

Základy Toxikologie

KBB/ZTOX



doc. Ing. Radim Vrzał, Ph.D.



**Mutagenese, Kancerogenese,
Teratogenese**
(orgánově necílená toxicita)



Cíle:



- ✘ Seznámení s genotoxickými poškozeními
- ✘ Aspekty podmiňující genotoxické poškození



Klíčové pojmy:

Mutagen, kancerogen, teratogen



Genotoxická

- hodnocení účinků na dědičný materiál – DNA
- **změny NEJSOU přenositelné** – výměna sesterských chromatid, zlomy DNA řetězců, neplánovaná syntéza DNA

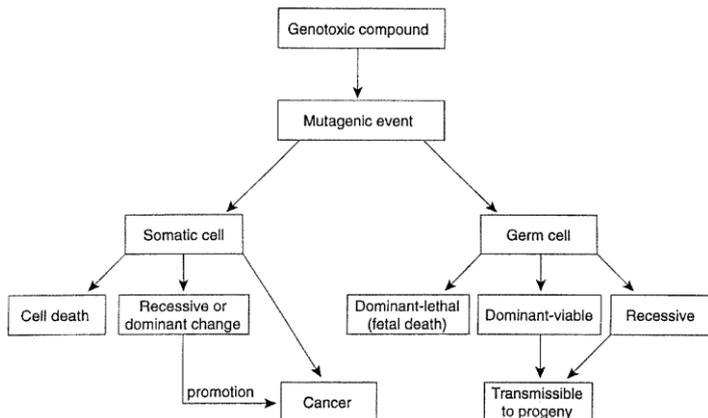


Mutagenese

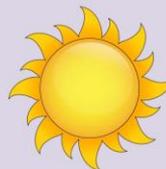
Mutace = přenositelná změna v genetickém materiálu organismu

Mutageny - chemické, fyzikální, biologické

- chemické – nitrosaminy, některé pesticidy, PAHs
- fyzikální – ionizující záření



PHYSICAL



RADIATION



X-RAYS

CHEMICAL

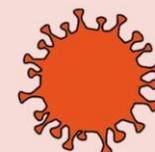


CIGARETTES



GRILLED MEAT

BIOLOGICAL



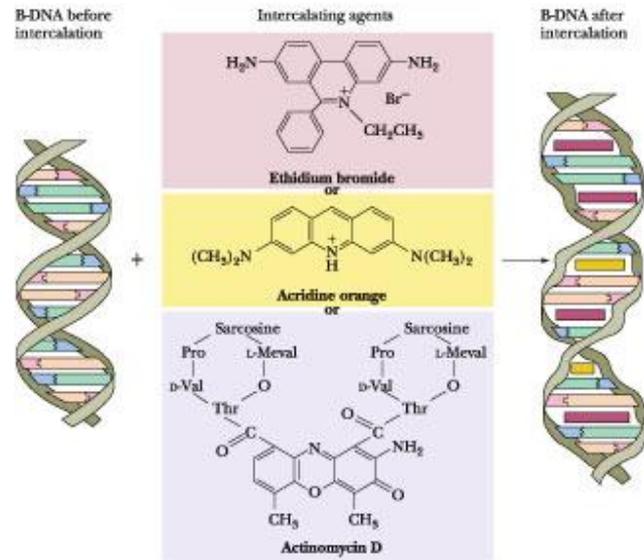
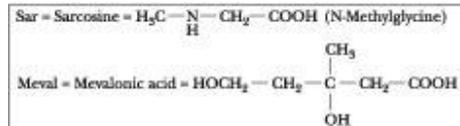
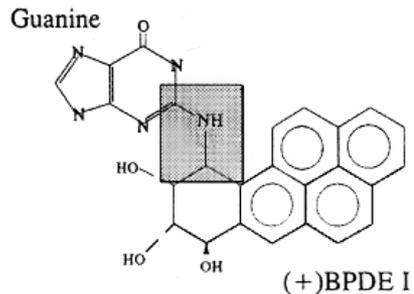
VIRUSES (HPV)



BACTERIA
(*H. PYLORI*)

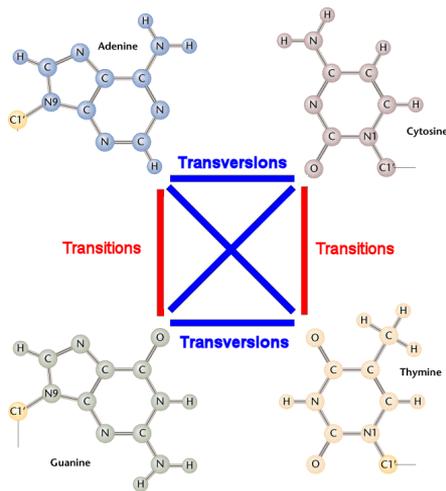
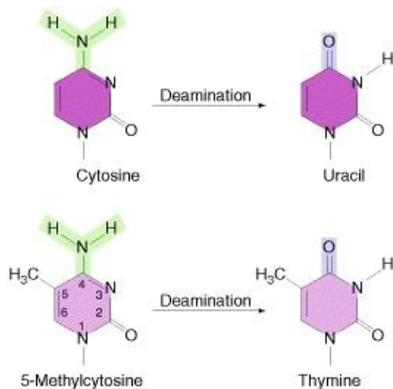
Přenositelná změna v lineární sekvenci DNA může být v důsledku:

- nepřesnosti v DNA replikaci (**interkalační činidla**)
- bodové mutace (**záměna báze**, posun čtecího rámce)
- chromozomální aberace



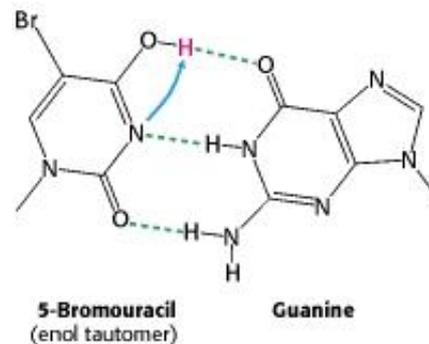
Bodové mutace – transverse vs tranzice

- **kyselina dusitá** – z nitrosaminů, dusitanů, dusičnanů –
reaguje s aminoskupinami nukleotidů



