

# A többvégpontos humán géntoxikológiai monitor alkalmazása a nem fertőző, krónikus betegségek kockázatbecslésében

Pándics Tamás, Jakab Mátyás, Besenyei Krisztina,  
Biró Anna, Major Jenő, Tompa Anna

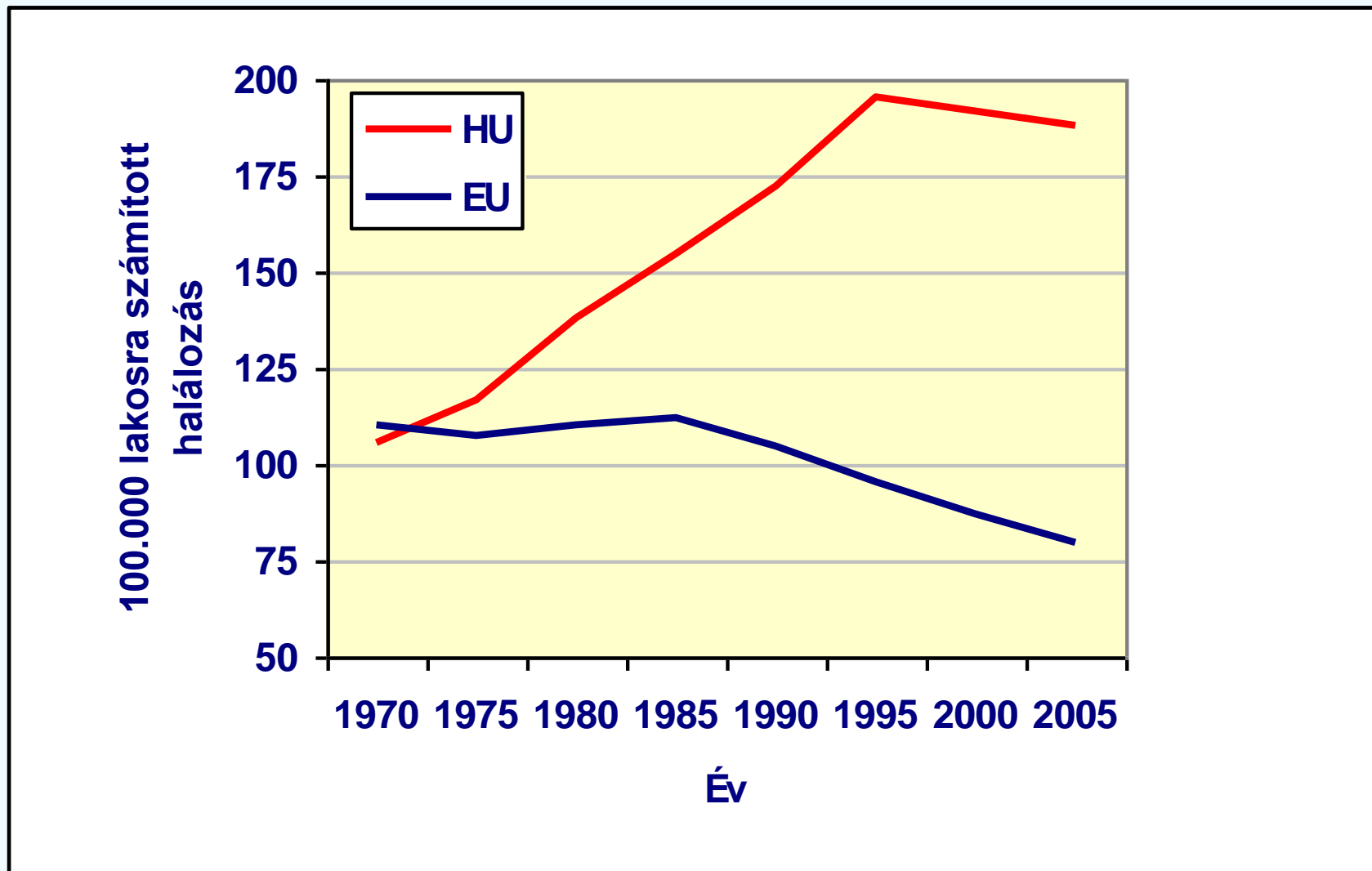
Országos Közegészségügyi Központ, Budapest

TOX'2016 Konferencia  
Hajdúszoboszló, 2016. október 12-14.

# Bevezetés

- Magyarországon a legsúlyosabb népegészségügyi gondot a **nem fertőző, krónikus megbetegedések** jelentik, amelyek kóroki tényezői között kiemelt jelentőségűek a **késői toxikus** (géntoxikus és endokrin károsító) hatású **vegyi anyagok**.
- A géntoxikus hatások kimutatása, a bakteriális módszerektől a humán populációk vizsgálatáig, végig validált.
- A humán populációk géntoxikológiai monitorozásának alapvető módszere a kromoszóma aberráció gyakoriságok epidemiológiai megközelítésű vizsgálata, melynek célja a kockázatbecslés és nem a diagnosztika.
- Az OKK-OKBI-ben az elmúlt közel 30 év alatt kereken 6000 donor, 30.000 vizsgálata történt, részben pilóta, részben követéses vizsgálatban.
- A donorok leukocitáin végzett géntoxikológiai (a primer genotípus módosulására irányuló) vizsgálatokat kiegészítik az immuntoxikológiai (a következményes fenotípus módosulásra irányuló) vizsgálatok, valamint a részletes anamnesztikus és klinikai háttér.
- **Cél:** a gén- és immuntoxikológiai vizsgálatok alkalmazhatóságának bemutatása a kémiai kóroki tényezők primer prevenciójában.

# Rosszindulatú daganatos halálozás alakulása Magyarországon és az Európai Unióban



# Daganatkeltő hatások

---

	<b>Géntoxikus</b>	<b>Epigenetikus</b>
<b>Hatás típusa</b>	<b>Mutagén</b>	<b>Nem mutagén</b>
<b>Hatás a DNS-re</b>	<b>Megváltoztatja</b>	<b>Nem változtatja meg</b>
<b>Következmény</b>	<b>Genotípus változás</b>	<b>Fenotípus változás</b>
<b>Hatásmechanizmus</b>	<b>Sztohasztikus</b>	<b>Determinisztikus</b>
<b>Küszöbdózis</b>	<b>Nincs</b>	<b>Van (NOAEL)</b>
<b>Határérték</b>	<b>Nincs (MK)</b>	<b>Van (MAK)</b>

---

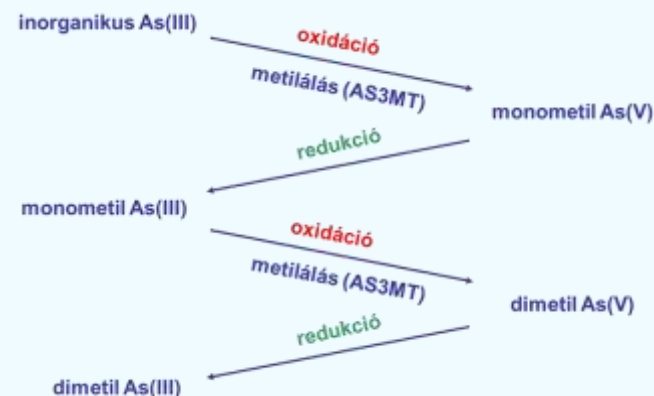
# Fontosabb munkahelyi kémiai rákkeltők

VEGYI ANYAG	MUNKAHELY
Arzén	Mezőgazdaság, halászat, bányászat
Azbeszt	Bányászat, tűzvédelem
Radon	Bányászat
Ipari korom, nyersgumi	Szigetelés, csatorna, kéménytisztítás
Aromás aminok	Festékgyártás
Policiklikus aromás szénhidrogének	Kőolajipar
Kátrány	Kőolajipar
Nikkel, króm	Fémipar
Peszticidek	Vegyipar, mezőgazdaság
Vinilklorid	Műszálgyártás
Sztirol	Műanyagfeldolgozás
Formaldehid	Festékgyártás
Klórozott szénhidrogének	Peszticidek gyártása
Benzol	Gumiipar, olajfinomítás
Festékek, színezők, cserzők	Bőripar
Fapor, ragasztók, műgyanták	Faipar
Akrilnitril, dimetil-formamid	Textilipar
Etilénoxid	Egészségügy, élelmiszeripar

