



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

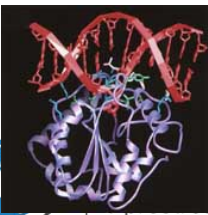
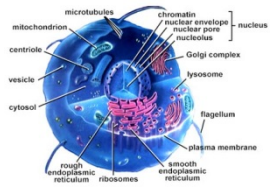
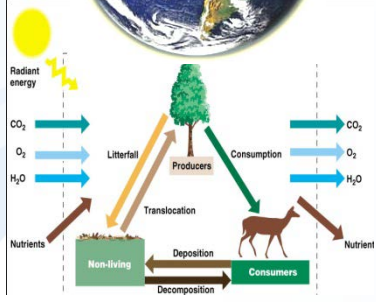
Moderní přístupy studia biochemických a buněčných mechanismů toxicity v ekotoxikologických biotestech

Klára Hilscherová

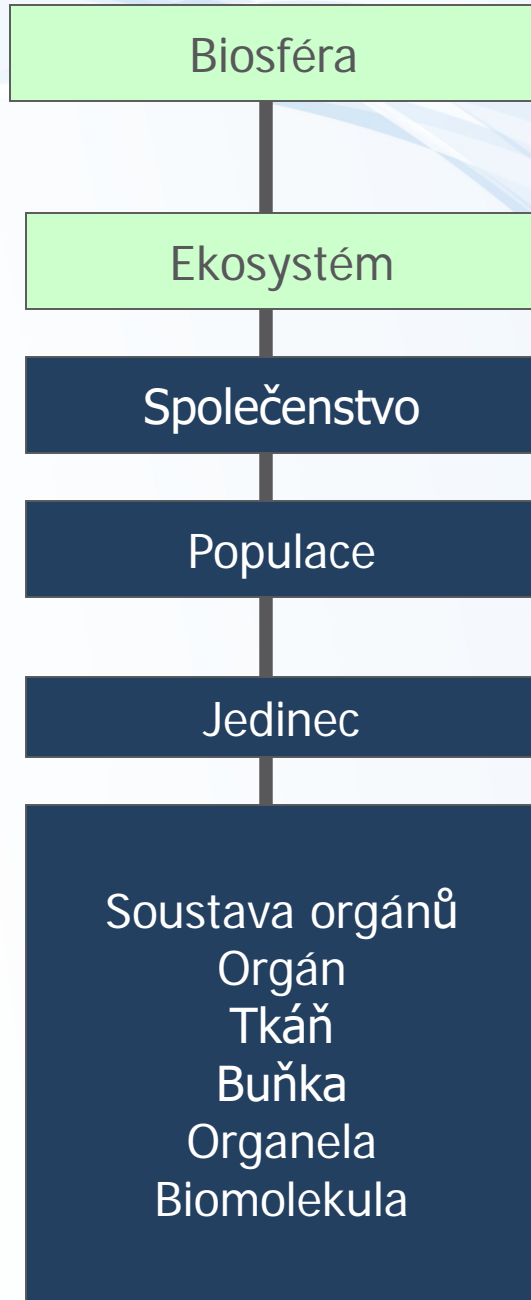


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



pro výzkum
látek
di



NÍZKÁ

VYSOKÁ

Ekologická
relevance
Trvání odpovědi
Dlouhodobější
následky

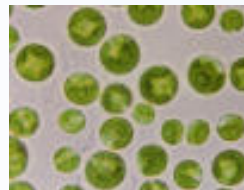
Flexibilita
Schopnost určit
příčinu
Specifita
Citlivost

VYSOKÁ

NÍZKÁ

BIOMARKERY

- Časné varovné signály potenciálního poškození organismu i celé populace, časný marker toxicity (*i bez morfologických změn*)
- Vybrané parametry, jejichž měřitelné změny jsou prvními, časnými odpověďmi na expozici cizorodými látkami („early warning of biological impact“).
- Cizorodými látkami způsobené změny buněčných nebo biochemických složek, struktur, nebo funkcí, které jsou měřitelné v biologickém vzorku
- Citlivé, rychlé odpovědi, mohou ukazovat mechanismus účinku, předcházejí viditelným symptomům toxicity
- Nejlépe prostudovány u vyšších živočichů (savců, ryb)
- Možno sledovat i u druhů ze standardních akvatických biotestů (řasy, makrofyta, bezobratlí)