- **Tautomerie** –
přeuspořádání amino na
imino a keto na enol formy

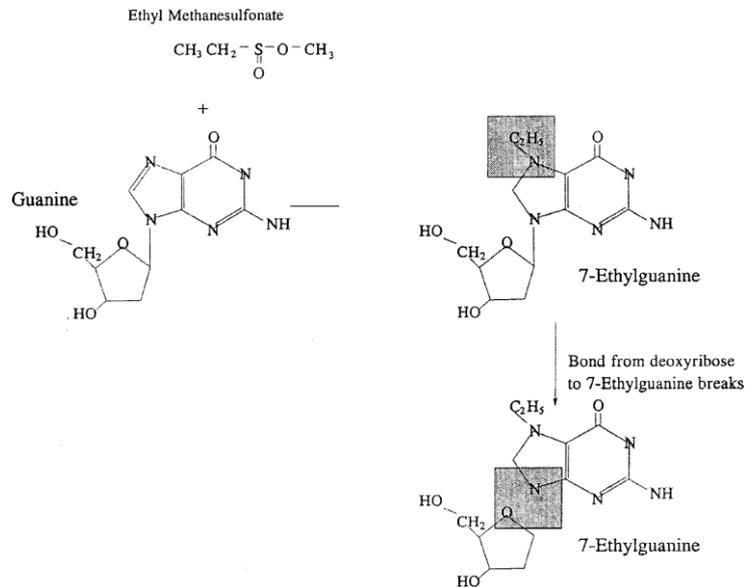
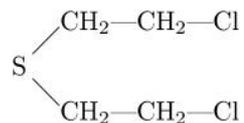
- Analoga bazí -



Alkylace

– přidavek krátkého uhlovodíkového zbytku na určité místo v bázi (EMS)

– **yperit** (hořčičný plyn)



Testy na detekci mutagenů

Mutace DNA → změna RNA → změna proteinu = **měřitelná buněčná funkce** (auxotrofní změny)

!!! Obtížná detekce změn v DNA savců !!!

Nesavčí testy mutagenicity – předběžný screening

- bakteriální systémy
- rychlé, levné
- nemají jádro, enzymy

zodpovědné za bioaktivaci

Ames assay – kmen *Salmonella*

-testovací kmen má mutaci způsobující neschopnost syntetizovat **His** (esenciální pro dělení)

- zvýšená tvorba kolonií v důsledku mutace operonu pro syntézu **His**

The Standard Ames Assay

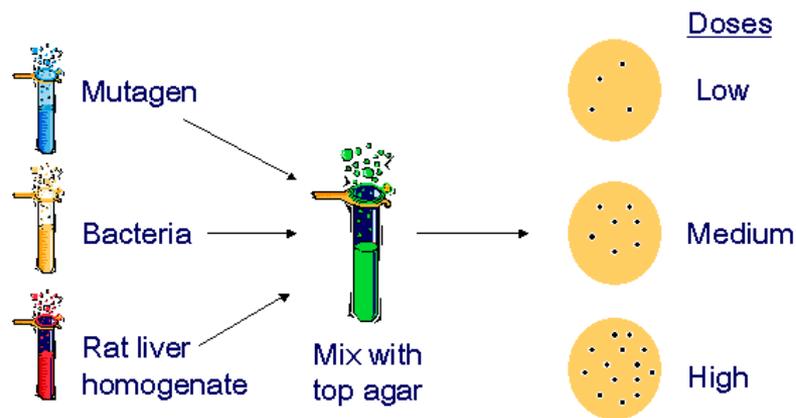


Plate on His-selective agar and count colonies!

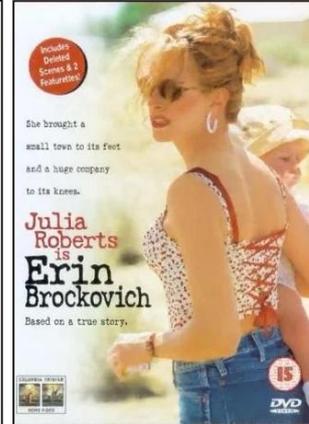
In vivo savčí systémy – nejdůležitější pro odhad mutagenicity u člověka – lze zvolit cestu expozice (**dlouho trvají, drahé**)

Epidemiologické studie – nelze kontrolovat všechny proměnné

Mutagenní potenciál má velkou variabilitu skrz třídu analytů (např. kovy)



Erin Brockovich

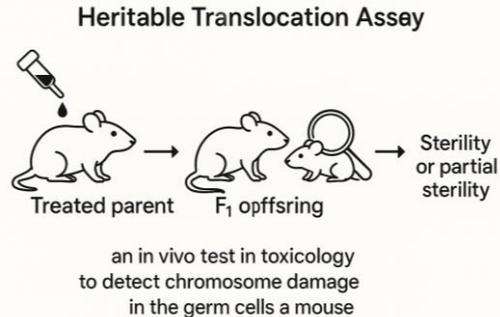


2000 film

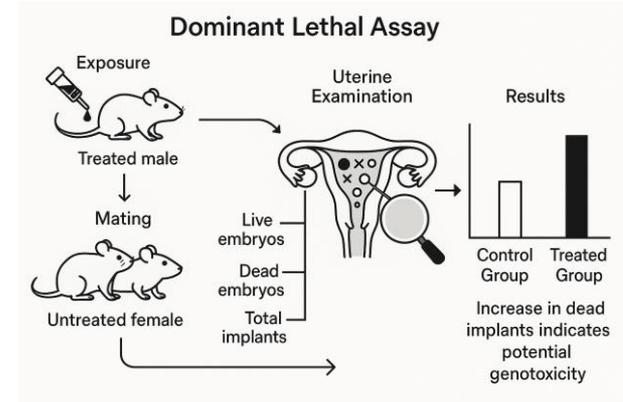
Germ cell assays

- **mouse-specific locus assay** - inkubace wt-myši před pářením s kmenem homozygotním pro určitý počet recesivních genů fenotypicky snadno pozorovatelných – není-li mutace → všichni potomci budou wt

