

Βιοχημική Τοξικολογία

Μέθοδοι πειραματικής μελέτης της καρκινογένεσης στα τροκτικά

Δημήτρης Κουρέτας

Καθηγητής

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών



In vitro τεστ για μεταλλαξιγένεση

Ames Test

- Μέθοδος για την παρατήρηση της μεταλλαξιγόνου-καρκινογόνου δράσης ενός ξενοβιοτικού. Χρησιμοποιούνται βακτηριακά στελέχη *Salmonella typhimurium*, τα οποία φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια του οπερονίου του αμινοξέος της ιστιδίνης και δεν μπορούν να αναπτυχθούν απουσία της ιστιδίνης.
- Όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει ιστιδίνη παρουσία ενός μεταλλαξιγόνου ξενοβιοτικού, το ξενοβιοτικό αυτό προκαλεί επαναμεταλλάξεις κάνοντας τα βακτήρια ικανά να συνθέτουν το αμινοξύ και να μπορούν να δημιουργήσουν αποικίες. Η αύξηση του αριθμού των αποικιών σε σχέση με αυτόν του αρνητικού μάρτυρα αντικατοπτρίζει την ικανότητα της ουσίας να είναι μεταλλαξιγόνος.

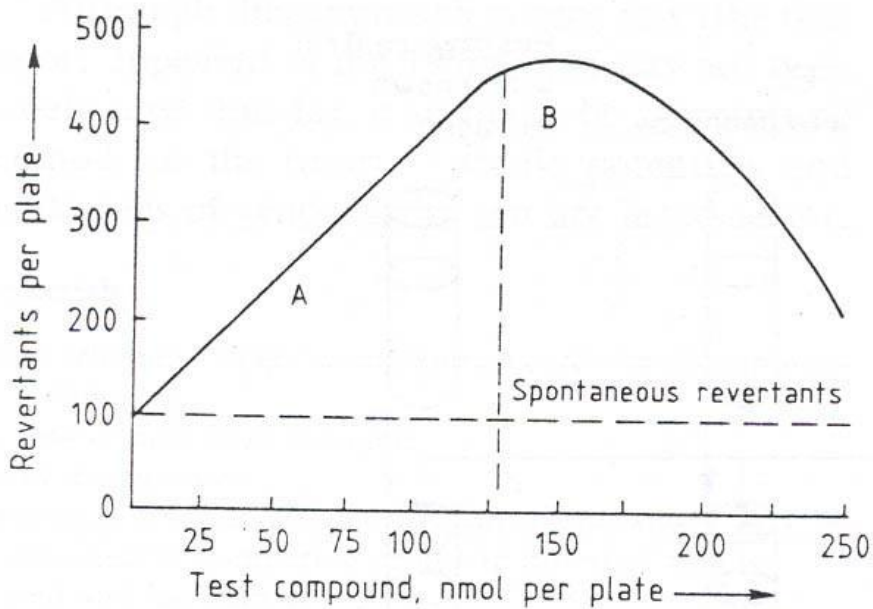
In vitro τεστ για μεταλλαξιγένεση

Ames Test

- Το Ames test μπορεί να προβλέψει τις καρκινογόνες ιδιότητες γενετοξικών αλλά όχι μη γενετοξικών ξενοβιοτικών.
- Η συγγένεια μεταξύ μεταλλαξιγένεσης και καρκινογένεσης έχει υπερεκτιμηθεί. Ξενοβιοτικά που εξετάστηκαν σε τρωκτικά για μακροχρόνια καρκινογένεση αποδείχτηκαν μεταλλαξιγόνα ενώ άλλα που έχουν εξεταστεί για καρκινογένεση αποδείχτηκε ότι δεν αντιδρούν άμεσα με το DNA και άρα δεν προκαλούν μεταλλάξεις. Τέτοια ξενοβιοτικά φαίνεται ότι δρουν με επιγενετικούς μηχανισμούς, μην προκαλώντας δηλαδή γενετικές αλλαγές.
- Το Ames test είναι σημαντικό στην ανίχνευση πιθανών καρκινογόνων ιδιοτήτων σε νέα φάρμακα.

In vitro τεστ για μεταλλαξιγένεση

Ames Test



Typical dose-response curve in the Ames

test

A) At nontoxic mutagen concentrations the number of revertants increases in a dose-dependent manner;
B) Higher, toxic concentrations inhibit growth, which is reflected in flattening of the curve followed by decreasing numbers of obtained revertants

Καμπύλη δόσης-απόκρισης στο
Ames test

In vitro τεστ για μεταλλαξιγένεση

Τεστ μεταλλαξιγένεσης στο *Escherichia coli*

- Το στέλεχος *E. Coli* WP2 trp E έχει μία μετάλλαξη σε ένα ζεύγος A-T του γονιδίου trp E, που κωδικοποιεί για τη συνθάση του ανθρανιλικού, ένα ένζυμο του βιοσυνθετικού μονοπατιού της τρυπτοφάνης. Τα τεστ μεταλλαξιγένεσης ανιχνεύουν αναστροφή στην ικανότητα σύνθεσης τρυπτοφάνης.

Τεστ μεταλλαξιγένεσης στις ζύμες

- Το πιο ευρέως διαδεδομένο είδος που χρησιμοποιείται είναι το *Saccharomyces cerevisiae*. Το τεστ ανιχνεύει την παραγωγή ισολευκίνης μέσω ξενοβιοτικών μεταλλαξιγόνων σε αναλογία με το Ames test.