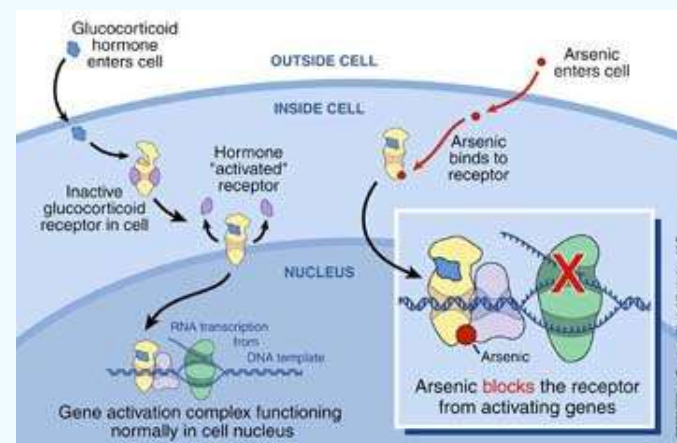
# A környezeti arzén-expozíció egészségkárosító hatásai

Növekvő dózis

- Daganatkeltő hatás
  - Géntoxicitás (oxidatív stressz)
  - DNS repair gátlás (ligáz gátlás)
  - Epigenetikus hatás (metiláció)
- Hormon diszruptor hatás
  - Glukokortikoid receptor gátlás
  - Ösztrogén receptor gátlás
- Citotoxikus hatás
- „Arzénmérgezés” (LD50)



Forrás: Watson, Yager: Tox. Sci. 98:1-4. 2007.



Forrás: Kaltreider et al.: Env. Hlth Persp. 109:245. 2001.

# Kémiai expozíciók jelentősége az egészségkárosodásban

Tudományosan igazolt megállapítás:

A rákkeltő ágensek közül jelenleg a **kémiai ágensek** a legjelentősebbek!

Ez nagy valószínűséggel igaz a legtöbb nem-fertőző krónikus megbetegedésre is!



# Környezeti eredetű-e a rák?

C. Tomasetti és B.Vogelstein\* (Science, 2015. jan. 5.):

Nagy populáció vizsgálatán igazolják, hogy

- Az egész életre számított (lifetime) rák kockázat számos daganatban szorosan (0,81) korrelál a normális önmegújító, a szövet homeosztázisát fenntartó sejtek összes sejtosztódási rátájával

Ebből (nem részletezve) arra következtetnek, hogy

- Az összes daganat mintegy 1/3-a lehet csak környezeti eredetű ?
- A többi esetben un. „balszerencsés” (bad luck) mutációk a felelősek a daganat kialakulásáért

\* A p53 gén és fehérje vizsgálatáért potenciális Nobel díjas



# Kombinált hatások

- A valóságban a legtöbb expozíció kombinált
- „Koktél hatások” (addíció, szinergizmus)
- Interferenciák léphetnek fel az ágensek között
- Igen kis (egyenként biztonságos) dózisok is hatásossá vál(hat)nak

# A legjelentősebb nem fertőző, krónikus megbetegedések

- Szív- és érrendszeri megbetegedések
- Rosszindulatú daganatos megbetegedések
- Anyagcsere betegségek (elhízás, cukorbetegség)
- Hormonális zavarok
- Allergiák
- Autoimmun megbetegedések

„civilizációs betegségek”

**KÉMIAI KÓROKI TÉNYEZŐK**

**MEGELŐZHETŐK !!!**

# Megelőzési stratégiák

## → Elsődleges megelőzés:

- **Kórokok megszüntetése**
- kockázati tényezők elkerülése (passzív prevenció)
- a betegség kialakulását elősegítő mechanizmusok befolyásolása (aktív prevenció)

## Másodlagos megelőzés:

- Korai felismerés és gyógyítás

## Harmadlagos megelőzés:

- A kiújulás megelőzése

**A géntoxikológiai monitor a primer prevenció hatásos eszköze**

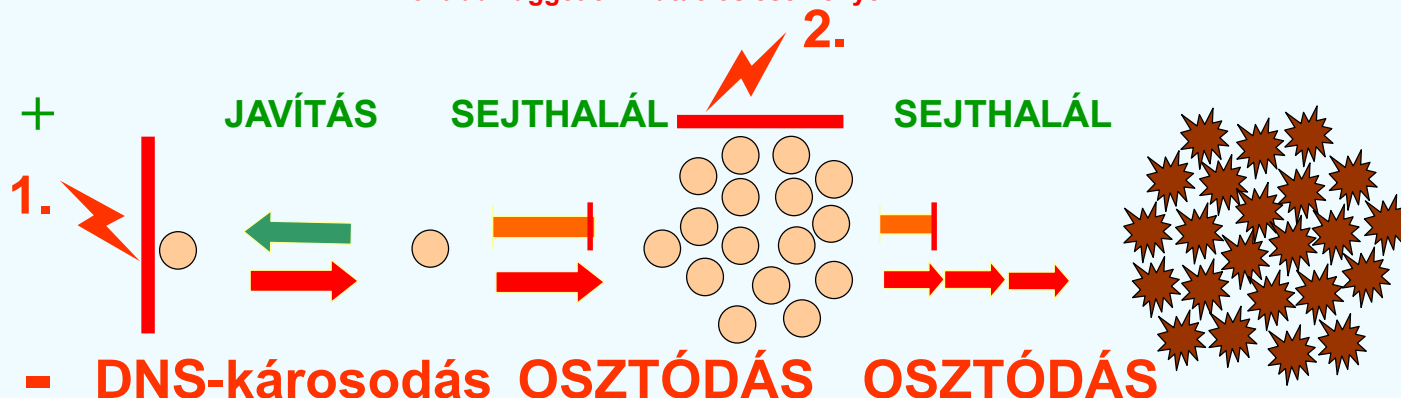
# A daganatok kialakulásának folyamata

KIINDULÁS  
(INICIÁCIÓ)

ELŐREHALADÁS  
(PROMÓCIÓ)

ELHATALMASODÁS  
(PROGRESSZIÓ)

További független mutációs események



EGÉSZSÉGES  
SEJT

INICIÁLT  
SEJT

DAGANAT  
SEJTEK

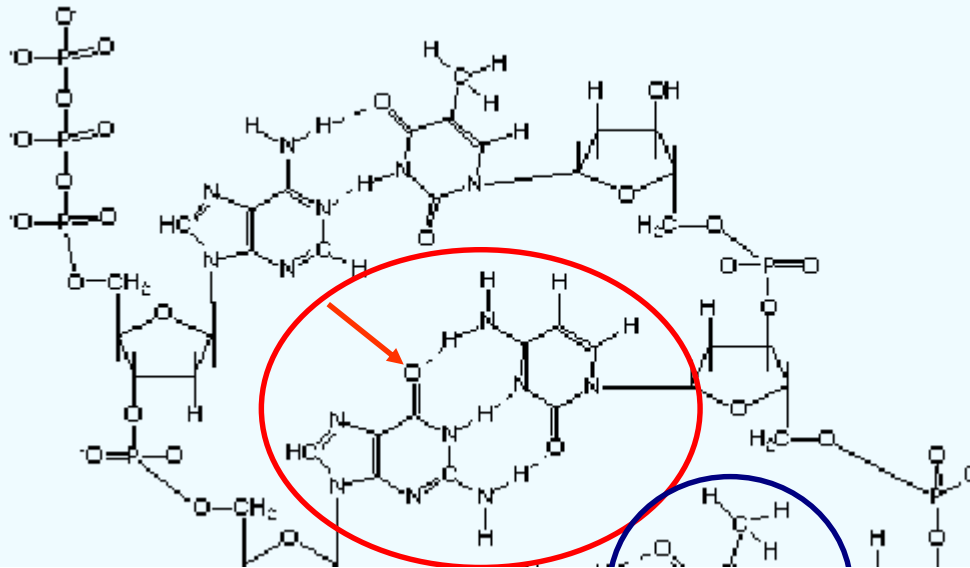
RÁK

1. kémiai támadás: a DNS károsodása

2. kémiai támadás: a jelátviteli utak károsodása

Sztochasztikus / determinisztikus hatás (kis dózisok!)

