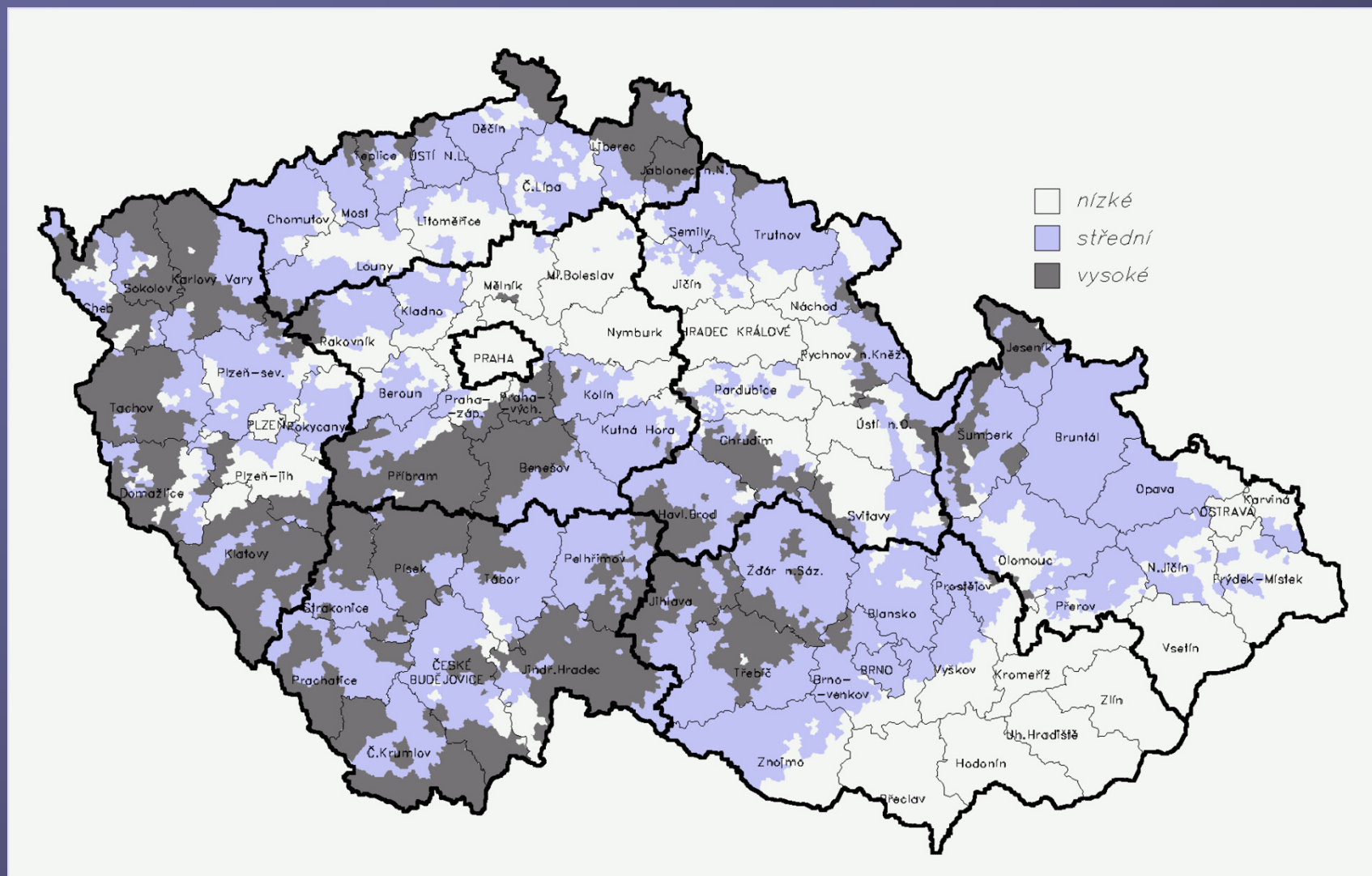


Radonové riziko

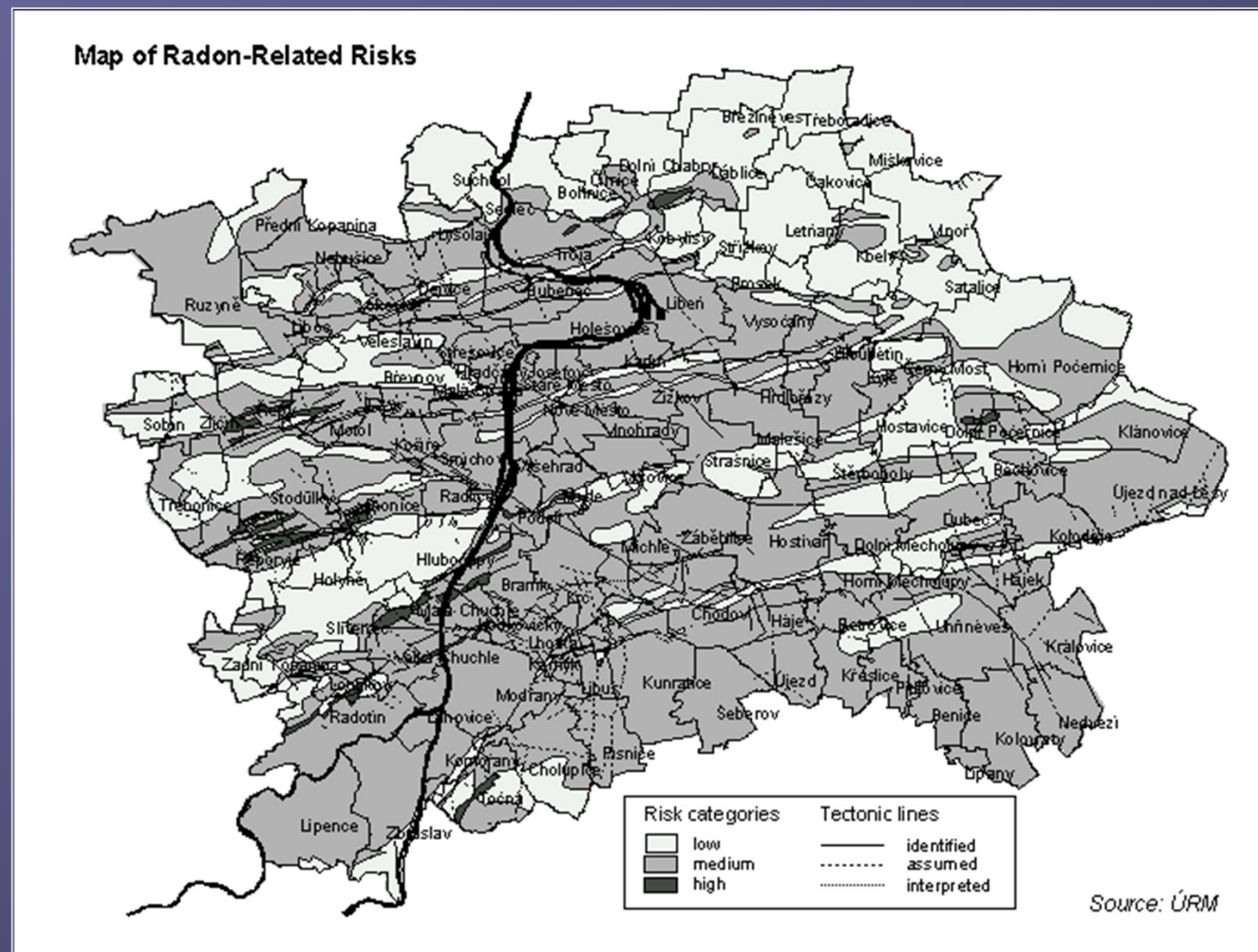
- Podmíněno geologickým podkladem
- 3 kategorie
 - Nízké (1)
 - Střední (2)
 - Vysoké (3)



Mapa radonového rizika



Mapa radonového rizika - Praha



Na shledanou a hodně štěstí!