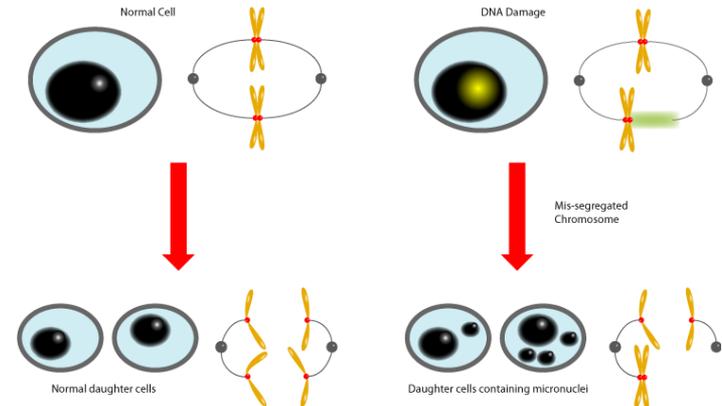
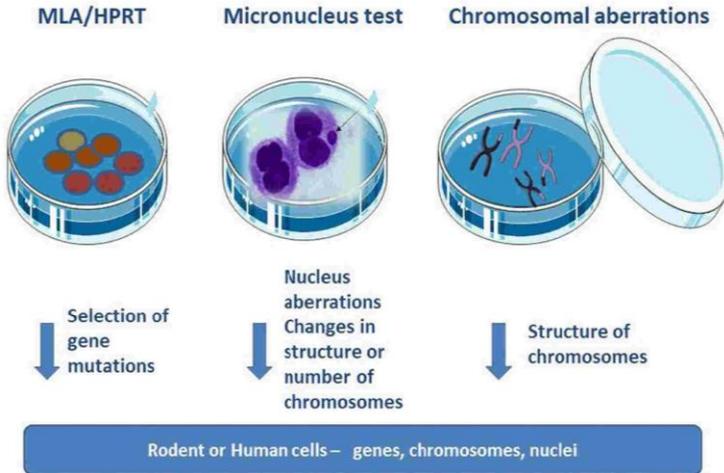
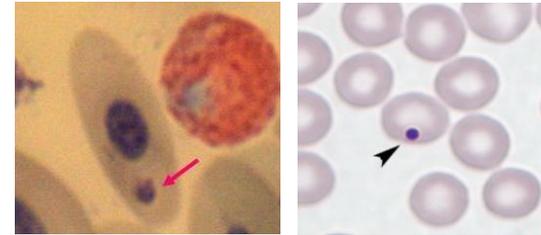
Heritable translocation assay – samci po expozici mutagenu pářeny se samicemi a březí samice mohou donosit, samčí potomci dále pářeny se samicemi, jde-li o translokaci pak první generace samců bude částečně či úplně sterilní



Dominant lethal assay – samci vystaveni mutagenu, každý týden nové samice, samice utraceny před porodem a počítá se smrt plodu



In vitro testování – barvení s bromodeoxyuridinem, monitorování výměny sesterských chromatid, monitoring mutací v určitém genu, např. HPRT, TK



Mikrojaderný test – chromozomální změna je detekována jako přítomnost mikrojadérka v cytoplasmě interfázních buněk

Chemická karcinogeneze

= Studium mechanismů, kterými chemické karcinogeny indukují rakovinu

- Karcinogeneze = proces vývoje rakoviny
- Rakovina = skupina nemocí charakterizovaná nekontrolovaným růstem abnormálních buněk, které získaly schopnost se dělit a napadat okolní tkáň (neoplasmus / tumor – benigní / maligní)
- Epidemiologické studie – prudký nárůst s věkem

Je potřeba **3-7 kritických zásahů** – akumulace mutací **kritických genů** – výsledky nedokonalé replikace/opravy DNA, oxidační poškození DNA

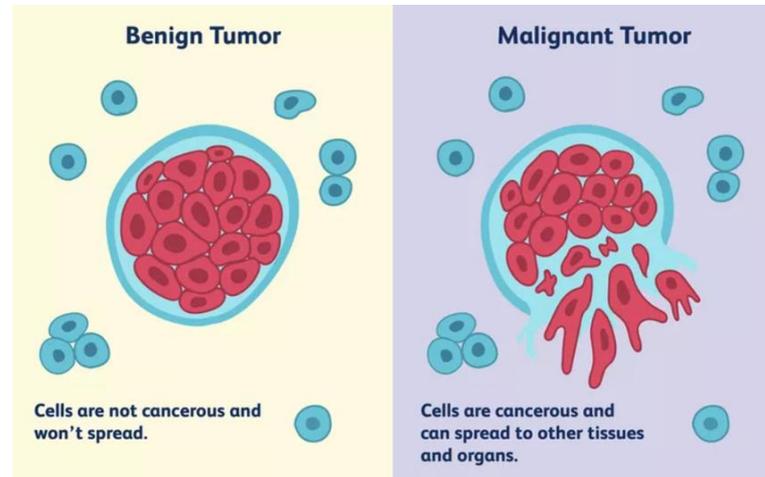
-Většina rakovin je monoklonálních

Benign

Generally slow growing
Few mitotic figures
Well-differentiated architecture, resembles that of parent tissue
Sharply demarcated mass that does not invade surrounding tissue
No metastases