# A DNS szerkezete és a főbb támadáspontok

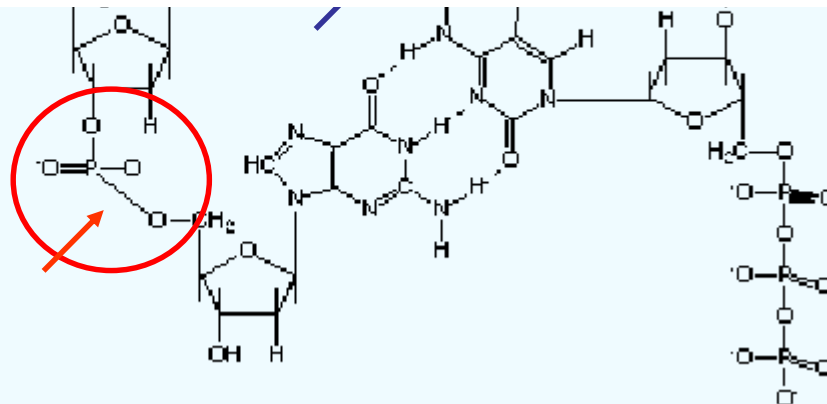


**Oxidáció (ROS)**  
**Addukt képződés**  
**B-B kémiai kötések**

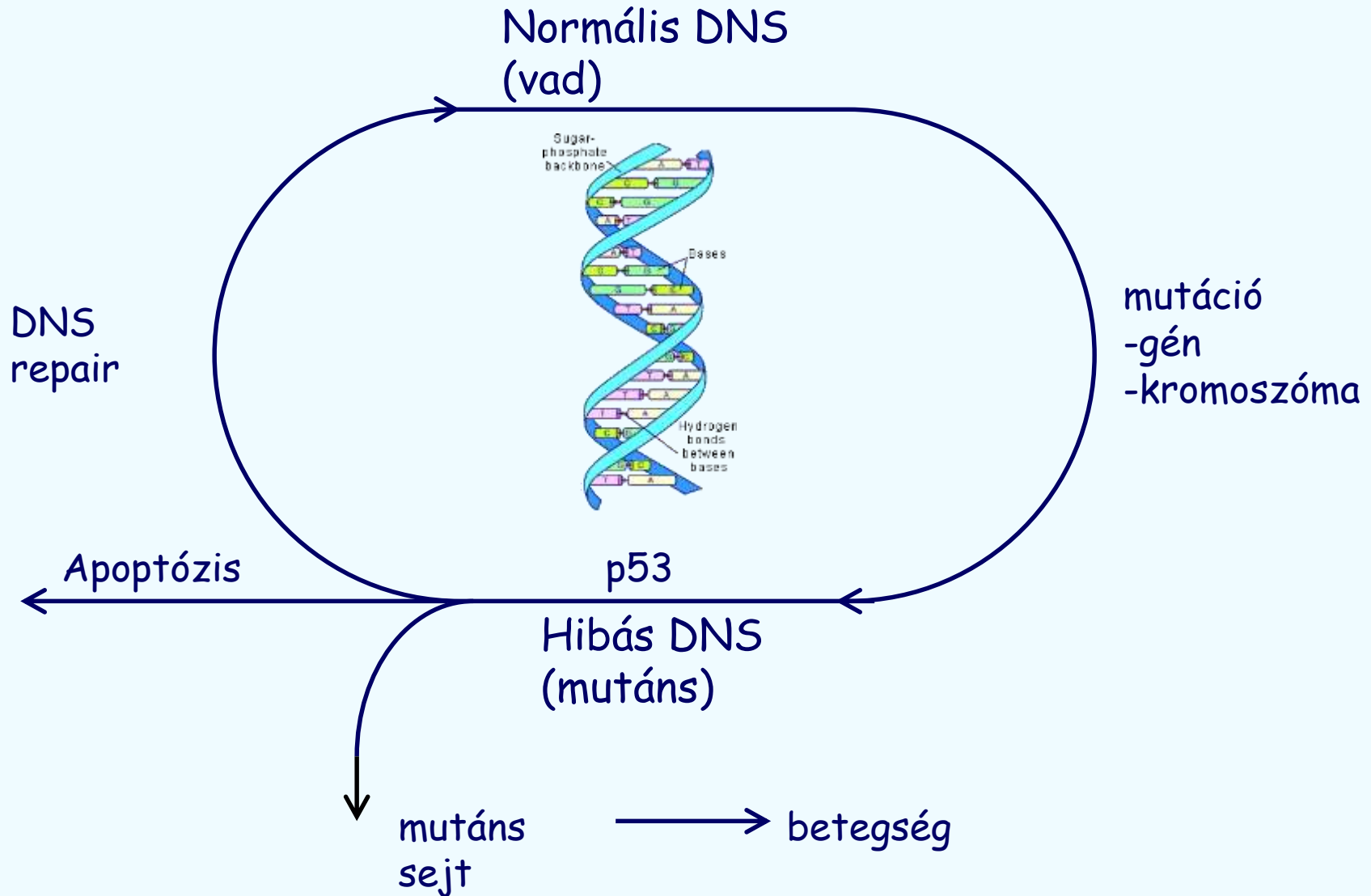
**Bázis módosító hatások:**  
alkiláció, halogenizáció,  
interkaláció,  
nem ionizáló sugárzások

**Az eredmény: a DNS-ben tárolt információ megváltozása,  
azaz mutáció kialakulása!**

**Direkt lánctörő hatások:**  
oxidatív stressz,  
ionizáló sugárzások



# DNS károsodások és eliminációjuk



# A mutációk alaptípusai

A mutációk a hatás helye szempontjából lehetnek:

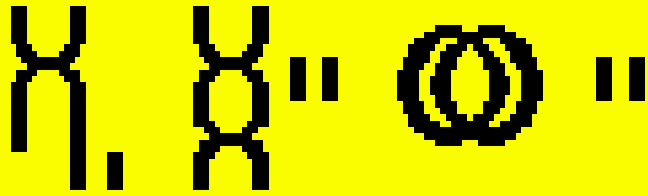
- DNS lánc törések
- Bázismódosulások



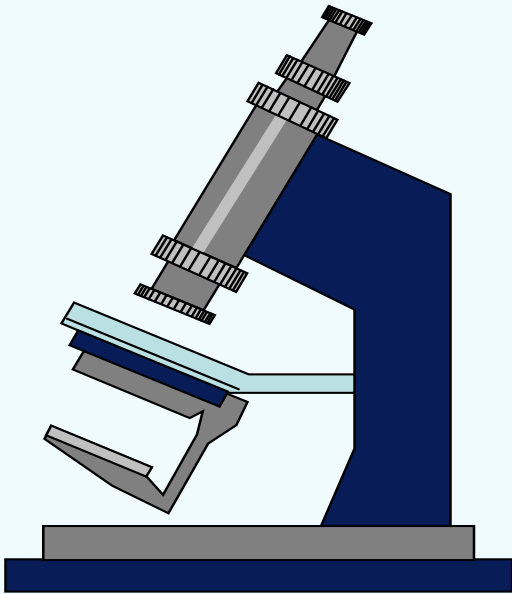
A mutációk kiterjedésük szempontjából lehetnek:

- Génszintűek
- Kromoszóma szintűek

# Strukturális kromoszóma aberrációk



- Valódi mutációs eseményeket tükröznek
- Hosszú távú expozíció retrospektíven is detektálhatók
- Pozitív eredmények megbízhatóak
- Érzékenységi problémák lehetnek: tenyésztés, DNS repair, szelektív stimuláció
- Az analízis időigényes és speciális képzettséget igényel





# A kromoszóma aberrációk mértékének és a populációban később kialakuló daganatok valószínűségének összefüggése

## 1984 donor, 18 éves követés

CA gyakoriság	Észlelt daganat gyakoriság	Becsült daganat gyakoriság	Standardizált incidencia arány (SIR)	95% CI
Alacsony < 1.0 %	16	18.4	0.9	0.5-1.6
Közepes 1.0-3.0 %	11	16.6	0.7	0.3-1.2
Magas > 3.0 %	39	18.9	2.1	1.5-2.8
Összes	66	53.9	1.2	1.0-1.6

P = 0.0009 trend

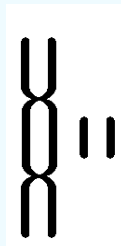
(Hagmar L, et al.: Cancer Res. 54:2919. 1994.)