Biochemické markery

- screeningové metody s vysokou predikční schopností, alternativa/doplnění ke stávajícím metodám.
- používány v základním toxikologickém, ekotoxikologickém a farmakologickém výzkumu, v medicínské diagnostice.
- některé obecně akceptovány.
- řada parametrů testována jako potenciální biochemické markery.
- potenciál využití jako alternativní metody pro toxikologické hodnocení nových xenobiotik.

Výhoda biologických a biochemických indikátorů kontaminace: schopnost vypovídat o vlivu znečištění v celém jeho komplexu, se všemi synergistickými a antagonistickými vlivy mezi jednotlivými znečišťujícími komponenty.



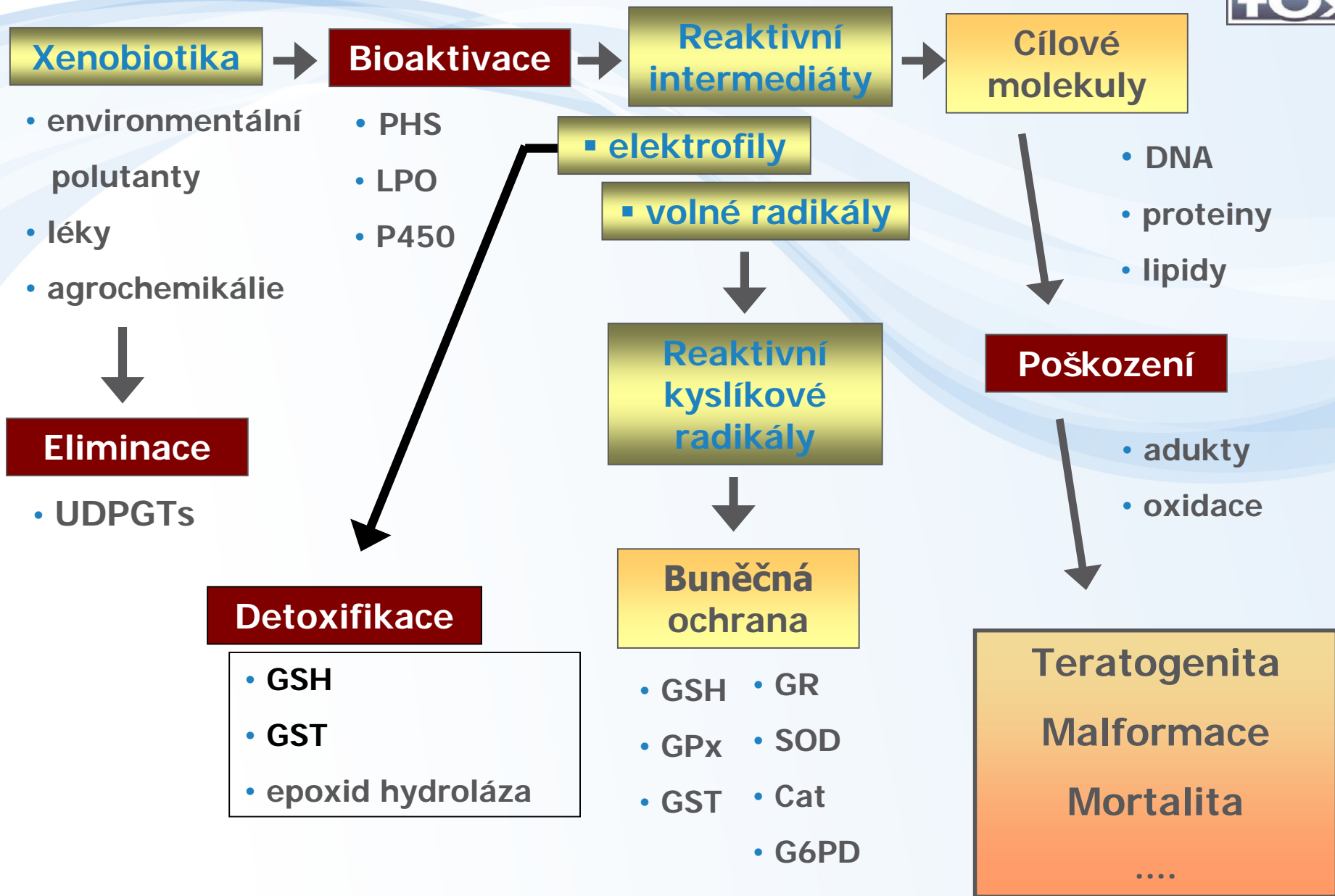
Biochemické markery

Princip: toxické látky v subletálních koncentracích způsobují změny hodnot hematologických, biochemických ukazatelů, nespecifické imunity, vyvolávají histopatologické změny v tkáních.

Po vstupu cizorodých látek do organismu či buňky dochází:

- k jejich vazbě na buněčné receptory kontrolující klíčové buněčné pochody,
- ke vzniku reaktivních intermediátů,
- k inhibici určitých enzymových aktivit a dalším procesům, které předcházejí toxickým a dalším negativním efektům na úrovni buňky, orgánů, organismů a populací.





Biochemické markery toxicity

- indikují mechanismus toxicity, nikoliv určitou cizorodou látku.
- některé biochemické parametry specificky odrážejí expozici některou třídou nebo skupinou kontaminantů.
- biologickými modely jsou nejčastěji jaterní tkáň, i další tkáně dle typu biomarkeru a cíle studie, primární hepatocyty nebo permanentní linie odvozené od hepatocytů, případně odebraná krev či jiné tělní tekutiny
- Vhodně zvolené biomarkery jsou významnými indikátory zdravotního stavu organismů v monitorovaném ekosystému.
- Předností je schopnost detekovat toxické účinky látek před manifestací jejich účinku, tzn. před narušením fyziologických funkcí jako např. růstu, vývoje, reprodukce.