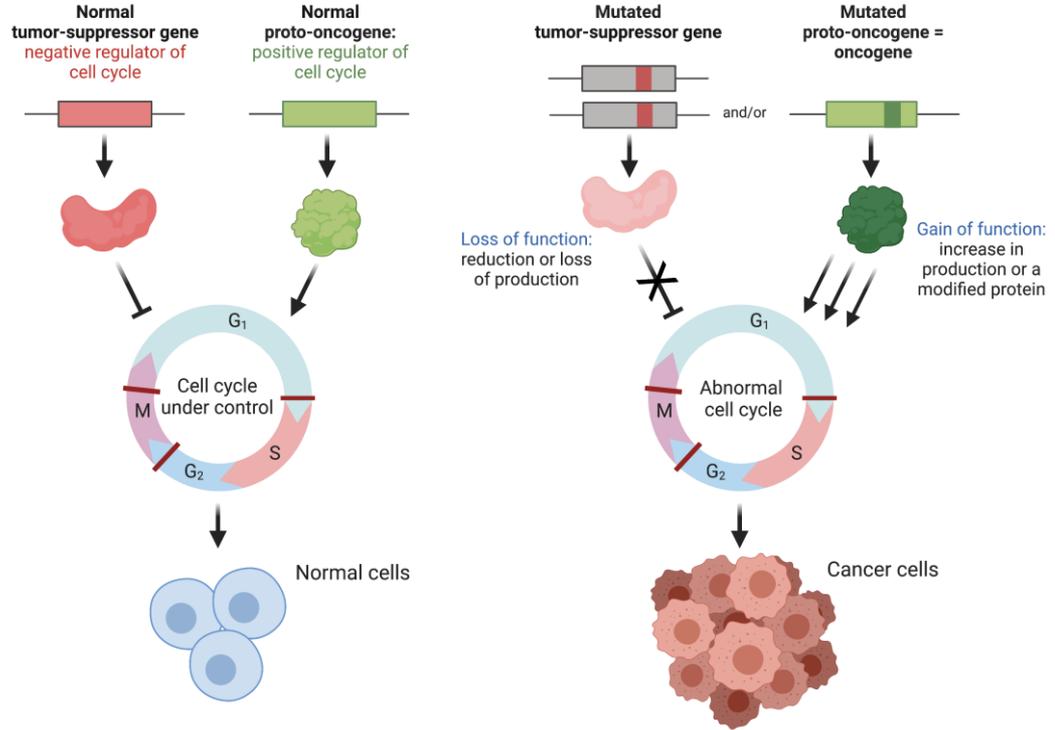
Malignant

May be slow to rapid growing
Numerous mitotic figures
Some lack differentiation, disorganized; loss of parent tissue architecture
Locally invasive, infiltrating into surrounding normal tissue
Metastases



- V normálních buňkách – **proto-onkogeny** – mutační změna vede k „**získání funkce**“ → **onkogeny**

- **Tumor supresorové geny** – negativní regulátory buněčného růstu - mutační inaktivace vede ke „**ztrátě funkce**“



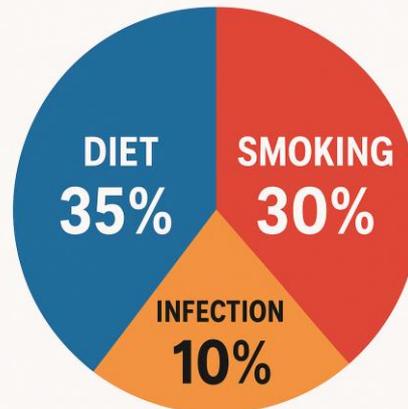
Rakovina člověka

Hlavní pohled – epidemiologové – spojení genetiky, vlivu prostředí, vlivu kultury

- 30-80% rakovin je asociováno s **prostředím**, ve kterém žijeme
- **Prostředí** = všechny aspekty životního stylu (kouření, strava, práce, atd.)

Major Factors	Best Estimate (%)	Range of Acceptable Estimates (%)
Diet	35	10–70
Tobacco	30	25–40
Infection	10	1–?
Reproductive and sexual behavior	7	1–13
Occupation	4	2–8
Geophysical factors	3	2–4
Alcohol	3	2–4
Pollution	2	<1–5
Food additives	1	–5–2
Medicines	1	0.5–3
Industrial products	1	<1–2
Unknown	?	?

RISK FACTORS FOR CANCER



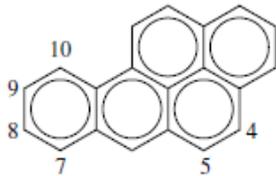
Historie

1771 – J.Hill a 1776 – P.Pott – vystavení chemikáliím zvyšuje riziko vzniku rakoviny (rakovina nosu u šňupajících tabák, rakovina šourku u kominíků)

1915 – K.Yamagiwa a K.J.Ichikawa – zdůvodnění Pottova pozorování – aplikace dehtu na králíčí kůži (2-3 dny po celý rok) produkovala karcinomy

- 1) chemikálie produkuje rakovinu u zvířat
- 2) vztah mezi lidskými epidemiologickými studiemi a zvířecí karcinogenitou

1930 – izolace benzo[a]pyrenu



Benzo(a)pyrene (BP)

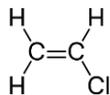


PERCIVAL POTT

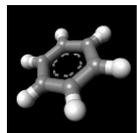
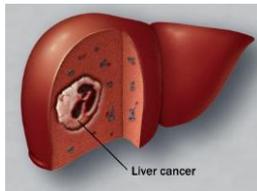


Klasifikace lidských karcinogenů

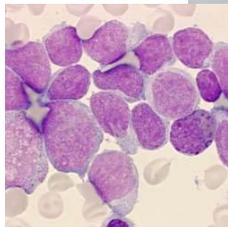
Epidemiologická data



Vinyl chlorid



Benzen



Dlouhá doba – 20-30 let → těžké určit karcinogen

- Two-year rodent carcinogenesis bioassay
- ~100 % Lidské karcinogeny → hlodavčí karcinogeny

←
?



Klasifikace lidských karcinogenů

Studie na hlodavcích – **obtížné určit lidský karcinogen !!!**

Příčina? – jiný druh, použití vysokých dávek, doba života hlodavců, nutnost extrapolace z vysokých na nízké dávky pro lidi, atd.

Karcinogeny – klasifikace dle váhy důkazů – **dostačující, omezené, nedostatečné**

Kritéria pro klasifikaci karcinogenů (Národní toxikologický program, 14th Report on carcinogens (ROC), 2016 - <https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/roc/index-1.html>)

Známé lidské karcinogeny – dostatek důkazů pro karcinogenitu ze studií na lidech (aflatoxin, konzumace alkoholických nápojů,..)

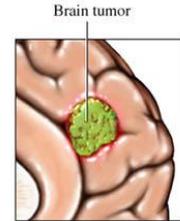
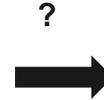
Předpokládané lidské karcinogeny – omezený počet důkazů o karcinogenitě ze studií na lidech (akrylamid, chloroform, naftalen,..)