Τεστ μεταλλαξιγένεσης σε ευκαρυωτικά κύτταρα

Τεστ μεταλλαξιγένεσης στη Drosophila melanogaster

- Η *Drosophila melanogaster* έχει μικρή διάρκεια γενιάς (10 μέρες) και παρόμοια κυτταρική και χρωμοσωμική δομή και λειτουργία με τα κύτταρα θηλαστικών.
- Το γένωμά της είναι πλήρως χαρακτηρισμένο και μπορεί να εμφανίσει πολλές από τις αντιδράσεις της φάσης I και II των θηλαστικών.
- Δύο είναι τα τεστ που έχουν αναπτυχθεί, το *Drosophila sex-linked recessive lethal test* και το *somatic mutation and recombination test (SMART)*.

Τεστ μεταλλαξιγένεσης σε ευκαρυωτικά κύτταρα

In vitro τεστ μεταλλαξιγένεσης σε κύτταρα θηλαστικών

- Τα κύτταρα εκτίθενται σε κάποιο μεταλλαξιγόνο ξενοβιοτικό, το οποίο είναι θανατηφόρο για κύτταρα που δεν έχουν μία συγκεκριμένη μετάλλαξη. Οι μεταλλάξεις ανιχνεύονται κυρίως στο X χρωμόσωμα καθώς είναι απλοειδές.
- Τα κύτταρα των θηλαστικών έχουν γονίδια που τους επιτρέπουν να πάρουν νουκλεοτίδια από το περιβάλλον τους. Αυτά τα γονίδια, παρόλο που δεν είναι απαραίτητα για την επιβίωση, εξοικονομούν ενέργεια για τα κύτταρα καθώς δε χρειάζεται να συνθέσουν τα συγκεκριμένα νουκλεοτίδια.
- Αν στο μέσο προστεθούν τοξικά νουκλεοτίδια, το μη μεταλλαγμένο κύτταρο θα τα πάρει και θα οδηγηθεί σε θάνατο. Αν η ικανότητα αυτή των κυττάρων πάψει να υφίσταται, τότε δε θα πάρουν τα τοξικά νουκλεοτίδια και θα επιβιώσουν σχηματίζοντας αποικίες, οι οποίες είναι παράμετρος γενοτοξικότητας.

Τεστ μεταλλαγμένης *in vivo* σε θηλαστικά

Mouse somatic spot test

- Ανιχνεύει την απενεργοποίηση γονιδίων σε ετερόζυγες περιοχές που ελέγχουν τη χρωστική των μαλλιών.

Mouse specific locus test

- Η γονιδιακή αυτή μερική ελέγχει το χρώμα του τριχώματος και το σχέδιο και μέγεθος του εξωτερικού αυτιού του μητρικού ζώου. Τα ζώα αναπαράγονται με ένα ομόζυγο άτομο στο υπολειπόμενο γονίδιο. Τα άτομα της F1 γενιάς είναι ετερόζυγα ενώ οι δικοί τους απόγονοι εκφράζουν τον υπολειπόμενο φαινότυπο.

Dominant lethal test

- Το τεστ εκτιμά το θάνατο εμβρύων, ο οποίος προέρχεται από γενετικές αλλαγές στα μητρικά κύτταρα.

Τεστ που δίνουν έμμεσες πληροφορίες για την καταστροφή του DNA

Unscheduled DNA synthesis (UDS) assays

- Στα κύτταρα των θηλαστικών έχουν βρεθεί δύο μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA.
 - Ο πρώτος σχετίζεται με την άμεση αντιστροφή της βλάβης, όπως το κόψιμο των διμερών πυριμιδίνης που προκύπτουν από την υπεριώδη ακτινοβολία.
 - Ο δεύτερος μηχανισμός αναγνωρίζει τις κατεστραμένες βάσεις, τις απομακρύνει αφού τις κόψει από την αλυσίδα, γεμίζει το κενό με τις σωστές βάσεις και ολοκληρώνει το σχηματισμό της νέας αλυσίδας.
- Η αρχή της μεθόδου συνίσταται στην ανίχνευση ενσωματωμένων ραδιενεργών βάσεων ή χημικών ανάλογων των νουκλεοτιδίων όπως η βρωμοδεοξουριδίνη στο DNA κατά την επιδιόρθωση του DNA όταν οι κατεστραμένες βάσεις έχουν απομακρυνθεί.

Τεστ που δίνουν έμμεσες πληροφορίες για την καταστροφή του DNA

Unscheduled DNA synthesis (UDS) assays

- Κατά την αντιγραφή του DNA ενσωματώνονται νουκλεοτίδια στο DNA τα οποία βρίσκονται σε αρκετά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτές που χρειάζεται. Για να γίνει εκλεκτική επιδιόρθωση του DNA με τα σημασμένα νουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται κυτταρικοί πληθυσμοί που δεν πολλαπλασιάζονται και καταστέλλεται η αντιγραφή του DNA με την καλλιέργεια των κυττάρων σε ειδικό μέσο.
- *In vitro* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ηπατοκύτταρα από επίμυες, τα οποία δε διαιρούνται κι έτσι δε χρειάζεται να αποφευχθεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός.
- *In vivo* η ενσωμάτωση των ραδιενεργών νουκλεοτιδίων μπορεί να μετρηθεί με αυτοραδιογραφία των κυττάρων. Σε περίπτωση συνδυασμού των δύο τεχνικών, στα πειραματόζωα σημαίνονται τα νουκλεοτίδια και ταυτόχρονα απομονώνονται κύτταρα από διάφορους ιστούς και γίνεται καλλιέργεια.