## 1455 donor, 20 éves követés

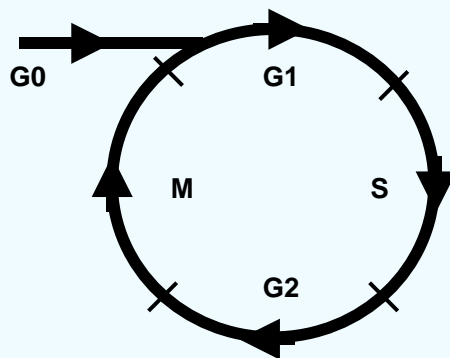
Tumor típusa	CA gyakoriság	Standardizált mortalitási arány (SMR)
Összes tumor	Magas	178.5
	Közepes	182.0
Légzőrendszer	Magas	250.8
Lymphoid, hemopoietikus	Magas	548.8

(Bonassi S, et al.: Cancer Genet. Cytogenet. 79:133. 1995.)

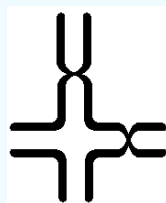
# A kromatida és kromoszóma típusú aberrációk keletkezése a sejtciklus során



Kromoszóma típusú aberrációk  
(egykromatidás állapot)



Kromatida típusú aberrációk  
(kétkromatidás állapot)



# A leggyakoribb kromoszóma aberrációk

## A) Kromatida típusú kromoszóma aberrációk

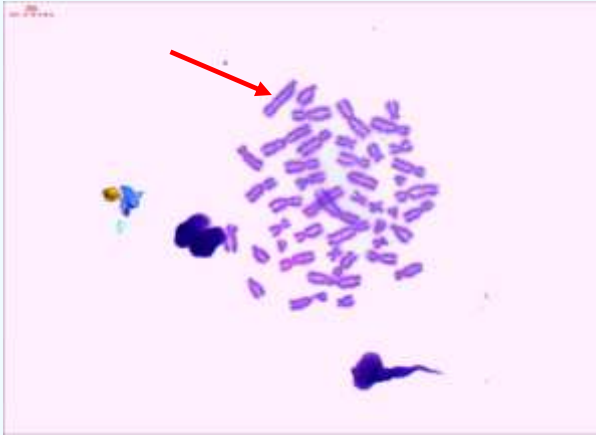
- Gap vagy akromatikus lézió
- Transzlokáció
- Kromatid break vagy törés
- Exchange

## B) Kromoszóma típusú kromoszóma aberrációk

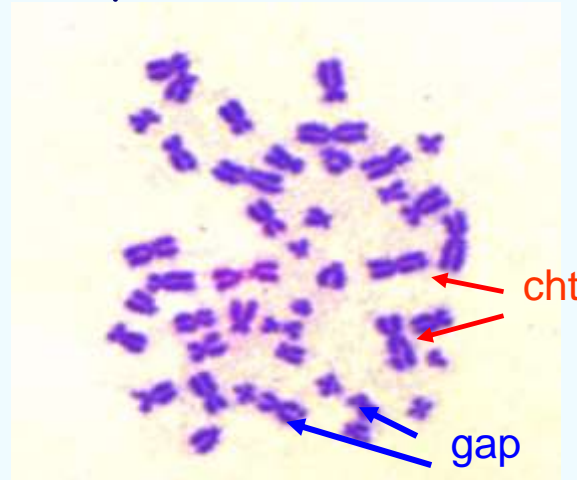
- Terminális deléció vagy kromoszóma törés
- Dicentrikus kromoszóma
- Gyűrű (ring) kromoszóma

# A leggyakoribb kromoszóma aberrációk mikroszkópi képe

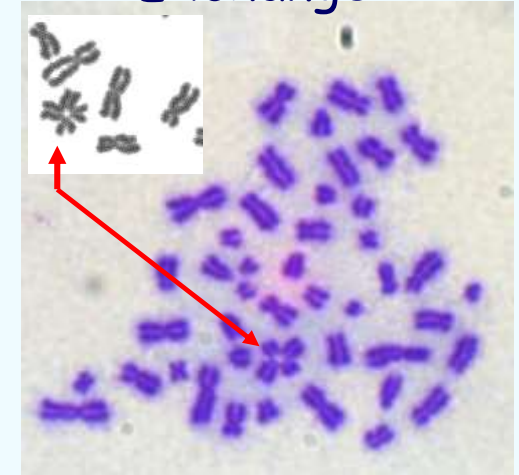
Transzlokáció



Gap és kromatid törés



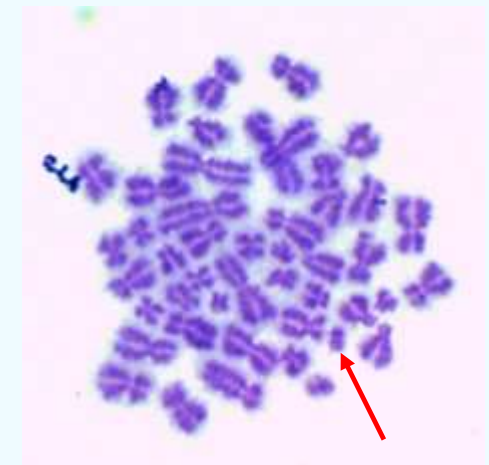
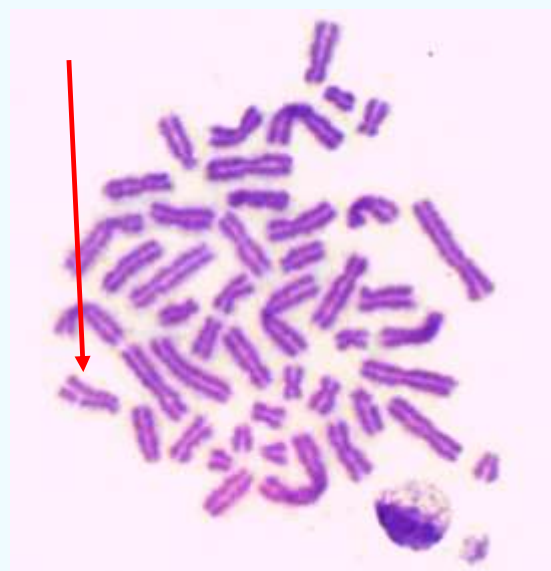
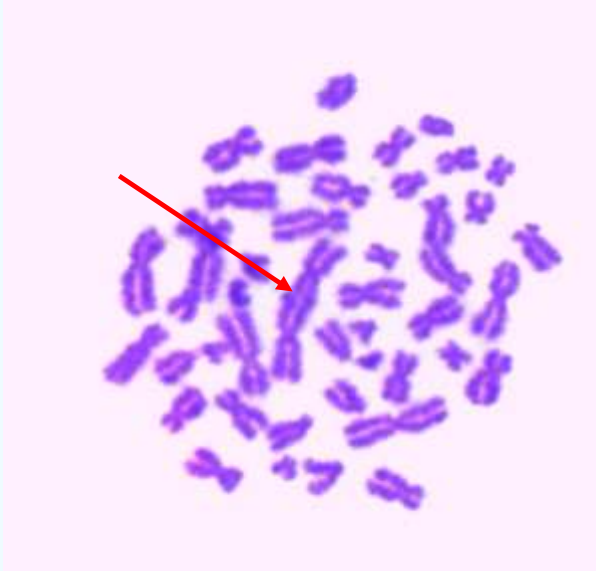
Exchange



Dicentrikus kromoszóma

Kromoszóma törés

Gyűrű kromoszóma



# A géntoxikológiai vizsgálatok jogszabályi alapjai

Magyarországon a rákveszélyes anyagokat felhasználó munkahelyek esetén a kémiai biztonságról szóló **2000 évi XXV. törvény**, továbbá az egészségügyi miniszter **26/2000 (IX.30.) EüM rendelete** a foglalkozási eredetű rákkeltő anyagok elleni védekezésről és az általuk okozott egészségkárosodások megelőzéséről rendelkezik.