- dostačující důkaz o karcinogenitě ze studií na zvířatech
- menší než dostačující počet důkazů o karcinogenitě u lidí či zvířat, ale látka patří ke strukturně dobře definované třídě látek jejíž členové jsou uvedeny v předchozím ROC

Kriteria dle EPA a dle IARC (International Agency for Research on Cancer - součást WHO - <http://www.iarc.fr/>)

IARC	EPA
1	Group A Human carcinogens Sufficient evidence from epidemiological studies to support a causal association between exposure to the agents and cancer
2A	Group B Probable human carcinogens
	Group B1 Limited epidemiological evidence that the agent causes cancer regardless of animal data
	Group B2 Inadequate epidemiological evidence or no human data on the carcinogenicity of the agent and sufficient evidence in animal studies that the agent is carcinogenic
2B	Group C Possible human carcinogens Absence of human data with limited evidence of carcinogenicity in animals
3	Group D Not classifiable as to human carcinogenicity Agents with inadequate human and animal evidence of carcinogenicity or for which no data are available
4	Group E Evidence of noncarcinogenicity for humans Agents that show no evidence for carcinogenicity in at least two adequate animal tests in different species or in both adequate epidemiologic and animal studies

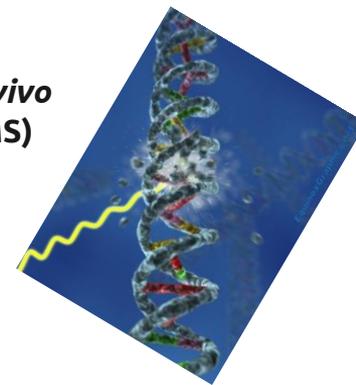
Květen 2011 – Radiofrekvenční elektromagnetické pole (Skupina 2B**) – nárůst gliomů o 40% (30min denně po dobu 10 let)**



Skupiny látek spojených s karcinogenesí

Genotoxické – mutagenní v *in vitro* testech a **způsobují permanentní změnu v DNA *in vivo***

- I. – přímá vazba na DNA bez nutnosti buněčné aktivace (N-methyl-N-nitrosourea, EMS)
- II. – nutná aktivace enzymy na ultimální karcinogeny (benzo[a]pyren, aflatoxin B1)
- III. – radiační a oxidační poškození DNA
- IV. – anorganické soli (arsen, chrom, nikl)

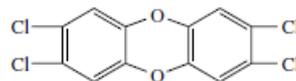


Tři typy poškození DNA:

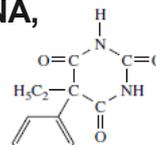
- genové mutace – substituce bazí, frame shift, atd.
- chromosomové aberace – delece, duplikace, atd.
- změna v ploiditě – zisk či ztráta jednoho či více chromosomů

Ne-genotoxické (epigenetická činidla)– nezpůsobují primárně změnu DNA, ale **mění expresi** určitých genů

- I. – hormony (konjugované estrogény)
- II. – imunosupresiva (cyclosporin A)
- III. – pevné látky (azbest)
- IV. – propagátory nádorů (TCDD, fenobarbital)



2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

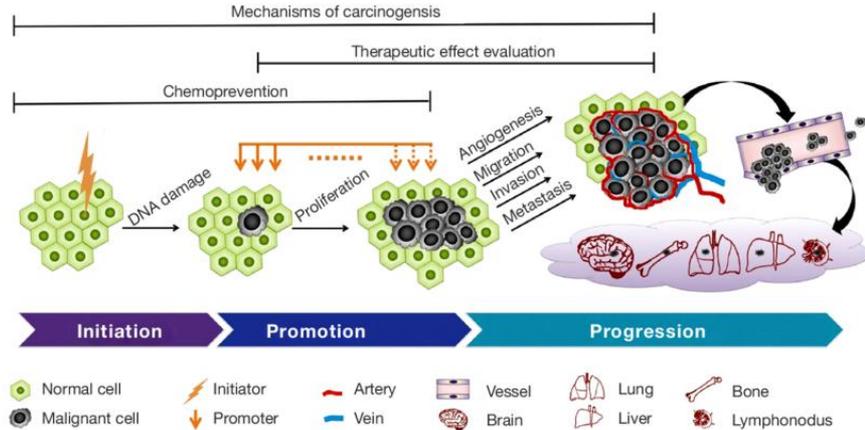
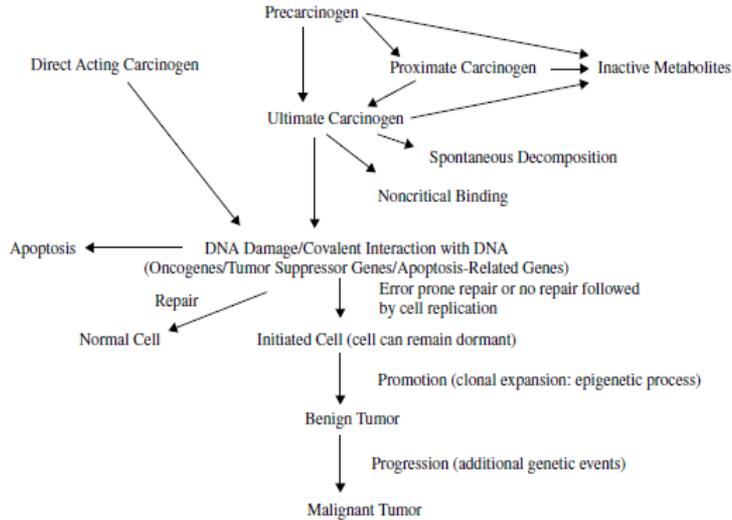


Phenobarbital

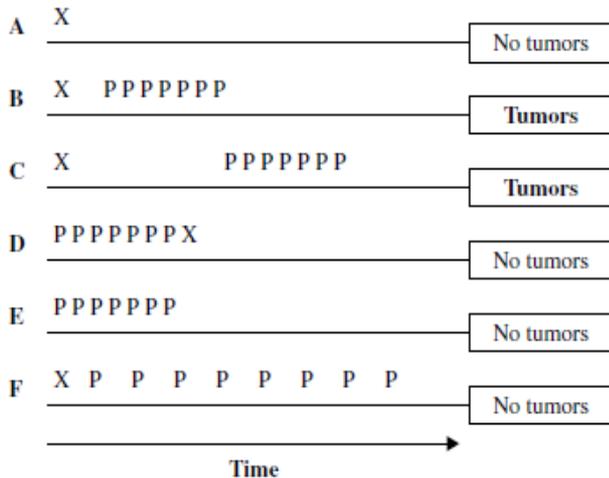
Obecné aspekty chemické karcinogenese

3 stádia:

- Iniciace
- Propagace
- Progrese



Iniciačně-propagační model



X – aplikace iniciátoru (PAH)
P – aplikace propagátoru (TPA – 12-O-tetradekanoylphorbol-13-acetát)