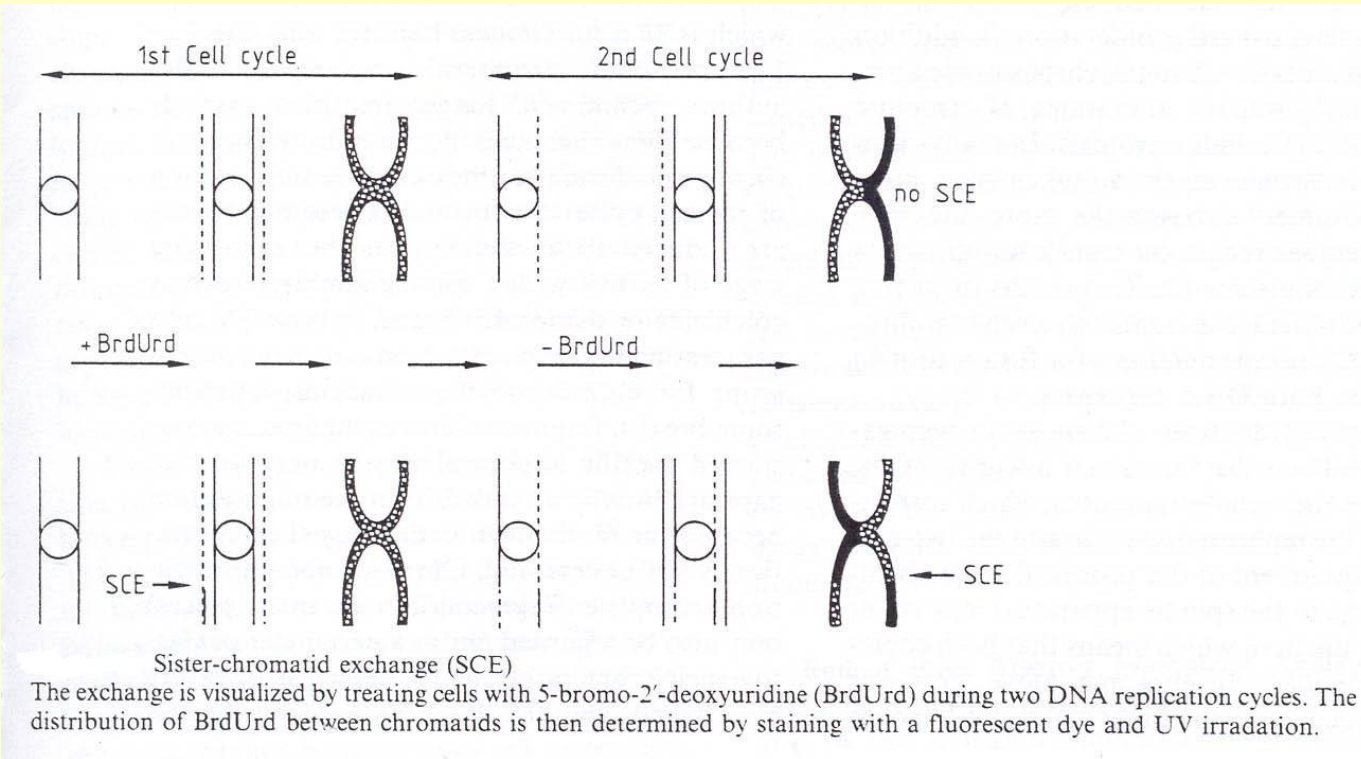
Τεστ που δίνουν έμμεσες πληροφορίες για την καταστροφή του DNA

Χρωματιδιακές ανταλλαγές (Sister chromatid exchange test)

- Οι ανταλλαγές μεταξύ των χρωματίδων γίνονται μεταξύ ομόλογων περιοχών. Μελετώνται με κυτταρικές σειρές *in vitro* (ινοβλάστες ή ανθρώπινα λεμφοκύτταρα).
- Τα κύτταρα εκτίθενται ταυτόχρονα σε 5-βρωμο-2-δεοξουριδίνη και στο προς μελέτη χημικό για χρονική περίοδο ίση με δύο κυτταρικούς κύκλους. Στις τελευταίες 1-2 h της επώασης προστίθεται ένας αναστολέας (κολχικίνη) για να σταματήσει τα κύτταρα στη φάση της μετάφασης.

Τεστ που δίνουν έμμεσες πληροφορίες για την καταστροφή του DNA

Χρωματιδιακές ανταλλαγές (Sister chromatid exchange test)



Για την ανίχνευση των ανταλλαγών, τα χρωμοσώματα βάφονται με τη χρωστική Giemsa και οι δύο χρωματίδες βάφονται διαφορετικά. Οι ανταλλαγές φαίνονται ως διαφορετικοί χρωματισμοί σε μία χρωματίδα.

Τεστ για χρωμοσωμικές ανωμαλίες

In vitro κυτταρογενετικά πρωτόκολα

- Σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα προστίθεται το προς μελέτη χημικό και οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες παρατηρούνται για έναν ή περισσότερους κυτταρικούς κύκλους.
- Συνήθως χρησιμοποιούνται κυτταρικές σειρές από κινέζικο χάμστερ και ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, τα οποία σε αντίθεση με τα κύτταρα του κινέζικου χάμστερ που πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα, ερεθίζονται με κάποιο μιτογόνο παράγοντα, πχ φυτοαιματογλουτινίνη, για να πολλαπλασιαστούν.
- Η χορήγηση του ξενοβιοτικού γίνεται 44 h μετά την προσθήκη φυτοαιματογλουτινίνης, όταν τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται. Τουλάχιστον τρεις δόσεις του ξενοβιοτικού πρέπει να χορηγηθούν.

Τεστ για χρωμοσωμικές ανωμαλίες

In vitro κυτταρογενετικά πρωτόκολα

- Μετά το τέλος της χορήγησης τα κύτταρα αφήνονται να συγκεντρωθούν στη μετάφαση και προστίθεται ένας αναστολέας, πχ κολχικίνη. Τουλάχιστον 200 κύτταρα μετρώνται κάτω από το μικροσκόπιο για χρωμοσωμικές ανωμαλίες.
- Χρωμοσωμικά σπασίματα και ανταλλαγές χαρακτηρίζονται ως δομικές ανωμαλίες ενώ τα κενά εξαιρούνται από τον υπολογισμό καθώς ο μηχανισμός σχηματισμού τους δεν είναι γνωστός.
- Ο θρυμματισμός των χρωμοσωμάτων θεωρείται δείκτης δριμείας κυτταροτοξικότητας και κυτταρικού θανάτου από το προς μελέτη ξενοβιοτικό.

