

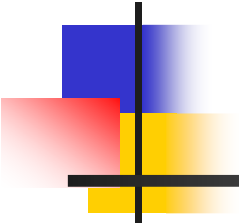
Využití in vitro testu genotoxicity v biologickém monitoringu a pro hodnocení bezpečnosti chemických látek

RNDr. Dana Očadlíková
Státní zdravotní ústav Praha



Genotoxicita

genotoxické látky
(mutageny a karcinogeny)



**schopnost vyvolat poškození
chromozomů v somatických
nebo zárodečných buňkách**

riziko vzniku nádorových onemocnění
vliv na buněčné reparační mechanismy
procesy apoptózy

Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů (CALPL)

biologický expoziční test

biomarker expozice a účinku genotoxických látek

**využití: monitorování pracovního prostředí u profesionálně exponovaných osob
testování chemických látek**

Metodika:

kultivace periferních lymfocytů (48 hod.)

kolchicin (2 hod.) – zastavení mitotického dělení ve stadiu metafáze

fixace, barvení Giemsou

mikroskopické hodnocení metafázických chromozomů



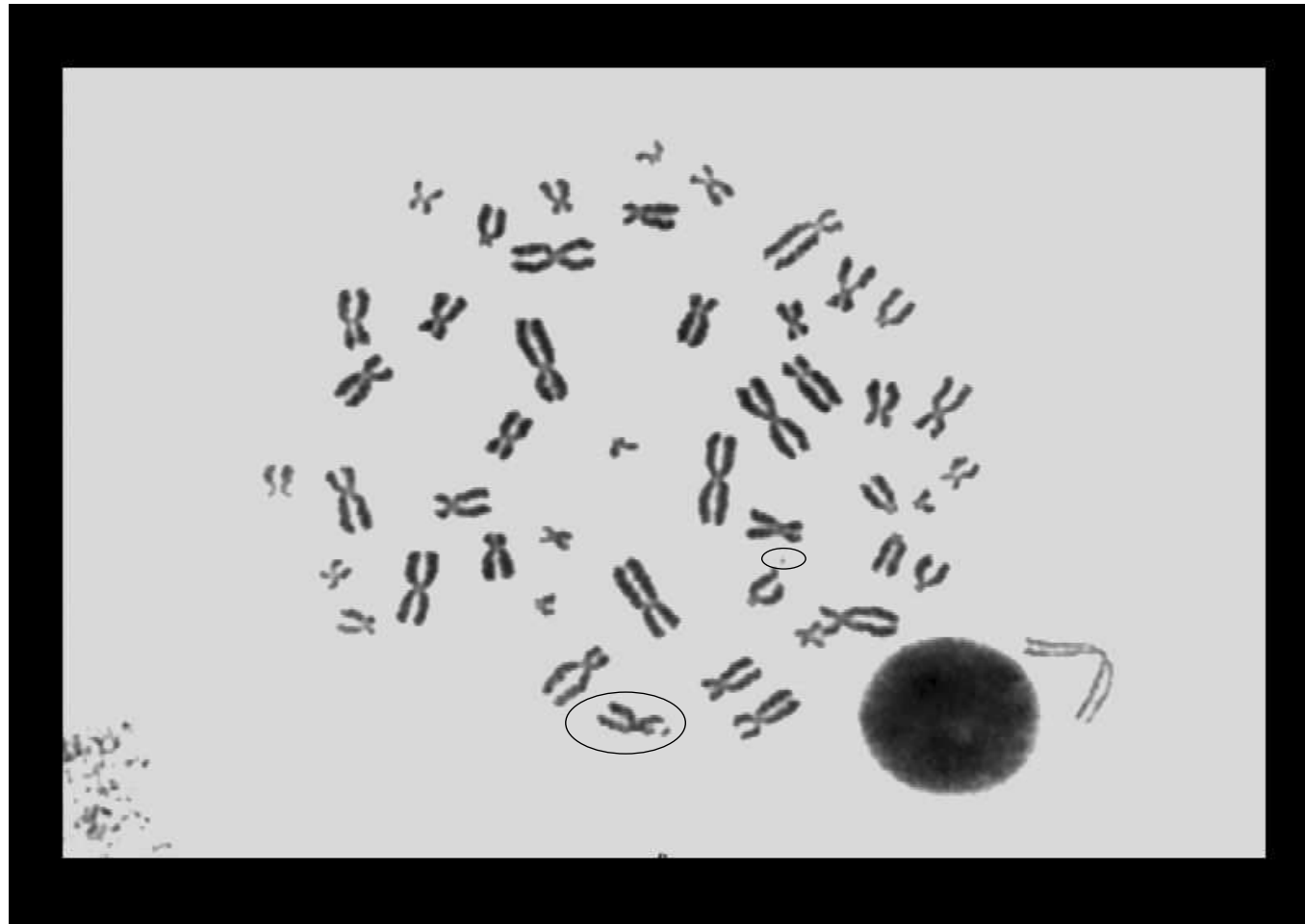
Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů (CALPL)