A. Použití samotného iniciátoru neprodukuje skoro žádné nádory

B. + C. Po aplikaci dávky iniciátoru, chronické vystavení propagátoru vede ke vzniku mnoha tumorů.

D. Obrácené pořadí propagátoru a iniciátoru nevede k tvorbě skoro žádných nádorů.

E. Samotný propagátor nepodporuje vznik nádorů.

F. Propagace je reversibilní, pokud dávky propagátoru jsou časově vzdáleny

Mnoho propagátorů je tkáňově specifických.
(TCDD, DDT, chlordan – propagace v játrech;
estrogeny – propagátory v prsní žláze; některé
žlučové kyseliny – propagace v tlustém střevě)

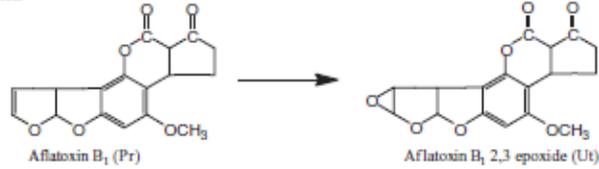
Metabolická aktivace

Procarcinogen

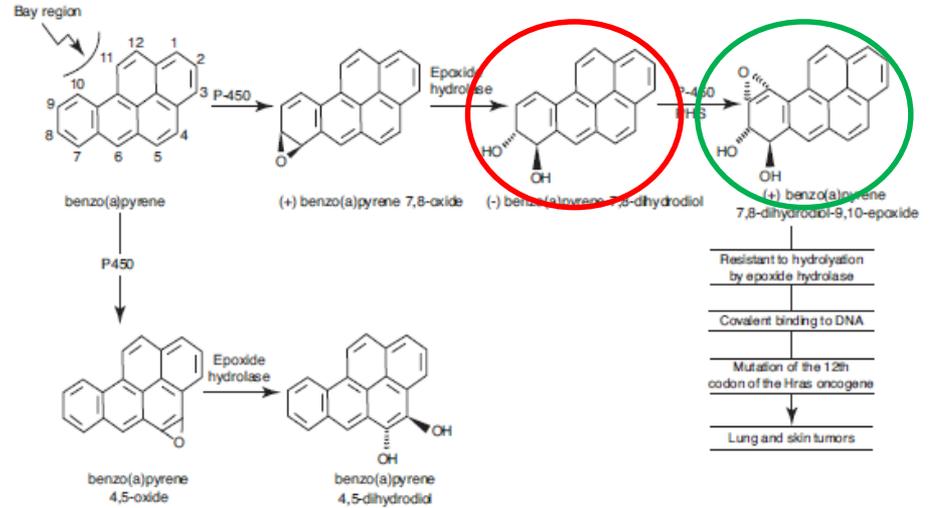
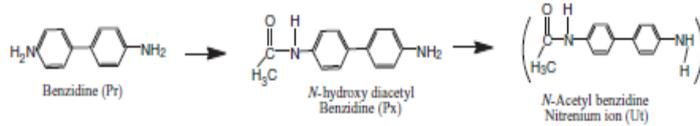
Proximate (Px) Carcinogen

Ultimate (Ut) Carcinogen

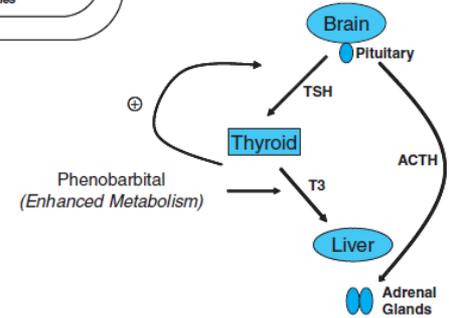
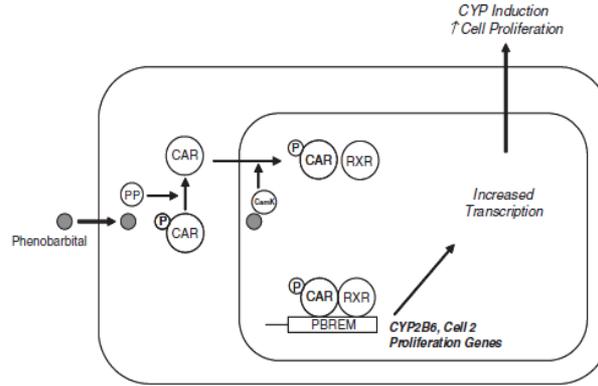
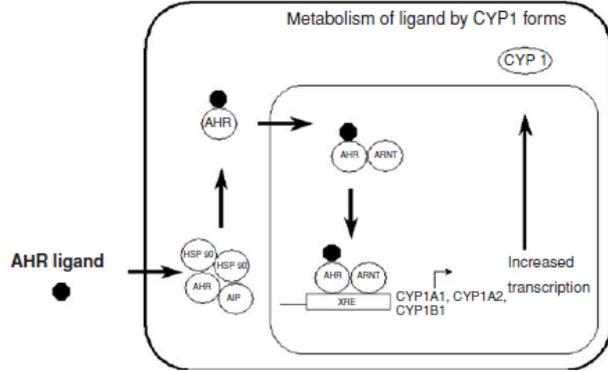
Direct epoxidation



N-Hydroxylation

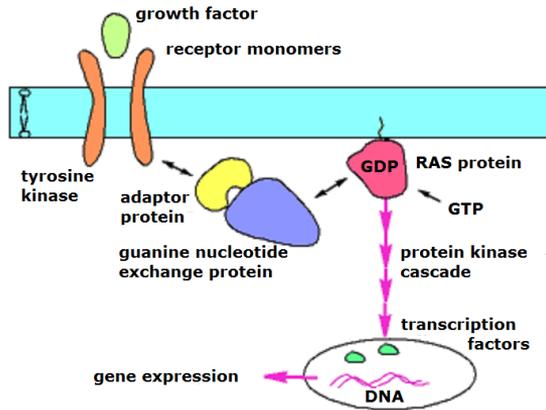


Metabolická aktivace II.