Τεστ για χρωμοσωμικές ανωμαλίες

In vivo κυτταρογενετικά πρωτόκολλα

Rodent micronucleus test

- Τα ποντίκια εκτίθενται σε κάποιο ξενοβιοτικό και παρατηρούνται χρωμοσωμικές ανωμαλίες στους ερυθροβλάστες στη σπονδυλική στήλη.
- Σχηματίζονται μικροπυρήνες (micronuclei) στα χρωμοσώματα, ένδειξη της τοξικής δράσης του ξενοβιοτικού.
- Αν το ξενοβιοτικό χορηγηθεί στη μεγαλύτερη δόση και δεν παρατηρηθεί επαγωγή του σχηματισμού των μικροπυρήνων, τότε θεωρείται ότι δεν έχει τοξική δράση.

Rodent bone marrow metaphase analysis

- Η ανάλυση της μετάφασης γίνεται σε επίμυες στις 6, 12 και 48 h μετά τη χορήγηση μίας απλής δόσης ή εναλλακτικά στις 6 και 24 h μετά από τη χορήγηση πολλαπλών δόσεων ενώ στα κύτταρα προστίθεται κολχικίνη.

Τεστ για χρωσωμικές ανωμαλίες

Πρόκληση όγκων στο ήπαρ τρωκτικών

- Ο σχηματισμός αποικιών των κυττάρων που έχουν υποστεί κάποια βιοχημική αλλαγή προηγείται του σχηματισμού όγκου. Αυτές οι αποικίες έχουν αλλαγμένες συγκεντρώσεις των ενζύμων γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση, φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης και s-τρανσφεράση της γλουταθειόνης. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα του ηπατικού παρεγχύματος δεν αποθηκεύουν σίδηρο. Τα κύτταρα υφίστανται έκθεση στο ξενοβιοτικό για 12 βδομάδες και τις τελευταίες 2 χορηγείται και σίδηρος.

Πρόκληση όγκων στον πνεύμονα ποντικού

- Ορισμένες ράτσες ποντικών (πχ A/Heston) είναι πολύ ευαίσθητες στην εμφάνιση όγκων στον πνεύμονα λόγω της ευαισθησίας τους απέναντι σε ξενοβιοτικά όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, οι υδραζίνες, οι νιτροζαμίνες κ.ά. Η ευαισθησία του τεστ είναι μεγαλύτερη. Μετά τις 35 βδομάδες η ευαισθησία του τεστ μειώνεται σημαντικά καθώς παρατηρούνται όγκοι και στα ζώα control.

Τεστ για χρωμοσωμικές ανωμαλίες

Πρόκληση όγκων στο δέρμα ποντικού

- Η καρκινική δράση ορισμένων χημικών και μιγμάτων μπορεί να μελετηθεί μετά τη χορήγησή τους στο δέρμα ευαίσθητων ποντικών συγκεκριμένης ράτσας (πχ sencar mouse).
- Παράγωγα του πετρελαίου, καπνός και πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες δίνουν θετικά αποτελέσματα σε αυτό το πρωτόκολλο. Άλλα καρκινογόνα όπως οι ακρυλαμίνες δε δίνουν αποτελέσματα.
- Το δέρμα του συγκεκριμένου ποντικού έχει ένζυμα του κυτοχρώματος P450 που ενεργοποιούν ξενοβιοτικά όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και γι' αυτό υπάρχουν αυτές οι διαφορές στα αποτελέσματα που δίνει το τεστ.

Εκτίμηση της καταστροφής του DNA

Τεχνική αλκαλικής διήθησης του DNA

- Βασίζεται στην παρατήρηση ότι ο ρυθμός με τον οποίο οι μονόκλωνες αλυσίδες του DNA περνούν μέσα από μία μεμβράνη υπό συνθήκες αλκαλικής μετουσίωσης εξαρτάται από το μήκος των αλυσίδων.
- Τα κύτταρα μετά από επεξεργασία με κάποιο ξενοβιοτικό τοποθετούνται σε ένα φίλτρο μεμβράνης και λύνονται με απορρυπαντικό. Το διάλυμα λύσης κυλάει διαμέσου του φίλτρου, απομακρύνονται πρωτεΐνες και RNA ενώ το DNA κατακρατείται στο φίλτρο.
- Ένας διαλύτης με $\text{pH} > 12$ περνάει αργά από το φίλτρο και διασπά τους υδρογονικούς δεσμούς. Μετά την παραγωγή μονόκλωνων αλυσίδων του DNA αυξάνεται ο ρυθμός του DNA που διαπερνάει το φίλτρο. Το ποσό του κατεστραμένου, μονόκλωνου DNA που διαπέρασε το φίλτρο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί χρησιμοποιώντας ραδιοσημασμένους κυτταρικούς πληθυσμούς ή με φθορισμό.

Ερμηνεία αποτελεσμάτων από τεστ μικρής διάρκειας

- Θετικά αποτελέσματα σε ένα *in vitro* τεστ μεταλλαξιγένεσης (Ames test) και σε ένα *in vivo* (the rodent bone marrow micronucleus test) δείχνουν ισχυρή καρκινική δράση.
- Ένα ξενοβιοτικό είναι ύποπτο για την πρόκληση καρκινογένεσης αν τα αποτελέσματα γενετοξικότητας σε περισσότερα από ένα *in vitro* ή *in vivo* τεστ είναι θετικά.
- Παρά το γεγονός ότι θετικά αποτελέσματα σε αυτά τα τεστ αποτελούν απόδειξη της καρκινικής δράσης ενός ξενοβιοτικού, τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποτελούν εγγύηση για τη μη καρκινική δράση του.