Hodnocení:

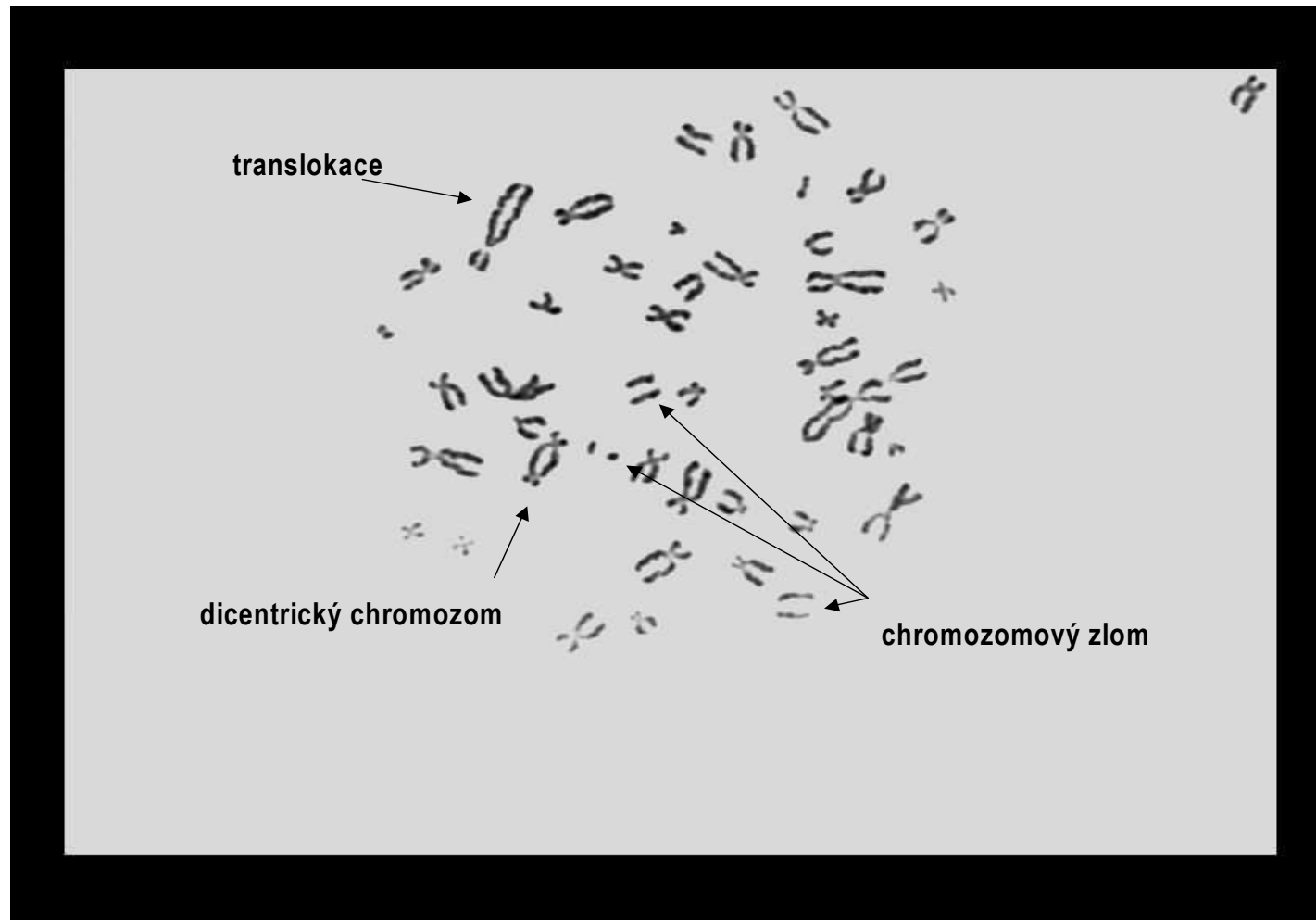
chromatidové a chromozomové zlomy
chromatidové a chromozomové výměny –
translokace, dicentry, ringy

% aberantních buněk (AB.B.)