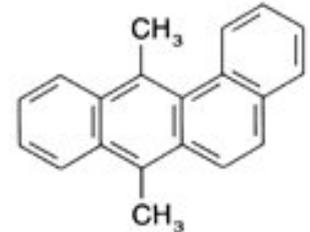
Onkogeny

Families	Genes
Growth factors	<i>sis, hst-1, int-2, wnt-1</i>
Growth factor receptor tyrosine kinases	<i>EGFR, fms, met/HGFR, ErbB2/new/HER2, trk/NGFR</i>
Nonreceptor tyrosine kinases	<i>abl, src, fgr, fes, yes, lck</i>
Guanine nucleotide binding proteins	<i>H-ras, K-ras, N-ras, TC21, GA12</i>
Serine/threonine kinases	<i>mos, raf, bcr, pim-1</i>
DNA-binding proteins	<i>myc, fos, myb, jun, E2F1, ets, rel</i>



Ras – membránově vázaný
přepínač – inaktivní s GDP
-aktivace vede k zvýšené
transkripci → proliferace
- aktivovaný detekován v množství
tumorů u testovaných zvířat

- kožní nádory myši vystavených
7,12-dimethyl **benz[a]anthracenu**
obsahují aktivovaný H-ras s
transversí A/T v 61 kodonu



Tumorsupresory - Negativní regulace buněčného růstu

p53 - mutován v cca 50% rakovin

- většinou (80%) missense mutace (změna kodonu pro AK)

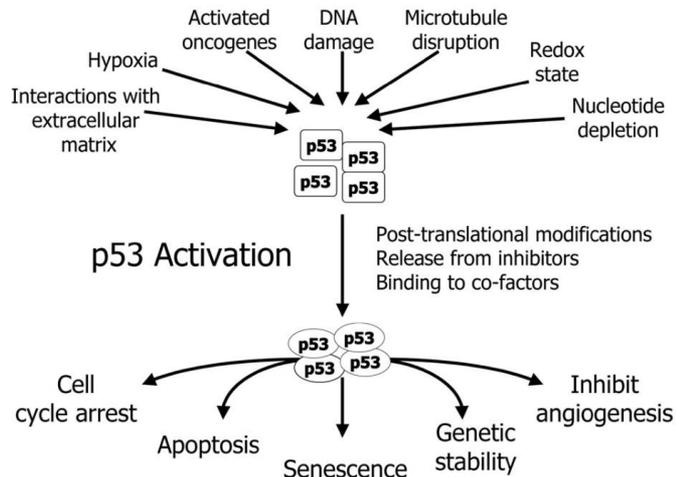
- transkripční faktor – regulace buněčného cyklu, apoptosa, oprava DNA

- může být inaktivován stovkou rozdílných mutací

- „mutační spektrum“ může pomoci identifikovat karcinogen → různé karcinogeny způsobují různé mutace

-v místech vývinu kožních nádorů – nalezené mutace jsou charakteristické pro tvorbu pyrimidinových dimerů po expozici UV

- tumory plic u kuřáků – podobné spektrum jako u buněk vystavených (+)-benzo[a]pyrenu-7,8-diol-9,10-epoxidu-2

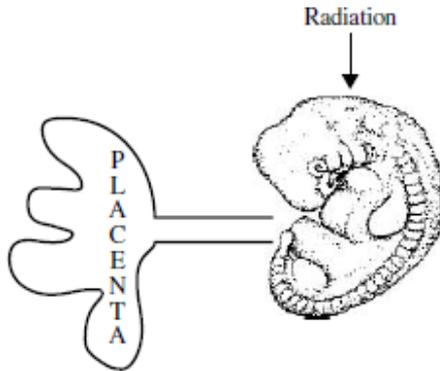


Teratogeneze

Teratologie – studium
původu abnormálního
vývoje / studium
vrozených defektů

Teratogen – xenobiotikum či
jiné faktory způsobující
malforace ve vyvíjejícím
zárodku

Alcohol ----->
Drugs ----->
Hormones ----->
Cigarettes ----->
German Measles ----->
Lead, Mercury ----->

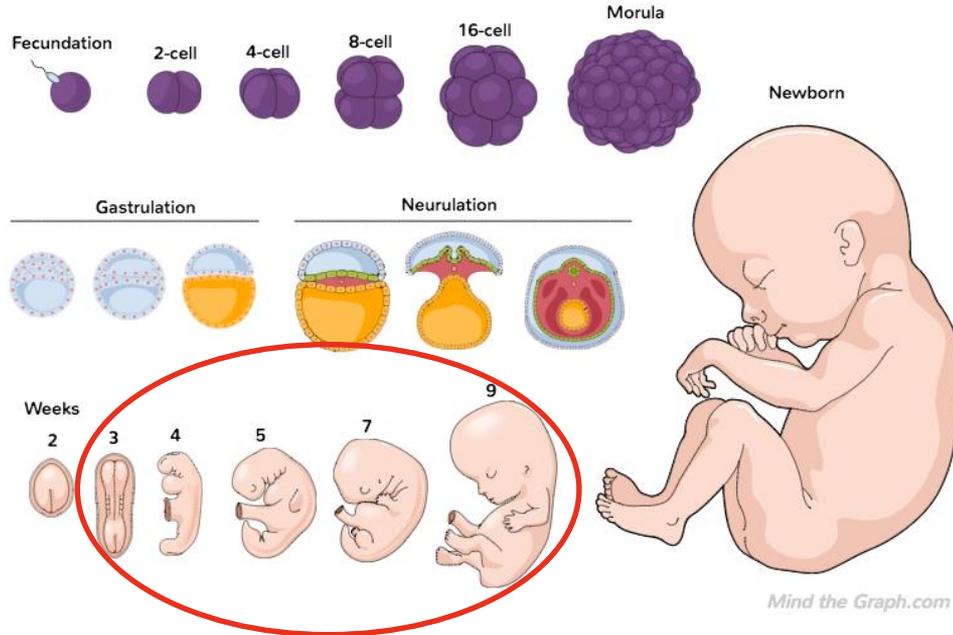


Principy teratologie

James G. Wilson (1959) – 6 principů teratologie
(spoluzakladatel The Teratology Society,
<http://www.teratology.org>)

1. **citlivost** k teratogenezi **závisí na interakci** genotypu embrya s nepříznivými vlivy prostředí
2. **výsledek** expozice **je závislý na vývojovém stádiu** zárodku
3. **teratogeny mají specifický mechanismus účinku**, skrz který se jejich účinek projevuje
4. podstata teratogenu určuje jeho přístup k vyvíjejícímu se plodu/tkáni
5. hlavní kategorie manifestace jsou – **smrt, malforace, opožděný růst, funkční deficity**
6. manifestace změněného vývoje se zvyšuje s rostoucí dávkou (tzn. od nulového efektu až po smrt)

Human embryo and fetal development



Kritické momenty vývoje

Embryogenese zahrnuje – buněčnou migraci,
proliferaci, diferenciaci, organogenesi