Az utóbbi, daganatkeltőkkel történő munkavégzés esetén előírja a munkáltató részéről a kockázatbecslés elvégztetését, és ehhez ajánlja a citogenetikai módszereket.



# Kockázatbecslés

- Veszély azonosítás
- Dózis - hatás összefüggések
- Expozíció becslés
- Kockázat jellemzés
- Kockázat kezelés
- Kockázat kommunikáció

# Mikor van szükség a géntoxikológiai monitorra ?

1. Rákkeltő anyagokkal foglalkoztatott munkavállalóknál
2. Munkavégzés során elszenvedett radioaktív vagy vegyi baleseti helyzetben, a késői toxikus hatások elemzéséhez
3. Ha valamely betegség kialakulásában felmerül a mutagén/karcinogén ártalom szerepe
4. A környezeti ártalom fokozódásával ill. kiiktatásával összefüggően, a genetikai állományban kialakult változások (késői toxikus következmények) kimutatására
5. Daganatos betegeknél, ahol citosztatikus, immunszuppresszív vagy sugár terápia következményeként második betegség kialakulásától lehet tartani
6. Minden olyan esetben, amikor korai daganatos tünetek és/vagy onkogén expresszió jelentkezik

# Módszerek

## Részletes anamnézis felvétel és klinikai laboratóriumi vizsgálatok

Vizsgálati minta: venipunkcióval nyert leukociták

### Géntoxikológiai végpontok (Genotípus módosulások):

- Szerkezeti és számbeli kromoszóma aberrációk (CA)
- UV-indukált unscheduled DNS szintézis (UDS)
- Egysejtes gélelektroforézis (COMET)
- Sister-chromatid exchange (SCE)\*
- H(G)PRT gén single nukleotid polimorfizmus (Vf)\* (\*korábban)

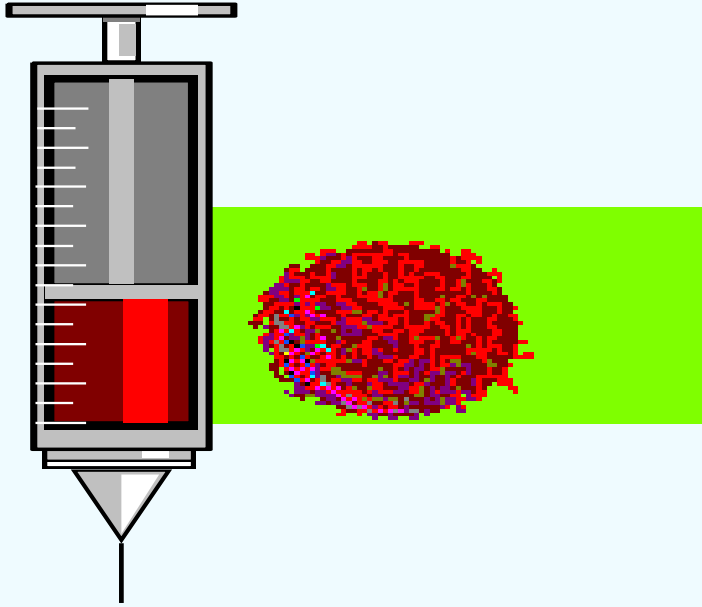
### Immuntoxikológiai végpontok (Fenotípus módosulások):

- Limfocita szubpopulációk aránya (T, Th, Tc, Th/Tc, B, NK)
- Aktivációs markerek (CD25+, CD71+)
- Leukociták ölképességének vizsgálata  
(reaktív oxigén-intermedier termelés mérése)