Biomarkery = biochemické či fyziologické indikátory expozice nebo vlivů xenobiotik na suborganismální nebo organismální úrovni

Výhoda: odpovídají na expozici = reagují pouze na polutanty dostupné pro organismus.

Vhodné biomarkery by měly splňovat následující vlastnosti:

- (i) senzitivní ve srovnání s ostatními biomarkery;
- (ii) specifická ke konkrétním druhům chemických xenobiotik;
- (iii) permanentní odpověď;
- (iv) jasnost v interpretaci a propojení na vlivy vyšší úrovně;
- (v) spolehlivost, reprodukovatelnost;
- (vi) preciznost, jednoduchost a nízké náklady;
- (vii) aplikovatelnost v terénních podmínkách a validace v terénu

BIOMARKERY EXPOZICE

- identifikují látku v systému a interaktivní produkt mezi xenobiotikem a endogenní složkou nebo jiné skutečnosti v biologickém systému způsobené expozicí.
- charakterizují množství toxikantu, které proniklo do organismu
- neposkytují příliš informací o následcích expozice, různě specifické

BIOMARKERY ÚČINKU-VLIVU

- biochemické změny, které se projevily jako výsledek negativní interakce toxikantu a biologického systému a mohou vyústit až v patologické poškození organismu



Biomarkery expozice

I. Stresové proteiny (proteiny teplotního šoku)

- nespecifické, indukovatelné u rostlin i živočichů

II. Inhibice esterázové aktivity (acetylcholinesterázy)

- enzym nervového systému živočichů, specifická odpověď
- po expozici organofosfátových pesticidů a karbamátů
- primární toxický vliv těchto látek, stupeň inhibice enzymů je v úzkém vztahu k expozici tkání

Acetylcholinesteráza (AChE): zejména v mozku, červených krvinkách a plasmě některých obratlovců, zodpovědná za hydrolýzu acetylcholinu, hlavního přenašeče nervových vzruchů mezi nervovými buňkami. Její inhibice silně ovlivňuje přenos nervových signálů.