Εκτίμηση της νευροτοξικότητας

Καταληψία (catalepsy)

- Μπορεί να μετρηθεί τοποθετώντας τον επίμυ σε 4 φελούς (35mm ύψος, 40mm διάμετρο, 100mm απόσταση μεταξύ του μπροστά και του μίσω ποδιού και 60mm απόσταση μεταξύ του δεξιού και του αριστερού ποδιού). Η διάρκεια της ακινησίας σε αυτή τη θέση μετριέται για πάνω από 60sec.

Rotarod performance (Rotating Rod test).

- Απαιτεί προπόνηση του ζώου για να γίνει. Το ζώο περπατάει σε μία περιστρεφόμενη ράβδο (7cm διάμετρο και ρυθμός περιστροφής 5-12rpm). Κατά τη διάρκεια της προπόνησης κάτω από τη συσκευή υπάρχουν δοχεία με νερό για να αποτραπεί το ζώο από το να πηδήξει. Ο χρόνος που μένει το ζώο στη ράβδο μετριέται για 2-3min.

Hindlimb Foot Splay.

- Τα μπροστινά πόδια βάζονται και τα ζώα πετιούνται από μία θέση 30cm πάνω από ένα τραπέζι σε ένα χαρτί. Η απόσταση μεταξύ του κέντρου των δύο σημαδιών μελανιού από τα δύο πόδια του ζώου μετριέται.

Αξιολόγηση των τοξικών επιδράσεων

- Η εκτίμηση του ρίσκου για την υγεία του ανθρώπου έγκειται στο αν ένα ξενοβιοτικό μπορεί να προκαλέσει δυσμενείς συνέπειες, σε ποιο επίπεδο, σε ποια συχνότητα χορήγησης και ποια είναι η πιθανότητα εμφάνισης αυτών των επιδράσεων.

Οι όροι hazard και risk.

- Ο όρος hazard ορίζει την εγγενή τοξικότητα ενός ξενοβιοτικού.
- Ο όρος risk ορίζει την υπολογιζόμενη ή μετρούμενη πιθανότητα βλάβης ή θανάτου λόγω της έκθεσης σε κάποιο συγκεκριμένο ξενοβιοτικό. Μπορεί να περιγραφεί τόσο με ημιποσοτικούς όρους π.χ. υψηλό, χαμηλό ή ποσοτικά π.χ. ένας άνθρωπος εμφάνισε δυσμενείς επιδράσεις ανάμεσα σε 10000 που τους χορηγήθηκε κάποιο ξενοβιοτικό.

Επίσης, μπορεί να εκφραστεί σε απόλυτους όρους π.χ. η πιθανότητα εμφάνισης δυσμενών επιδράσεων λόγω της έκθεσης σε κάποιο συγκεκριμένο ξενοβιοτικό ή σε συγκριτικούς π.χ. η πιθανότητα εμφάνισης δυσμενών συνεπειών ανάμεσα σε έναν πληθυσμό που εκτέθηκε σε ένα ξενοβιοτικό και σε έναν άλλο που δεν εκτέθηκε.

Αποδεκτοί κίνδυνοι

Μηδενικό ρίσκο

- Για να επιτευχθεί μηδενικό ρίσκο, η έκθεση σε ένα ξενοβιοτικό πρέπει να περιοριστεί κάτω από ένα κατώφλι, όπου δεν προκαλείται τοξικότητα. Όταν ένα τέτοιο κατώφλι δεν μπορεί να επιτευχθεί τότε πρέπει να υποτεθεί ότι ένα πεπερασμένο ρίσκο συμβαίνει σε κάθε έκθεση σε ένα ξενοβιοτικό.

Αποδεκτό ρίσκο

- Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες τα χημικά της διατροφής και τα χημικά που εισπνέονται από τον καπνό του τσιγάρου είναι εκείνα που κατά κύριο λόγο αποτελούν τις αιτίες εμφάνισης καρκίνου στον άνθρωπο. Έτσι, αναπτύχθηκε η έννοια του αποδεκτού ρίσκου, η οποία αναφέρει ότι δεν είναι δυνατό να εκμηδενιστούν οι κίνδυνοι για την υγεία που προκαλούνται από την έκθεση σε χημικά, λόγω του σύγχρονου τρόπου ζωής.

Αναγνώριση του κινδύνου

- Εκτιμώνται οι αρνητικές επιδράσεις ενός ξενοβιοτικού. Ο υπολογισμός της οξείας και της χρόνιας τοξικότητας γίνεται με τη χρησιμοποίηση ζώων ως πειραματόζωα.
- Η χρήση των ζώων για πειράματα, ώστε τα συμπεράσματα να βρουν εφαρμογή στον άνθρωπο ακολουθείται από ορισμένες παραδοχές.
 - i) Τα ξενοβιοτικά που έχουν αρνητικές επιδράσεις στον άνθρωπο θα δείξουν κάποιο βαθμό τοξικότητας σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς όταν η δόση είναι υψηλή.
 - ii) Αν σε έναν επαρκή αριθμό ειδών ζώων χορηγηθεί ένα ξενοβιοτικό, τουλάχιστον ένα θα πρέπει να δείξει ένα παρόμοιο τρόπο μεταβολισμού και τοξικοκινητικής με τον άνθρωπο.
 - iii) Αν σε έναν επαρκή αριθμό ειδών ζώων χορηγηθεί ένα ξενοβιοτικό, τουλάχιστον ένα θα πρέπει να δείξει παρόμοιες τοξικές αποκρίσεις και κλινικά συμπτώματα με τον άνθρωπο.