3 stádia vývoje :

Výstupy:

pre-implantační

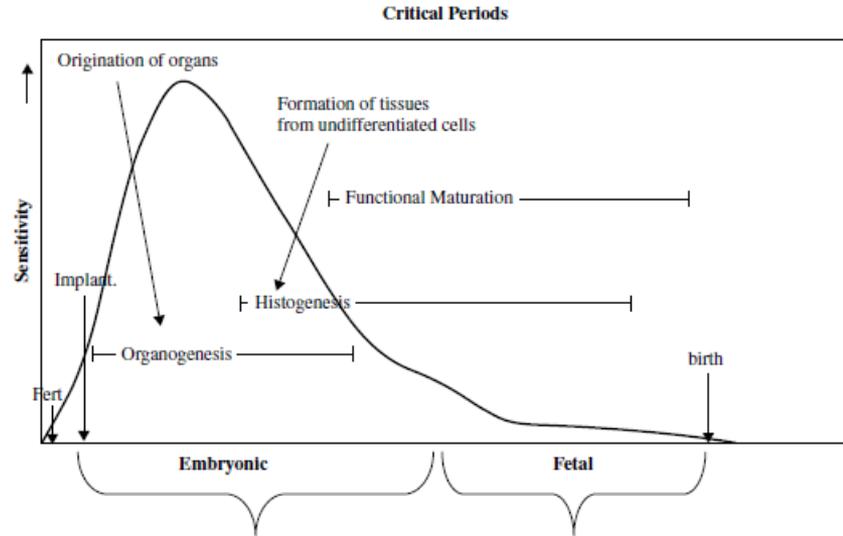
embryonální smrt

implantační až
organogenese

morfologické defekty

fetální až
neonatální stadium

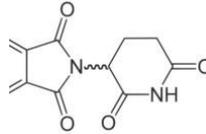
funkční poruchy, opožděný
růst, karcinogenese



Teratogeny

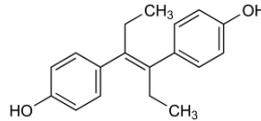
Thalidomid - hypnotikum, sedativum, Evropa 1957-61

- podáván na ranní nevolnost, nespavost, nauseu
- ženy pobírající mezi 35 až 50 dnem rodily potomky s širokým spektrem malforací (nepřítomnost končetin či kritické zkrácení končetin), malforace srdce, střev, dělohy
- stažen po výskytu cca 10 000 případů

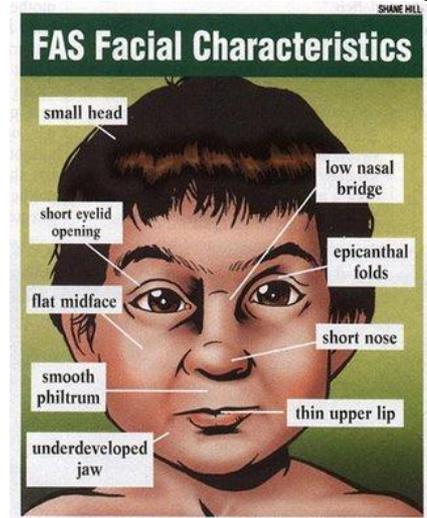
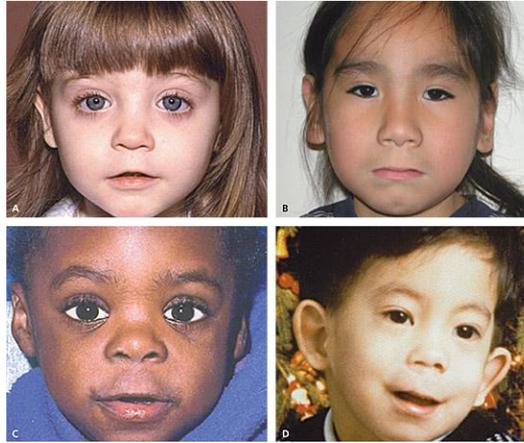


Diethylstilbestrol (DES) – syntetický estrogen k inhibici ovulace

- 1940-70 – k udržení těhotenství
- vystavené ženy – vaginální neoplasie, adenosa, cervikální eroze
- účinky nebyly na potomcích patrné až do puberty



Alkohol – „fetální alkoholový syndrom (FAS)“
= typ mentálních a fyzických defektů, které se vyvinou u některých jedinců po expozici alkoholu *in utero*
- nižší porodní váha, velikost těla, zhoršení nervových funkcí
- zpomalený vývoj



© Original Artist
Reproduction rights obtainable from
www.CartoonStock.com



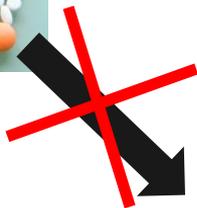
"NO, YOU MAY NOT CONNECT THE DOTS!"

Nechemické teratogeny – virus
zarděnek (rubella), stress

Testovací protokoly

- zavedeny po pohromě s thalidomidem - 1966 – FDA
- Guidelines for Reproduction Studies for Safety Evaluation of Drugs for Human Use
- **Multigenerační studie** – kontinuální expozice hlodavců (myši) – vystavení, spáření, produkce první generace (F1), následně pak F2 a F3 – měřené parametry zahrnují **plodnost, velikost vrhu, neonatální životnost** – zabere cca 2 roky
- **Jedno-generační studie** – krátkodobé s třemi segmenty
 - *Zhodnocení plodnosti* – samci hlodavců exponováni 70 dní, samice 14 dní (v průběhu páření, březosti, laktace), 50% samic zabito a vyšetřeny i s plody, 50% porodí a mláďata opět vyšetřena
 - *Odhad vývojové toxicity* – březí samice exponovány době od implantace až po organogenesi, den před narozením, utrácení a vyšetření plodu
 - *Postnatální zhodnocení* – březí samice exponovány od posledního trimestru po odstavení mláďate – zhodnocení je porodní proces, pozdní fetální vývoj, neonatální přežití

Slovo závěrem...



**Chraňte Ty na kterých Vám
záleží**



THANKS!



Do you have any questions?

youremail@freepik.com

+34 654 321 432

yourwebsite.com



CREDITS: This presentation template was created by [Slidesgo](#), and includes icons by [Flaticon](#), and infographics & images by [Freepik](#)

Please keep this slide for attribution