### Apoptózis és sejtproliferáció mérése áramlási citometriával

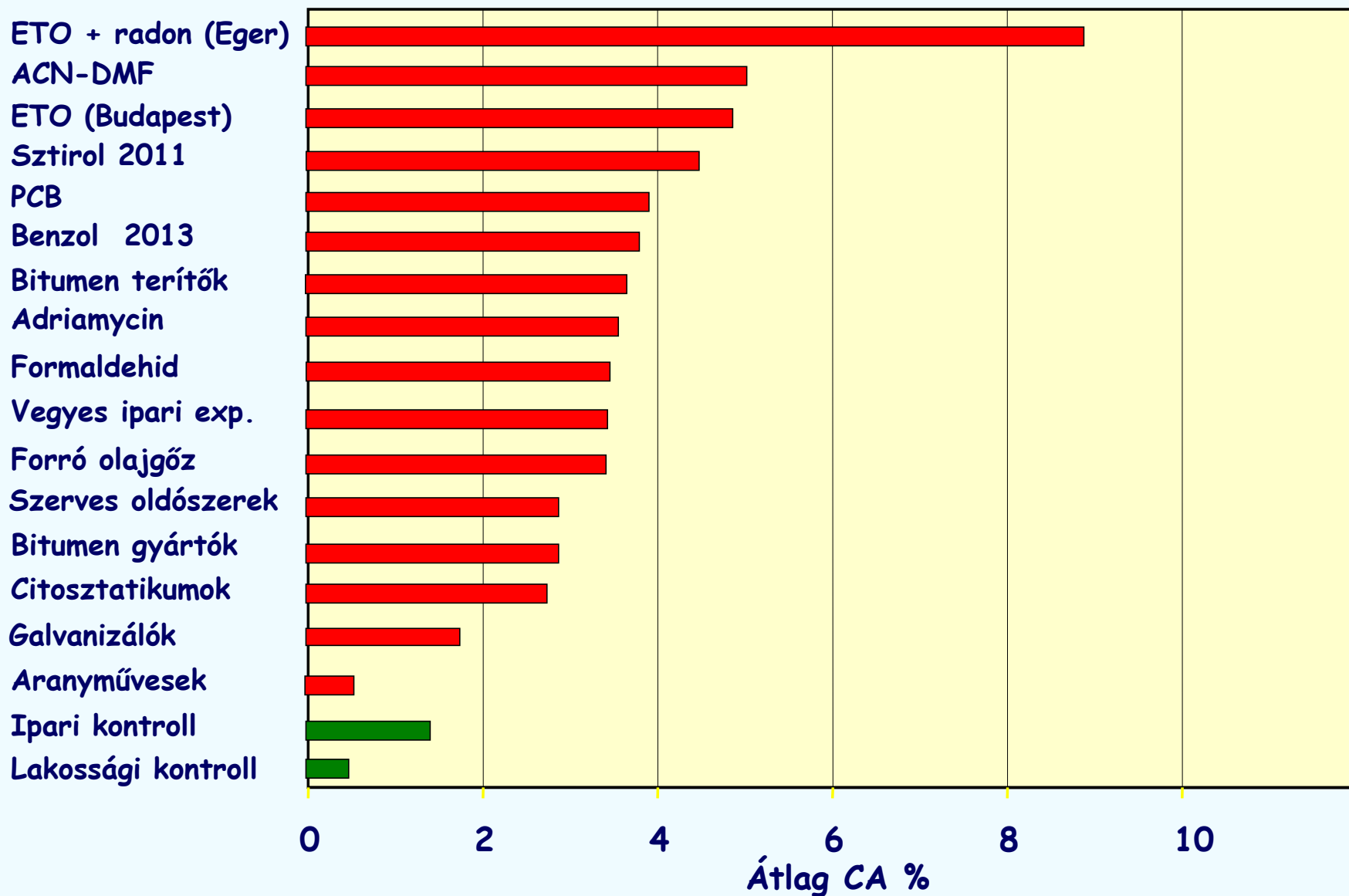


# Limfocita minta előnyei:

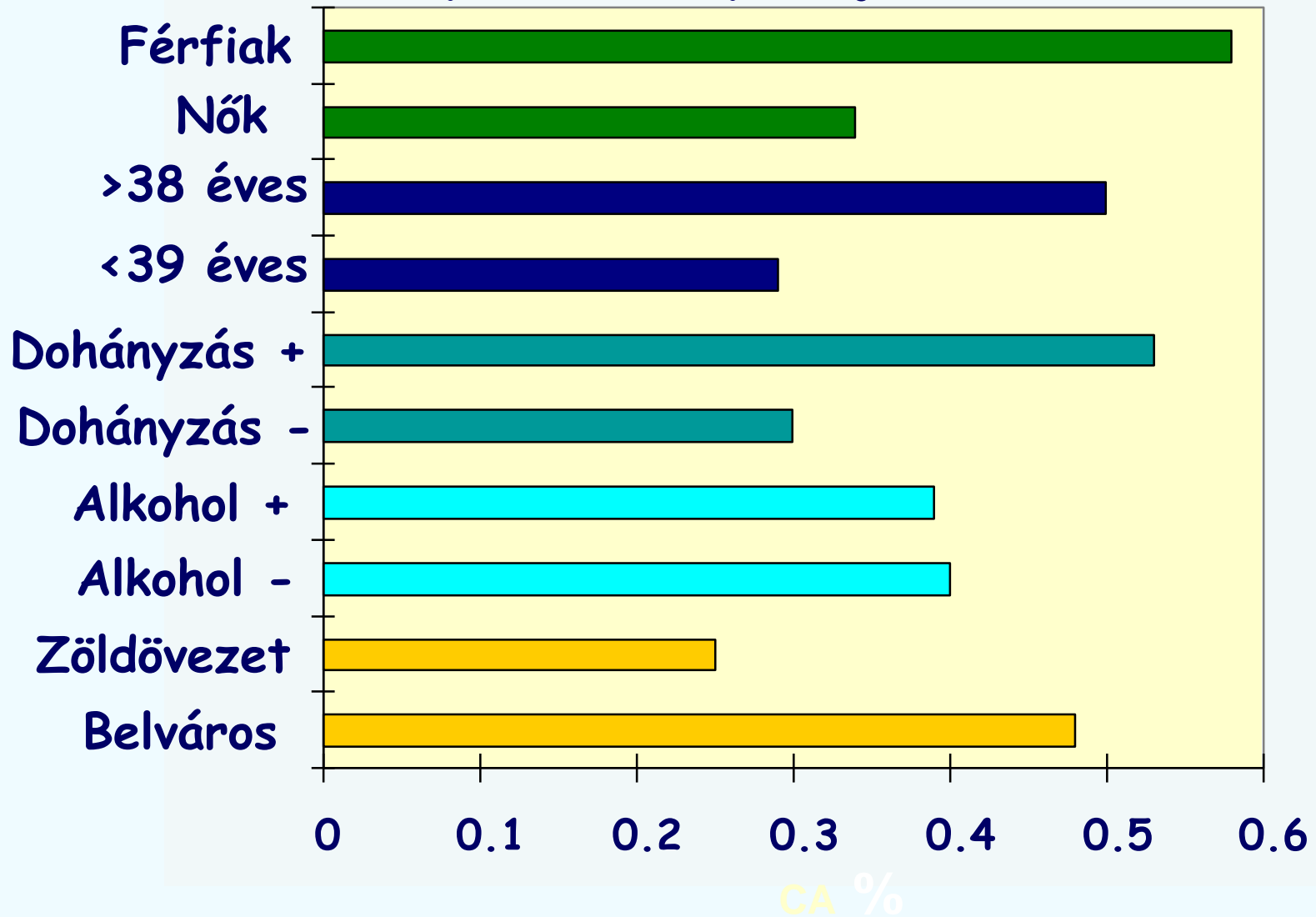


- *könnyen nyerhető*
- *a limfociták az egész test expozícióját reprezentálják*
- *hosszú életidejűek*
- *a tenyésztés egyszerű*
- *humánspecifikus*