Σχέση δομής-δραστικότητας ενός ξενοβιοτικού

Ποιοτική προσέγγιση

- Σύγκριση της δομής του ξενοβιοτικού με τη δομή άλλων χημικών που είναι γνωστό ότι προκαλούν τοξικές επιδράσεις.

Ποσοτική προσέγγιση

- Βασίζεται στην ανάλυση με ηλεκτρονικό υπολογιστή βάσεων δεδομένων πάνω σε τοξικές επιδράσεις ξενοβιοτικών.

Κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες

- Δίνουν αξιόπιστα στοιχεία για τις τοξικές επιδράσεις ενός ξενοβιοτικού στον άνθρωπο. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμοί κατά την εφαρμογή τους καθώς η ευαισθησία τους είναι περιορισμένη.
- Αν το τοξικό αποτέλεσμα κάποιου ξενοβιοτικού είναι ασυνήθιστο μπορεί να μην παρατηρηθεί ενώ κατά την εκτίμηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου μπορεί το αποτέλεσμα να οφείλεται σε χρόνια έκθεση σε κάποιο ξενοβιοτικό και η οποία δεν μπορεί να εκτιμηθεί με αυτό τον τρόπο.
- Άλλες μεταβλητές όπως το κάπνισμα και η ταυτόχρονη έκθεση σε άλλα ξενοβιοτικά υπεισέρχονται και τα αποτελέσματα δεν είναι ασφαλή. Έτσι, οι επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναγνωρίσει μόνο περιορισμένο αριθμό ξενοβιοτικών ως καρκινογόνα.

Προσδιορισμός της έκθεσης σε ένα ξενοβιοτικό

- Οι διαστάσεις της έκθεσης περιλαμβάνουν την ένταση, τη συχνότητα, την οδό, τη διάρκεια, το μέγεθος και τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού. Σε πολλές περιπτώσεις η διάρκεια και το επίπεδο της έκθεσης, ειδικά μετά από χρόνια έκθεση, μπορούν να εκτιμηθούν μόνο από τα επίπεδα του ξενοβιοτικού στο περιβάλλον και γι αυτό οι εκτιμήσεις μπορεί να μην είναι ακριβείς.
- Συγκεκριμένες διαδικασίες για την ανίχνευση της έκθεσης σε ένα ξενοβιοτικό χρησιμοποιούνται και περιλαμβάνουν:
 - i) απευθείας μέτρηση του ξενοβιοτικού στο περιβάλλον, δηλαδή στο νερό, τον αέρα και το έδαφος
 - ii) μέτρηση του ξενοβιοτικού, των μεταβολιτών του και των προϊόντων της αλληλεπίδρασης αυτών με μακρομόρια σε σωματικά υγρά και ιστούς (biomonitoring)

Αιτίες πρόκλησης καρκινογένεσης στον άνθρωπο

35% Food constituents, diet

30% Tobacco smoke

7% Reproduction, sexual habits

4% Occupation

3% Alcohol

2% Air and water contaminants

1.5% Sunlight (UV)

1.5% Pharmaceuticals, irradiation for medical purposes

1.5% Irradiation from natural sources

<1% Food additives, household chemicals

Contribution of chemical exposure and life-style factors to the incidence of avoidable cancer in human

Η διατροφή και το κάπνισμα αποτελούν τις βασικές αιτίες πρόκλησης καρκίνου στον άνθρωπο.

Προσδιορισμός της έκθεσης σε ένα ξενοβιοτικό

- Τα βιολογικά τελικά σημεία στον προσδιορισμό της έκθεσης μπορεί να είναι:
 - i) υπολογισμός βιοχημικών δεικτών για συγκεκριμένα τοξικά αποτελέσματα, όπως είναι η αναστολή της δράσης ενζύμων πχ χολινεστεράση σε άτομα που εκτίθενται σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα.
 - ii) παρατήρηση παθολογικών στοιχείων της έκθεσης όπως κυτταρογενετικών αλλαγών στα λεμφοκύτταρα από εργάτες που εκτίθενται σε χημικά που καταστρέφουν τα χρωμοσώματα.

Σχέσεις δόσης-απόκρισης

- Με αυτό τον τρόπο ποσοτικοποιείται η σχέση μεταξύ της χορηγούμενης δόσης και της βιολογικής απόκρισης και μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε μεμονωμένα άτομα όσο και ολόκληρους πληθυσμούς
- Η εκτίμηση της δόσης-απόκρισης περιλαμβάνει την ένταση και τη διάρκεια της έκθεσης καθώς και παράγοντες που μεταβάλλουν τα τοξικά αποτελέσματα όπως είναι το φύλο, η ηλικία, η κατάσταση της υγείας και η οδός της χορήγησης.
- Γίνεται αναγωγή στον άνθρωπο των στοιχείων που αποκτώνται από τα ζώα.

The safety factor

- Ο safety factor ή όπως καμιά φορά αναφέρεται, ο uncertainty factor, έχει εισαχθεί για να λαμβάνονται υπόψη οι διαφορές στην απόκριση τοξικών επιδράσεων ενός συγκεκριμένου ξενοβιοτικού τόσο ανάμεσα στα είδη όσο και ανάμεσα στα άτομα.
- Ο κύριος σκοπός ύπαρξης του safety factor είναι η προστασία της ανθρώπινης υγείας μέσω καθιέρωσης ασφαλών επιπέδων έκθεσης. Αυτό δε σημαίνει ότι η έκθεση πάνω από αυτά τα επίπεδα θα προκαλέσει τοξικά αποτελέσματα. Παρά ορισμένους περιορισμούς, ο safety factor έχει χρησιμοποιηθεί διεθνώς.