III. Metalothioneiny

- cytoplasmické kovy-vážící proteiny, vyskytují se u řady eukaryot, indukce po expozici kovy, biomarkery vlivu toxických kovů.
- skupina proteinů s nízkou molekulovou hmotností, vysokým obsahem aminokyselin obsahujících sulfhydrylové skupiny (zejména cystein) a schopností vázat těžké kovy. K jejich zvýšené syntéze dochází při zvýšené koncentraci iontů kovů, jak esenciálních, tak toxických



BIOMARKERY EXPOZICE

IV. Indukce detoxikačních enzymů u rostlin i živočichů

A. Enzymy I. fáze biotransformace – enzymy MFO (monooxygenázy smíšené funkce) – indukce enzymů cytochromu P450 (EROD, MROD, PROD)

cytochrom P4501A - biomarker expozice důležitých skupin organických látek

- hladina cytochromu indukována 2,3,7,8-tetrachlodibenzo-p-dioxinem a příbuznými látkami, PCB, PAH
- cytochromy P450 (CYP) jsou hemoproteiny schopné vázat molekulární kyslík a vsunovat jeho jeden atom do molekuly substrátu, kterým mohou být i cizorodé látky, které jsou jedním nebo více cytochromy přeměněny tak, aby mohly být z organismu např. exkretovány.

B. Enzymy II. fáze biotransformace – glutathion transferázy (GST), uridinedifosfoglukuronosyl transferázy, sulfotransferázy



Biomarkery účinku

- I. **Parametry oxidativního stresu** - produkce kyslíkových radikálů, aktivita antioxidantních enzymů, koncentrace neenzymatických antioxidantů, oxidativní poškození makromolekul
- II. **Parametry energetické bilance organismu** – obsah lipidů, proteinů, uhlovodíků a aktivita elektronového transportu
- III. **Indikátory narušení metabolismu** - metabolické enzymy pyruvát kináza, laktát dehydrogenáza, isocitrát dehydrogenáza
- IV. **Biomarkery zatížení endokrinního systému** - vitelogenin, hormony T3 a T4, enzymy metabolismu steroidních hormonů.
- V. **Genotoxické biomarkery** (narušení integrity DNA – zlomy v DNA, mikrojaděrka)
- VI. **Histologicko-patologické změny některých orgánů**



BIOMARKERY ÚČINKU

Parametry oxidativního stresu

- produkce kyslíkových radikálů – superoxid, peroxid vodíku, hydroxylový radikál
- aktivita antioxidantních enzymů – glutathion peroxidáza, glutathion reductáza, superoxidáza, kataláza
- koncentrace neenzymatických antioxidantů
- oxidativní poškození makromolekul – lipidní peroxidace, oxidativní adukty DNA, produkty oxidace proteinů

Jedná se biomarkery organochlorových pesticidů, PCB, pesticidů typu paraquat apod.

Genotoxické biomarkery (narušení integrity DNA – zlomy v DNA, mikrojadérka) - využívány při hodnocení zatížení ekosystémů látkami s genotoxickým účinkem, které indukují vznik chromosomálních aberací a mutací.

alternativa detekce - metody PCR, RT-PCR a DNA-fingerprintingu, test mikrojader

Test mikrojader (MNT) - jednoduchá orientační metoda ke stanovení genotoxicity. Pozitivní po působení PCB, benzpyrenu, benzidinu, apod.