# A kromoszóma aberrációk (CA) gyakorisága a vizsgált kontroll és ipari exponált csoportokban



# Kromoszóma aberrációk gyakorisága a történeti kontrollok nem, életkor és életvitel szerint képzett csoportjaiban

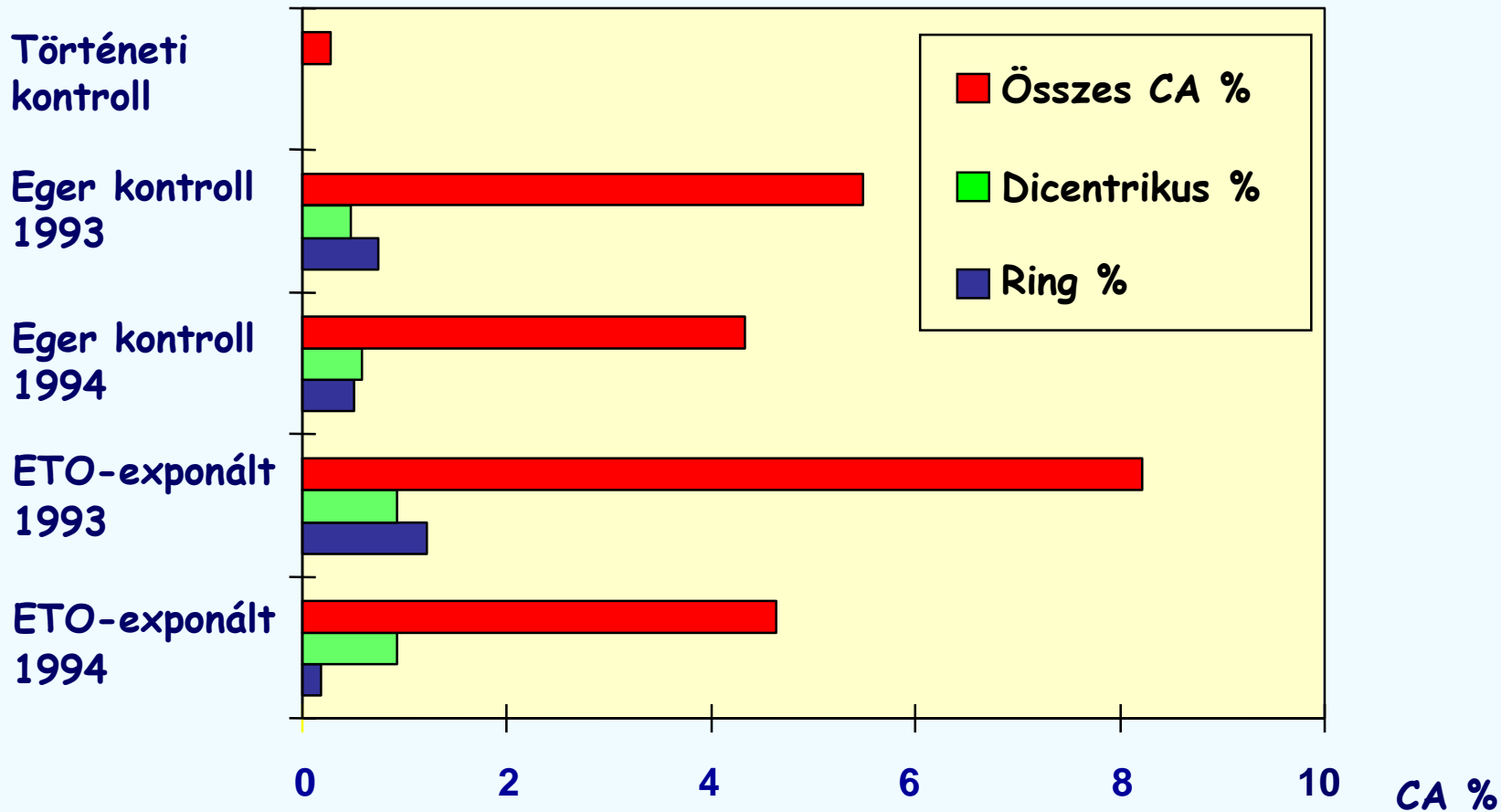


# Daganat előfordulások az egri megyei kórház etilénoxid-exponált dolgozói körében (1993)

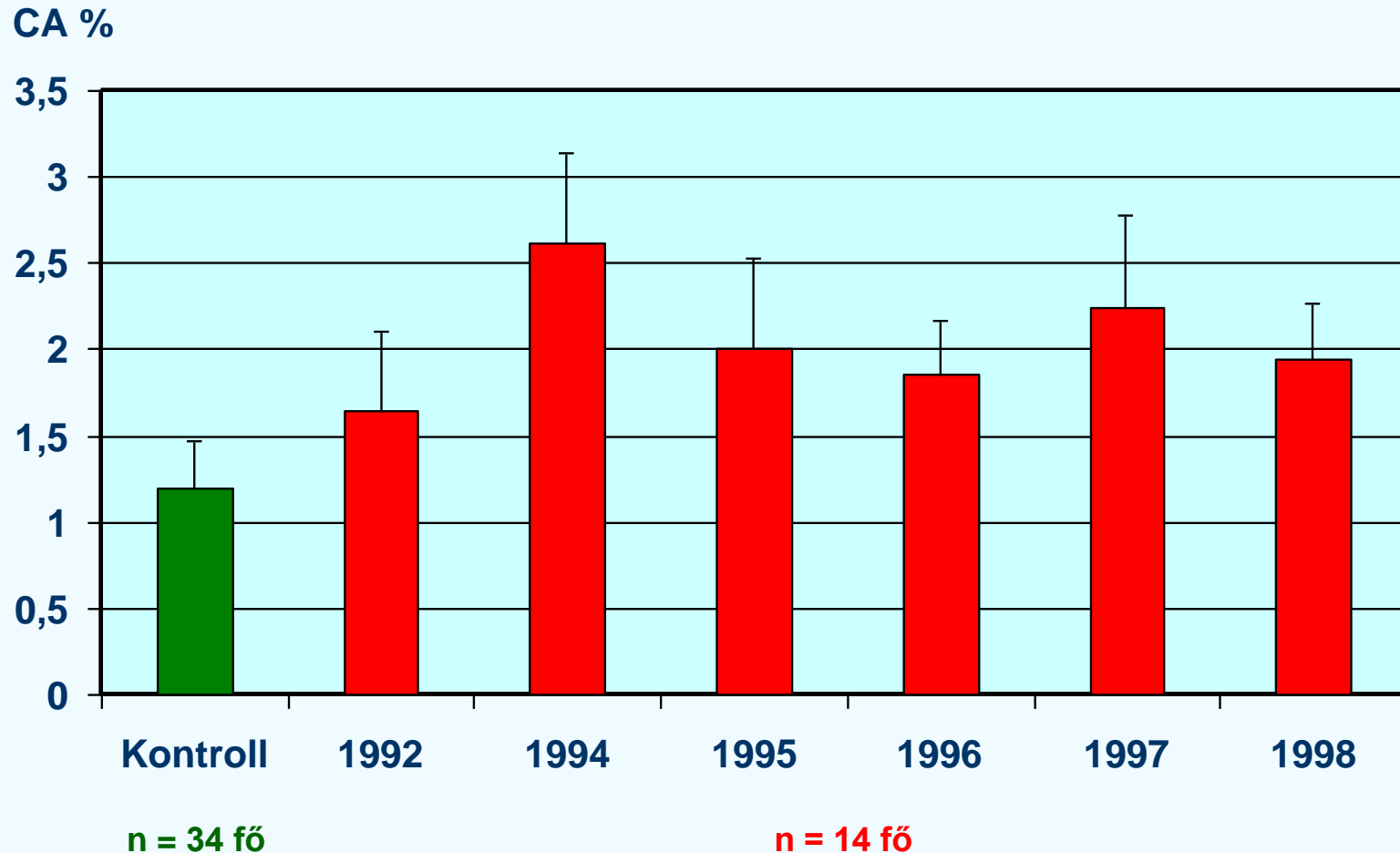
Csoport	Tumorok	Emlő	Méh és petefészek	Pajzsmirigy	Idegrendszeri	Egyéb
Nem exponált n = 94	Rosszindulatú	1	0	0	0	0
	Jóindulatú	0	2	0	0	0
Exponált n = 34	Rosszindulatú	8	3	2	1	2
	Jóindulatú	5	8	4	0	1

(ÁNTSZ adat)

# Kromoszóma aberrációk gyakorisága (CA %) etilénoxid+radon exponált nővérek limfocitáiban



# Egy hematológiai osztály citosztatikum infúziót preparáló dolgozóinak követéses vizsgálata (CA gyakoriság, %)



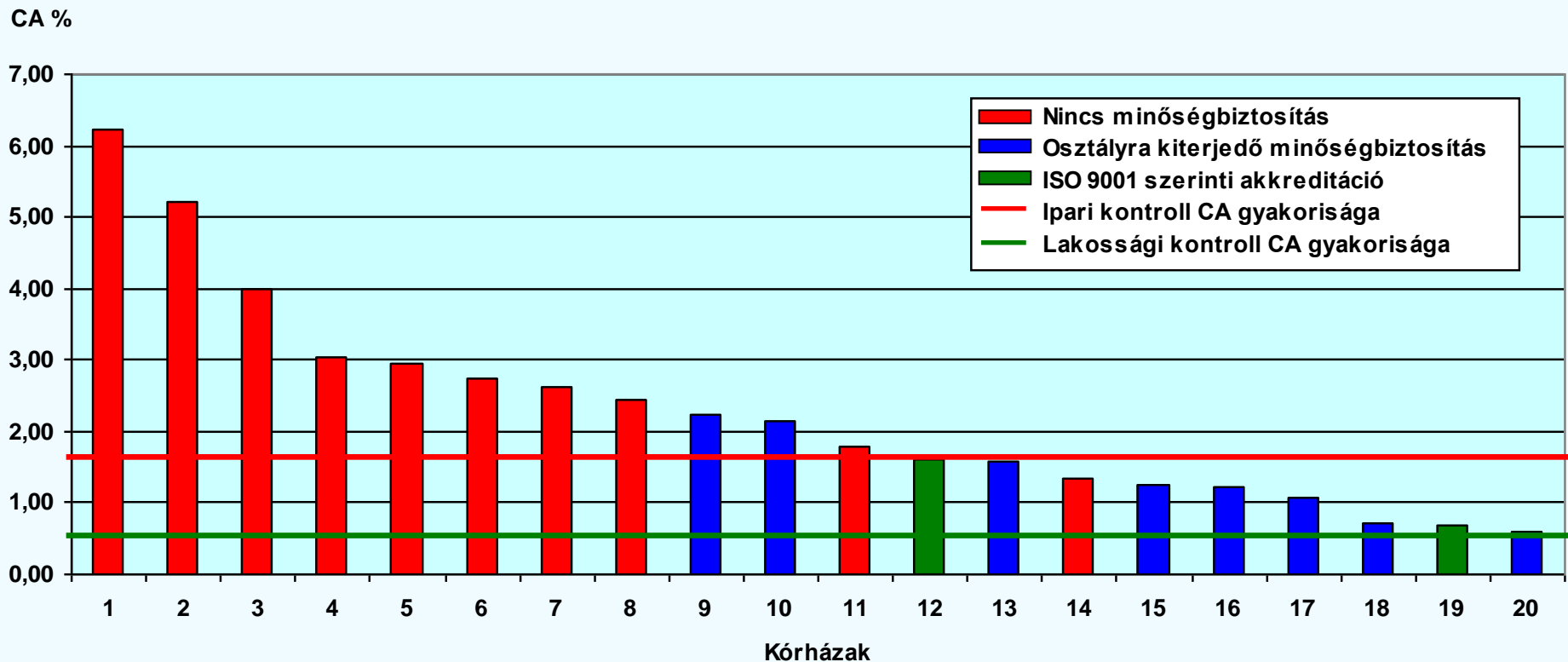
# A kontroll és citosztatikumokkal exponált kórházi dolgozók demográfiai adatai