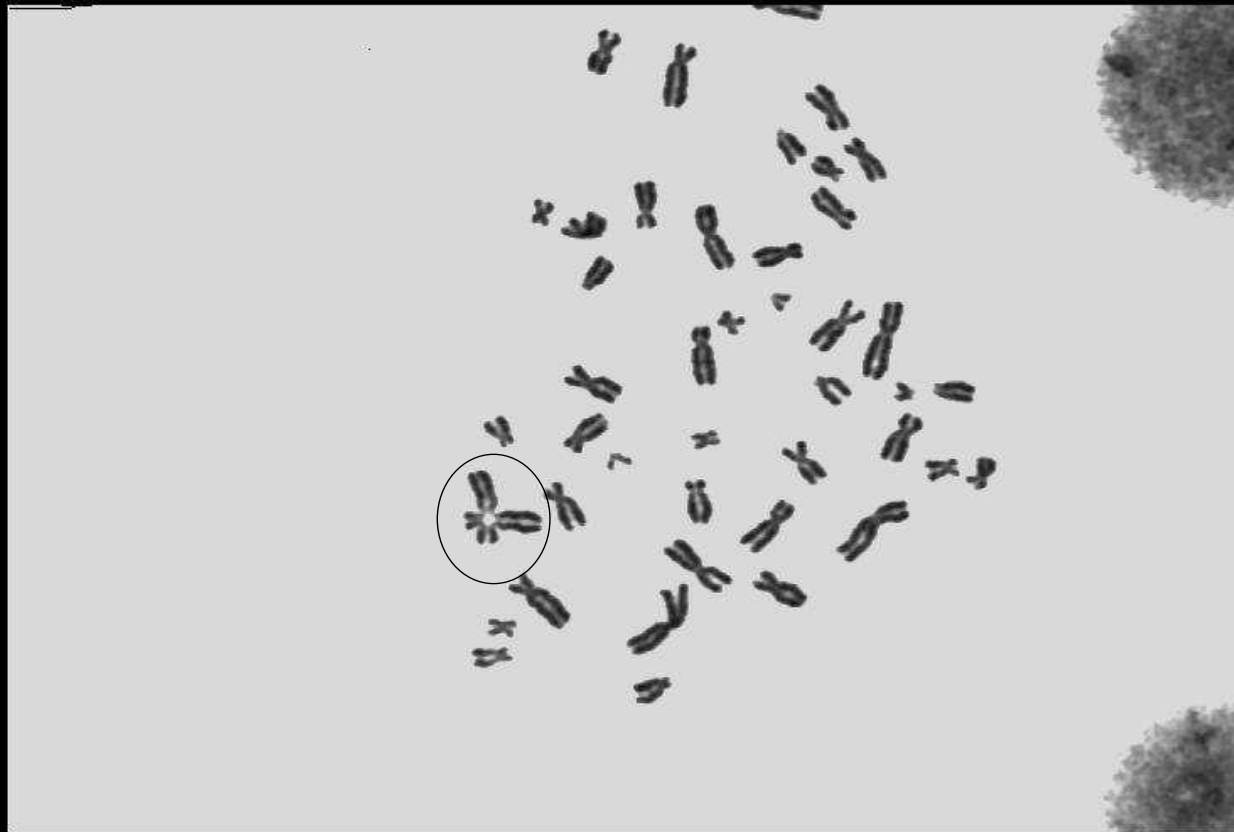
Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů (CALPL)



Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů (CALPL)



Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů (CALPL)





Hodnocení chromozomových aberací

skupinové hodnocení

minimálně 10 osob, 100-200 mitóz/osobu

průměrná hodnota % aberantních buněk u skupiny

spontánní (referenční) hodnota

soubor 1998 neexponovaných dospělých z let 2000-2006
1,7% AB.B.