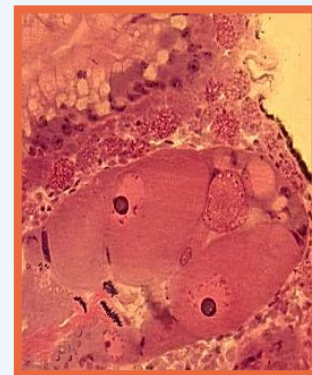


Biomarkery účinku na endokrinní systém

Stanovení produkce vitelogeninu

- Vitelogenin je bílkovina produkovaná jaterními buňkami ryb, obojživelníků, plazů a ptáků.
- Produkce je indukována vazbou estrogenů na jaderné receptory.
- U samic je vitelogenin transportován do vaječnicků, kde tvoří součást žloutkových proteinů.
- U samců je hladina endogenních estrogenů přirozeně velmi nízká, a proto je i produkce vitelogeninu minimální
- Po působení ED's s xenoestrogenním účinkem (např. ethinylestradiol, chlordan, toxafen, dieldrin, 4-nonylfenol) dochází u obou pohlaví ke zvýšení hladin vitelogeninu – výrazné zejména u samců
- Naopak působením antiestrogenních ED's (např. metoxychloru) se produkce vitelogeninu minimalizuje pod měřitelnou úroveň.
- Sledován zejména u ryb a obojživelníků

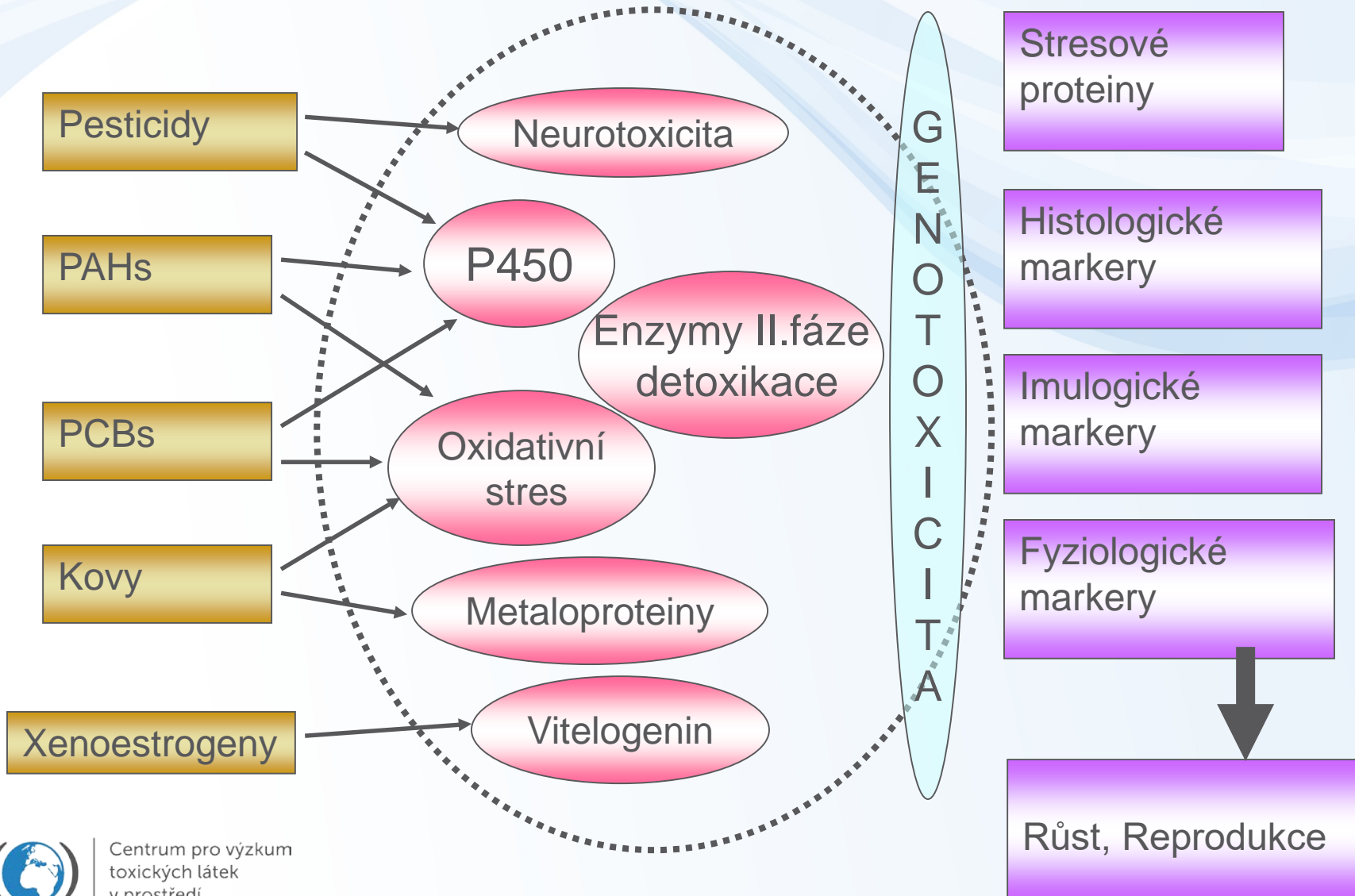
Další parametry: vitelin, cytochromy, hladiny hormonů
Histochemická charakteristika a lokalizace