Vizsgálati csoportok		n	Átlagéletkor (év ± SE)	Dohányzik <sup>a</sup> %	Alkoholt fogyaszt <sup>b</sup> %
Nem exponált (női) kontroll	—	94	39,9 ± 1,4	26,6	36,2
Citosztatikum exponáltak	Védelem nélkül	339	34,2 ± 0,6	43,9	38,4
	Védelem mellett	147	33,2 ± 0,7	43,5	49,0
	ISO szabvány szerint	14	28,9 ± 2,1	42,9	85,7

<sup>a</sup> aktív dohányzó

<sup>b</sup> kevesebb mint 80g tiszta alkohol

# Citosztatikumokkal foglalkozók vizsgálata kórházak és a minőségbiztosítási előírások megléte szerint (CA gyakoriság, %)



Minőségbiztosítás: legalább osztályra kiterjedő utasítás a biztonsági előírásokról, és a megfelelő védőeszközökről.



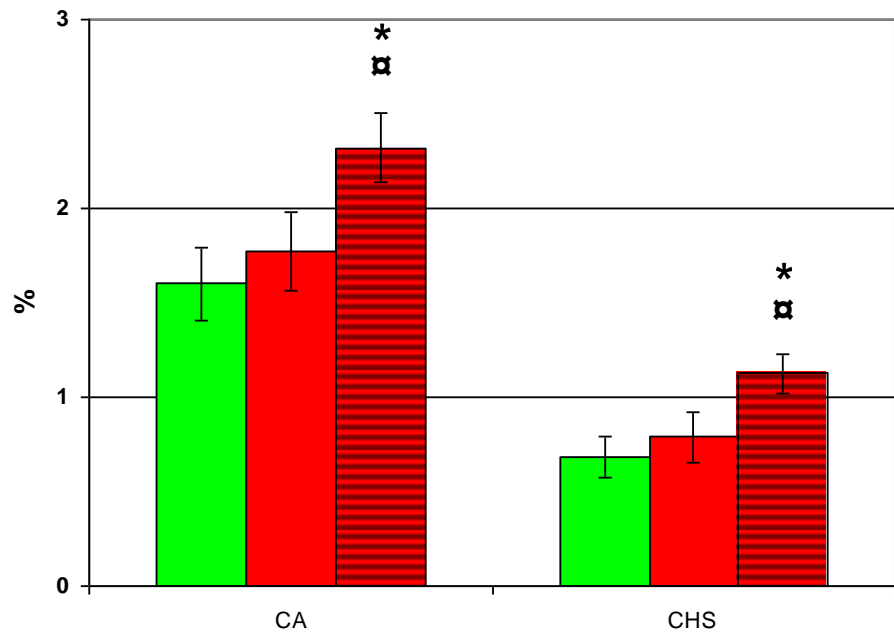
# A fontosabb megbetegedések gyakorisága (%) és relatív kockázata (RR) a citosztatikumokkal exponáltak körében

Paraméter	Nem exponált	Citosztatikumok	
	%	%	RR
Szérum glukóz szint emelkedés	21,3	33,8	(1,6)
Anémia	8,5	11,8	(1,4)
Metabolikus X szindróma	17,0	20,0	(1,2)
Pajzsmirigy	1,1	10,2	(8,4)
Emlő + petefészek cc	0,0	0,6	(0,6)
Mióma	1,1	4,0	(3,6)
Egyéb jóindulatú tumor	0,0	8,4	-
Allergiák	45,7	35,2	(0,8)

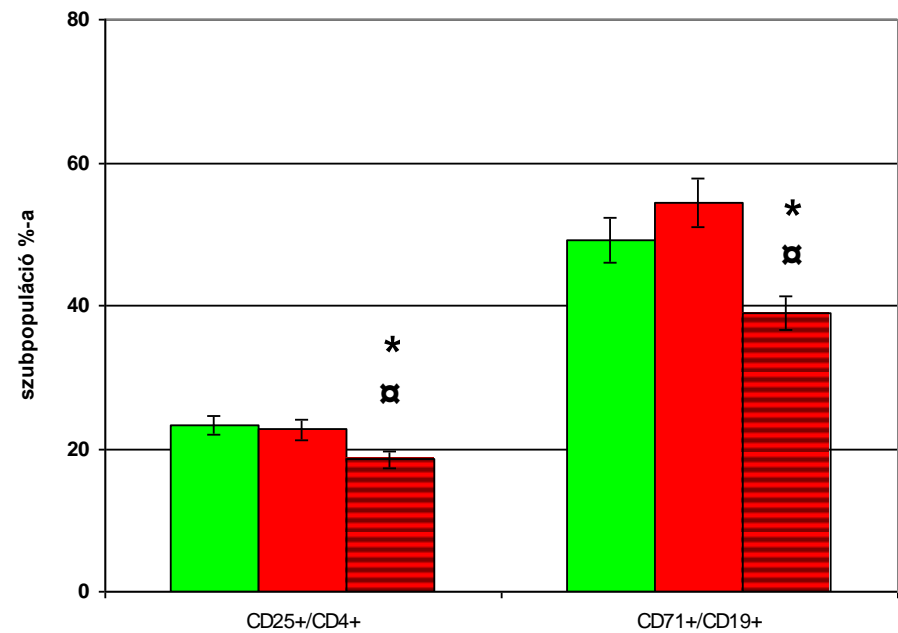
# A minőségbiztosítás szerepe a prevencióban

## Citosztatikum exponáltak

### Kromoszóma aberrációk



### Aktivációs antigének



\* Statisztikailag szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest

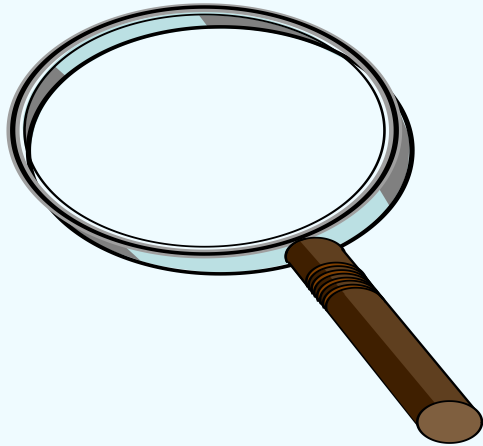
✘ Statisztikailag szignifikáns eltérés a minőségbiztosítás mellett dolgozók csoportjához képest

# Következtetések

- A géntoxikológiai és immuntoxikológiai vizsgálatok, részletes anamnesztikus és klinikai háttér együttes alkalmazásával **pontos képet adnak** a kémiai kóroki tényezők hatására kialakuló egészségkárosodás kockázatáról.
- A bemutatott vizsgálatok alkalmazhatók a **kombinált kémiai expozíciók** kockázatbecslésében is.
- A géntoxikus hatások szerepet játszhatnak az **endokrin eltérések kialakulásában** is.
- A **követéses vizsgálatok** egyfelől pontosabb képet adnak az expozíció változásairól, mint a pilóta vizsgálatok, másrészt a kockázatkezelés hatékonyságát is képesek igazolni.
- A kémiai biztonsági (ill. minőségbiztosítási) **előírások megléte és tudatos betartása védelmet jelent** az egészségkárosító kémiai expozíciók ellen.

# Összefoglalás

- A környezeti mutagének expozíciójának kimutatására legalább négy citogenetikai végpont használendő



- Eredményeink alapján elegendő adat bizonyítja azt, hogy a monitor alkalmas a géntoxikus károsodások és a hatásos kockázatkezelés kimutatására

**KÖSZÖNÖM A MEGTISZTELŐ FIGYELMET!**