* méně než 2% AB.B.

spontánní frekvence aberantních buněk

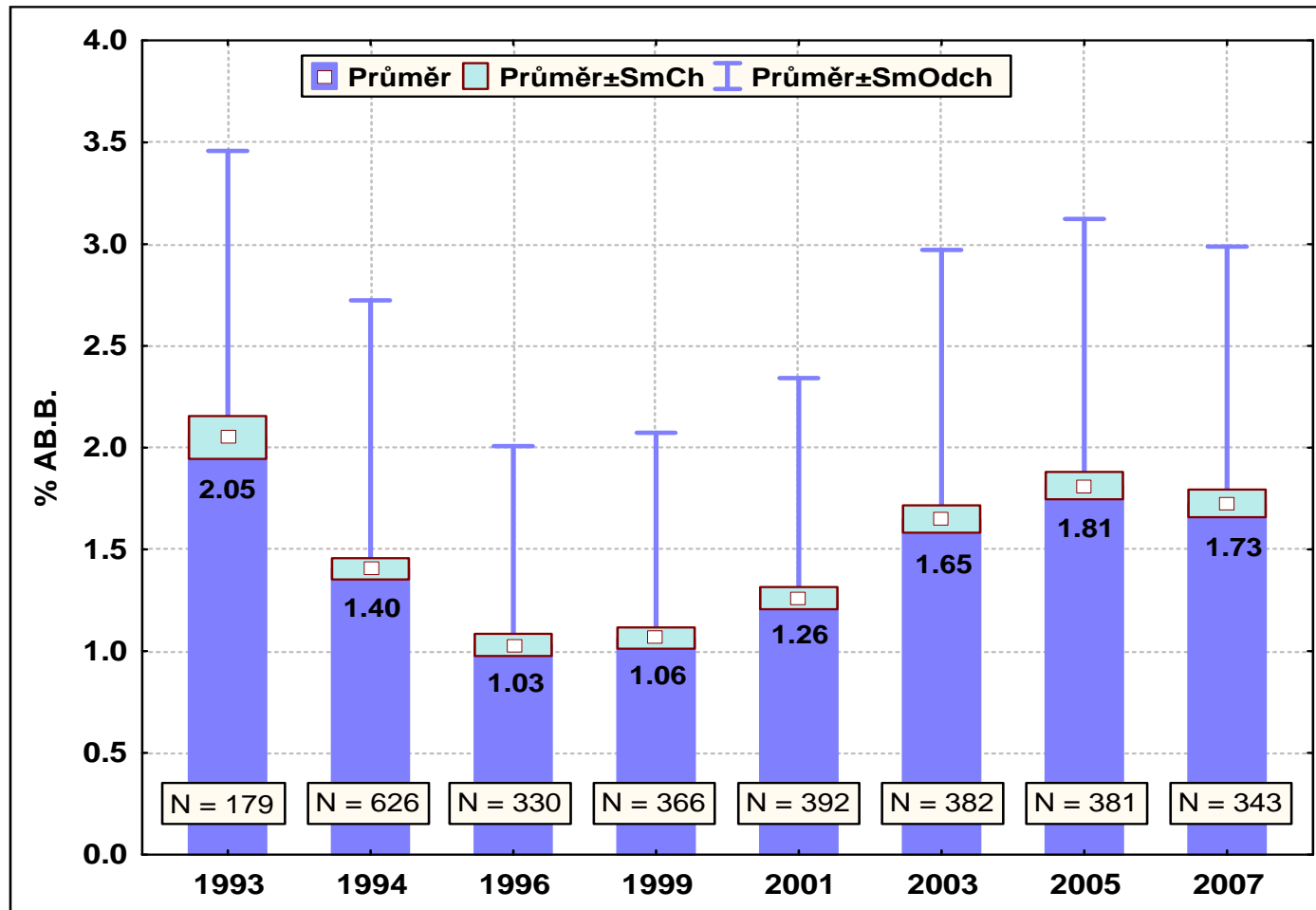
* 2 – 4% AB.B.

zvýšená expozice genotoxickým látkám, 1x ročně

* více než 4% AB.B.

vysoká expozice, opak. za 2-4 měsíce, kontrola 1x ročně

Spontánní frekvence aberantních buněk (AB.B.) u dospělých (1993 – 2007)





Hodnocení chromozomových aberací

individuální hodnocení

méně než 10 osob

analyzuje se minimálně 200 mitóz/osobu

* 0 – 5% AB.B.