BIOMARKERY

Specifičtější parametry

Nespecifické parametry



Doporučené metody pro biologické monitorovací programy ve vodním prostředí na národních úrovních

Metoda	Organismus	V současnosti používán v monitorovacích programech	Biomarker látek	Biologický význam
Tvorba DNA aduktů	Ryby, mlži	Francie, Holandsko, Švédsko, USA	PAU, nitro látky, aminotriazinové pesticidy	Parametr genotoxických vlivů, citlivý indikátor minulé a současné expozice
Inhibice acetylcholinesterázy	Ryby, koryši, mlži	Francie	Organofosfáty a karbamáty nebo podobné molekuly, možné řasové toxiny	Parametr expozice
Indukce metallothioneinů	Ryby	Monitoring and Research Programme of the Mediterranean Action plan, Holandsko	Indukce metallothioneinových proteinů vlivem určitých kovů (Zn, Cu, Cd, Hg)	Parametr expozice a disturbance metabolismu mědi a zinku
Indukce ethoxyresorufin-O-deetylázy (EROD) nebo cytochromu P450 1A	Ryby	Německo, Francie, Holandsko, UK, Belgie, Monitoring and Research Programme of the Mediterranean Action plan, Norsko	Indukce enzymů detoxikujících planární organické kontaminaty (PAU, planární PCB, dioxiny)	Možný prediktor patologie vlivem mechanistických propojení, senzitivní indikátor současné expozice
Inhibice Δ -amino levulinové kyselina (ALA-D), indukce vitellogeninu	Samci a juvenilní jedinci ryb	Holandsko, UK	Estrogenní látky	Parametr feminizace samčích ryb a reprodukční poškození

Aplikace biomarkerů v akvatických testech

- Při přípravě testu nezbytné používat dobře charakterizovaný materiál – homogenní populaci
- faktory ovlivňující biomarkery - druh organismu, pohlaví, věk, vývojové stadium a výživa, environmentální faktory (teplota etc.)
- otestovat a nakalibrovat potřebné množství vzorku podle množství sledovaných parametrů, jejich limitu detekce a spotřeby biologického materiálu pro jednotlivé metodiky - u malých druhů směsné vzorky z více jedinců



Biomarkery - závěry

- Biomarkery = citlivé indikátory zatížení organismů environmentálními stresory a subletálních účinků
- Umožňují náhled do subletálních fyziologických procesů – charakterizují mechanismus účinku
- Specifické markery – informují o přítomnosti specifického stresoru
- Použitelnost určitého biomarkeru pro každý nový druh musí být validována a optimalizována, musí být posouzena jeho relevance a míra odpovědi pro nový druh
- Nezbytný multiparametrický přístup
- Studium spojení časných subletálních biochemických a buněčných změn s dlouhodobějšími negativními účinky na úrovni populace a společnosti