Μαθηματικά μοντέλα εκτίμησης του κινδύνου στον άνθρωπο

- Τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι τα ακόλουθα:
 - i) το γραμμικό μοντέλο
 - ii) στατιστικά ή μοντέλα κατανομής όπως log-probit, Mantel-Bryan, Weibull
 - iii) μηχανιστικά μοντέλα όπως one hit (linear), multihit, multistage (Armitage-Doll), linearized multistage, Moolgavkar
 - iv) άλλα όπως statisticopharmacokinetic, time-to-tumor

Μαθηματικά μοντέλα εκτίμησης του κινδύνου στον άνθρωπο

Γραμμικό μοντέλο

- Βασίζεται στην υπόθεση ότι η πρόκληση όγκων από ένα χορηγούμενο ξενοβιοτικό επιτείνει μία διαδικασία που ήδη συμβαίνει.

Μοντέλα κατανομής

- Βασίζονται στις μαθηματικές λειτουργίες ορισμένων χαρακτηριστικών του προς μελέτη πληθυσμού, π.χ. κάθε μέλος του πληθυσμού έχει ένα συγκεκριμένο κατώφλι δόσης κάτω από το οποίο δε θα ανταποκριθεί στην έκθεση στο ξενοβιοτικό.

Statisticopharmacokinetic

- Υπολογίζει το επίπεδο των ενεργών μεταβολιτών του ξενοβιοτικού που παράγονται και αλληλεπιδρούν με σημαντικά μακρομόρια.

Μαθηματικά μοντέλα εκτίμησης του κινδύνου στον άνθρωπο

Μηχανιστικά μοντέλα

- Κάθε μοντέλο υποθέτει ότι ένας όγκος προέρχεται από ένα και μόνο κύτταρο.
- One hit: ένας όγκος μπορεί να προκληθεί από την έκθεση του DNA σε ένα μόνο μόριο του καρκινογόνου.
- Multihit: περισσότερες από μία εκθέσεις του οργανισμού στο καρκινογόνο απαιτούνται για την πρόκληση καρκινογένεσης.
- Multistage (Armitage-Doll): η καρκινογένεση είναι μία διαδικασία που συμβαίνει σε πολλά στάδια και το κάθε στάδιο προστίθεται στα προηγούμενα.
- Moolgavkar-Venson-Knudson: επιχειρεί μία πιο συνολική εκτίμηση της διαδικασίας της καρκινογένεσης και μπορεί να δώσει μία πιο ακριβή εκτίμηση του ανθρώπινου κινδύνου μειώνοντας κάποιες από τις αβεβαιότητες μεταξύ των ειδών. Βασίζεται σε ένα μοντέλο αύξησης δύο σταδίων, τη γέννηση και το θάνατο των κυττάρων καθώς και τον πολλαπλασιασμό τους στον αριθμό που είναι απαραίτητος για το σχηματισμό κακοήθειας. Επίσης υποθέτει ότι απαιτούνται δύο συγκεκριμένες, μη αναστρέψιμες μεταλλάξεις για το σχηματισμό κακοήθους όγκου.

Εκτίμηση του κινδύνου

Προσεγγίσεις μεταξύ των ειδών

- Η διάρκεια ζωής ενός τρωκτικού είναι περίπου 2 χρόνια ενώ του ανθρώπου περίπου 70 χρόνια. Ο καρκίνος εμφανίζεται στα τρωκτικά σε μία χρονική κλίμακα ανάλογη με το χρόνο ζωής τους και ακολουθείται η υπόθεση ότι αυτό θα συμβεί σε όλα τα ξενοβιοτικά που θα μελετηθούν. Η υπόθεση ότι ο άνθρωπος θα ανταποκριθεί με παρόμοιο τρόπο συνήθως είναι ανακριβής.

Προσεγγίσεις από την υψηλή στη χαμηλή δόση

- Η χρησιμοποίηση υψηλών δόσεων σε πειραματικά πρωτόκολα σε ζώα και η προσέγγιση από την υψηλή στη χαμηλή δόση σχετικά με τον άνθρωπο είναι επιβεβλημένη.

Εκτίμηση του κινδύνου

Πρωτόκολα με υψηλές δόσεις

- Πλεονεκτήματα:
 - i) άμεση αναγνώριση ξеноβιοτικών με καρκινογόνο δράση
 - ii) λήψη πληροφοριών για παρόμοια δράση άλλων ξеноβιοτικών
 - iii) λήψη πληροφοριών για την καρκινογόνο δράση ξеноβιοτικών που χορηγούνται μόνα τους
 - iv) λήψη πληροφοριών για την απουσία καρκινογόνου δράσης ορισμένων ξеноβιοτικών.

- Μειονεκτήματα:
 - i) δεν είναι δυνατή ή λήψη αποτελεσμάτων για δόσεις χαμηλότερες από εκείνη που χορηγείται
 - ii) δε λαμβάνονται πληροφορίες για το μηχανισμό της καρκινογένεσης ενός ξеноβιοτικού
 - iii) δε λαμβάνονται πληροφορίες για τις επιδράσεις του προς μελέτη ξеноβιοτικού όταν χορηγείται παράλληλα με άλλα χημικά.

Εκτίμηση του κινδύνου

- Η έκθεση του ανθρώπου σε καρκινογόνα ξеноβιοτικά συμβαίνει σε δόσεις αρκετών τάξεων μεγέθους χαμηλότερες σε σχέση με εκείνες που χρησιμοποιούνται πειραματικά. Για τον προσδιορισμό του πραγματικού σχήματος της καμπύλης δόσης-απόκρισης σε χαμηλές δόσεις έγινε μία μελέτη χρησιμοποιώντας το καρκινογόνο 2-acetylaminofluorene, το οποίο χορηγήθηκε στην τροφή ποντικών.