Roztoky – laboratoře výzkumu a vývoje cytostatik

	2004	2005		2006	2008	2009	2010	2011
		únor	říjen					
A	4,5	1	1,5	2,5	2	2	3	3
B	3,5	2,5	0	1,5				
C			1	1	1,5			
D				1	2	2,5	3	
E				2,5	2	2,5	1	3
F					0	2	1	1



Hodnocení chromozomových aberací

individuální hodnocení

Klinická onkologie (Mladá Boleslav a Kolín)

	1995	1996	1997	1998	1999	2001	2003		2004	2005	2008	2010	2011
							únor	říjen					
A	3		1	1	0,5	2,5	4,5	2		3	0	5,5	3,5
B	3		2	2	4	0,5	4	1		4	1,5		
C					1,5	1,5	8	6	4,5	2,5	3		
D					2	1,5	5	3		2			
E										3	0,5	3	2,5
F											2	3	3,5
G											1	1,5	2



Hodnocení chromozomových aberací

Individuální hodnoty

během let mohou kolísat v rozmezí 0 – 5% AB.B., avšak hraniční hodnoty (od 5%) se nachází jen ojediněle

Opakovaný nálezn 5 a více % AB.B. – nejedná se pravděpodobně o statistický jev, ale o důsledek významné expozice genotoxickým faktorům nebo o osobní dispozici vyšetřované osoby

Opakovaně zjištěnou frekvenci 5 a více % AB.B. je třeba považovat za kontraindikaci pro práci v riziku chemické karcinogenity

Hodnocení bezpečnosti chemických látek



**In vitro mammalian chromosome aberration
test B.10 (OECD 473)**

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008

ze dne 30. května 2008,

**kterým se stanoví zkušební metody podle
nařízení Evropského parlamentu a Rady
(ES) č. 1907/2006**

**při registraci, hodnocení, povolování
a omezování chemických látek (REACH)**

Hodnocení bezpečnosti chemických látek

In vitro mammalian chromosome aberration test B.10 (OECD 473)

Studie byla zaměřena na pigmenty, které se běžně používají v kosmetice.

U těchto látek se předpokládá, že jsou zdravotně nezávadné.

Avšak dostupné informace o jejich zdravotní bezpečnosti jsou nekompletní a někdy i kontroverzní.

Chybí zásadní toxikologické údaje a údaje spojené s lokální fototoxicitou.

Koloranty obvykle absorbují v UV viditelné oblasti, proto je u nich určení fototoxicity nutné.

Skupina 13 kosmetických pigmentů – 4 vykazovaly fototoxický efekt
(In vitro 3T3 NRU test fototoxicity)

* Test kožní penetrace in vitro, Ames test, test na chromozomové aberace

Hodnocení bezpečnosti chemických látek

In vitro mammalian chromosome aberration test B.10 (OECD 473)

Obchodní názvy

Caramel P-WS

Unicert Red K7054-J

Unicert Red K 7008-J

Chlorophyllin

Hodnocení bezpečnosti chemických látek

In vitro mammalian chromosome aberration test B.10 (OECD 473)

Schéma testu

buněčná kultura periferních lymfocytů z lidského donora

* **předtest**

± 5 koncentrací testované látky

* **hlavní test**

paralelně 3 různé koncentrace

4 hod. aplikace s/bez S9 metabolické aktivace

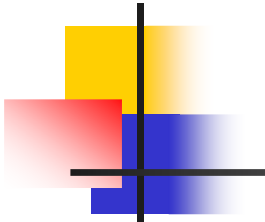
* **opakovaný test**

26 hod. aplikace bez S9 metabolické aktivace

pozitivní výsledek: minimálně 2-násobné zvýšení AB.B. oproti kontrole
koncentrační závislost

Hodnocení bezpečnosti chemických látek

In vitro mammalian chromosome aberration test B.10 (OECD 473)



	mg/ml kultury	%AB.B. (S9 -)	%AB.B. (S9 +)
Caramel P-WS	5	3,5	6
	2,5	3,5	4,5
	1	6	2,5
Unicert Red K7054-J	1	-	7
	0,5	6,5	4
	0,25	5	3
Unicert Red K 7008-J	2	6,5	9
	1	10	7
	0,5	4,5	5,5
Chlorophyllin	0,5	6,5	6
	0,25	6,5	5
	0,1	5	5
kontrola		2	3

Hodnocení bezpečnosti chemických látek



In vitro mammalian chromosome aberration test B.10 (OECD 473)

Závěr

Testované 4 barvy se používají jako ingredience v dekorativní a neoplachové kosmetice bez jakéhokoliv omezení.

Penetrují do epidermis, dermis a krevního řečiště a ačkoli se užívají v nízkých koncentracích, pozitivní nálezy naznačují jejich fototoxický a genotoxický potenciál.

U pigmentů používaných v kosmetice by proto měly být doplněny chybějící toxikologické údaje pro konečné určení jejich bezpečnosti, aby se předešlo nežádoucím kožním reakcím, případně systémovým onemocněním, např. fototoxicitě, fotoalergiím nebo dokonce karcinogenitě.