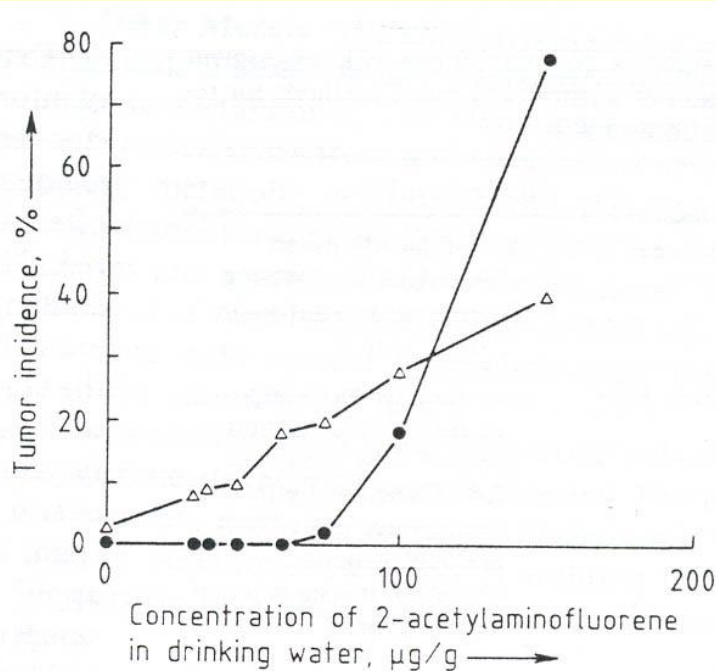


Figure 5.3. Dose-response data for the induction of liver (Δ) and urinary bladder (●) tumors induced by 2-acetylaminofluorene in mice after 24-month administration in diet

Νεοπλάσματα της ουροδόχου κύστης και του ήπατος βρέθηκε ότι σχετίζονται με τη χορήγηση του συγκεκριμένου ξеноβιοτικού.

Η μηδενική παρουσία όγκων στην ουροδόχο κύστη σε χαμηλές συγκεντρώσεις του ξеноβιοτικού δείχνει ότι υπάρχει ένα κατώφλι ενώ για το ήπαρ τα δεδομένα είναι σχεδόν γραμμικά σε όλες τις συγκεντρώσεις και δεν έχουν κατώφλι.

Εκτίμηση του κινδύνου

Δοσιμετρία

- Για την αναγωγή της δόσης των ζώων σε δόσεις σε ανθρώπους θα πρέπει:
 - i) να εκφραστεί η δόση ως προς το βάρος του οργανισμού (mg/kg ή mmol/kg)
 - ii) να εκφραστεί η δόση σα συγκέντρωση στην τροφή ή το νερό (συνήθως σε μέρη στο εκατομμύριο π.χ. μg/g ή μL/L)
 - iii) να εκφραστεί η δόση σα συγκέντρωση στον εισπνεόμενο αέρα (συνήθως σε μέρη στο εκατομμύριο π.χ. μL/L)
 - iv) να γίνει διόρθωση της δόσης ως προς την επιφάνεια του οργανισμού.

Μίγματα

- Τα πρωτόκολα για τη μελέτη της καρκινογένεσης στα πειραματόζωα συνήθως γίνονται με ένα μόνο χημικό υψηλής καθαρότητας ενώ οι άνθρωποι εκτίθενται σε μίγματα ξενοβιοτικών.
- Η απόκριση των ζώων και του ανθρώπου θα εξαρτηθεί από το αν οι δράσεις των διαφορετικών ξενοβιοτικών αλληλεπιδρούν και από το αν οι επιδράσεις των χημικών είναι παρόμοιες ή όχι.

Εκτίμηση του κινδύνου

Ενδογενείς παράγοντες του πειράματος

- Ανάμεσα σε αυτούς βρίσκονται η ποιότητα του πειράματος, οι περιβαλλοντικές συνθήκες της εγκατάστασης που φιλοξενεί τα ζώα, η εκτίμηση της χορήγησης, η καθαρότητα του ξενοβιοτικού κ.ά.

Συντηρητισμός στην εκτίμηση του αποτελέσματος

- Για την παροχή μεγαλύτερης προστασίας είναι προτιμότερη μία πιο συντηρητική προσέγγιση των πειραματικών δεδομένων. Αυτή η προσέγγιση υποθέτει ότι ένα μόνο μόριο ενός καρκινογόνου μπορεί να αλληλεπιδράσει με το DNA και να προκαλέσει καρκίνο.

Εκτίμηση του κινδύνου

Τοξικότητα και αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός

- Οι υψηλές δόσεις ξενοβιοτικών που χρησιμοποιούνται στα πειράματα μελέτης της καρκινογένεσης στα τρωκτικά μπορεί να έχουν και επιδράσεις όπως η αύξηση στο ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η κυτταρική διαίρεση μπορεί να είναι μεταλλαξιγόνος.
- Αν το ίδιο ξενοβιοτικό χορηγηθεί σε μικρότερες δόσεις ο σχηματισμός όγκων είναι πιθανό να είναι μικρότερης κλίμακας σε σχέση με αυτόν που θα μπορούσε να προβλέψει ένα γραμμικό μοντέλο ή θα μπορούσε να είναι μηδαμινός. Η κυτταρική διαίρεση έχει θεωρηθεί ως βασικός συντελεστής στην πρόκληση καρκινογένεσης σε χημικά όπως η φαινοβαρβιτάλη, το 1,4-διχλωροβενζένιο και το d-λιμονένιο.

Επιλογή μαθηματικού μοντέλου

- Ανάλογα με το αν χορηγούνται μεγάλες ή μικρές δόσεις πρέπει να επιλεγεί το σωστό μαθηματικό μοντέλο εκτίμησης του κινδύνου.