

# TOKSYKOGENOMIKA W OCENIE ZAGROŻEŃ SUBSTANCJI CHEMICZNYCH

## TOXICOGENOMICS IN HAZARD ASSESSMENT OF CHEMICALS

Grażyna Kostka, Monika Liszewska, Katarzyna Urbanek-Olejnik

Zakład Toksykologii Środowiskowej  
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny, Warszawa

**Słowa kluczowe:** *transkryptomika, proteomika, metabolomika, ekspresja genów*

**Key words:** *transcriptomics, proteomics, metabolomics, gene expression*

### STRESZCZENIE

Zmiany jakie dokonały się w ostatnich latach w Europejskiej legislacji substancji chemicznych wskazują na pilną potrzebę wprowadzania nowych, alternatywnych metod badania substancji chemicznych. Możliwości takie stwarza toksykogenomika, dziedzina nauki łącząca wiedzę z zakresu toksykologii, nauki zajmującej się badaniem właściwości czynników toksycznych i negatywnymi skutkami ich oddziaływania na zdrowie i środowisko z genomiką, nauką o budowie i funkcjonowaniu genomów. Nowe strategie badawcze w toksykologii (transkryptomika, proteomika, metabolomika) stwarzają warunki do oceny zagrożeń związanych z oddziaływaniem substancji chemicznych zarówno o uznanym potencjale toksycznym jak również tych, które mogą posiadać taki potencjał.

### ABSTRACT

Recent changes in the European legislation of chemicals suggest an urgent need for introduction of novel, alternative methods for testing chemical substances. Such possibility is offered by toxicogenomics – a scientific discipline combining knowledge from the field of toxicology, i.e. a science investigating the properties of toxic agents and the negative effects these agents exert on health and environment, with genomics, i.e. a science investigating the structure and function of genomes. New research strategies within the field of toxicology (transcriptomics, proteomics, metabolomics) offer conditions to assess the hazards associated with the effects of chemicals with both established and suspected toxic potentials.

### WSTĘP

Efektom poznania ludzkiego genomu (Human Genome Project, 2004) była nie tylko wiedza o całkowitej sekwencji informacji genetycznej zawartej w DNA, ale również rozwój nowych technologii, w tym narzędzi badawczych, które znalazły zastosowanie w wielu dyscyplinach naukowych, w tym w toksykologii (toksykogenomika). Technologie te umożliwiają określenie zmian, wywoływanych czynnikami chemicznymi, na poziomie genomu komórkowego, związanych z ekspresją określonych genów lub całych zespołów genów. Informacje te w połączeniu z referencyjnymi danymi toksykologicznymi stanowią podstawę do zrozumienia mechanizmów toksycznego, w tym rakotwórczego działania substancji chemicznych. Toksykogenomika

stwarza również możliwości szybkiej i właściwej klasyfikacji związków rakotwórczych, uwzględniającej ich mechanizmy działania (genotoksyczne *versus* epigenetyczne), w porównaniu do konwencjonalnych technik. Dane literaturowe wskazują również na możliwość wykorzystania analizy zmian profilu ekspresji genów (na poziomie m-RNA i białek) w procedurze oceny ryzyka poprzez opracowanie nowych modeli predykcyjnych i zastosowaniu molekularnych biomarkerów.

W ostatnich latach liczne międzynarodowe inicjatywy zostały podjęte dla zdefiniowania strategii rozwoju i możliwości zastosowania toksykogenomiki w ocenie zagrożeń substancji chemicznych, tj. szkodliwych skutków, swoistych dla danej substancji chemicznej.

**Adres do korespondencji:** Grażyna Kostka, Zakład Toksykologii Środowiskowej,  
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny, 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, tel. 48 22 54 21,  
fax 48 22 54 21, e-mail: gkostka@pzh.gov.pl

## TOKSYKOGENOMIKA – STRATEGICZNA DYSCYPLINA NAUKOWA

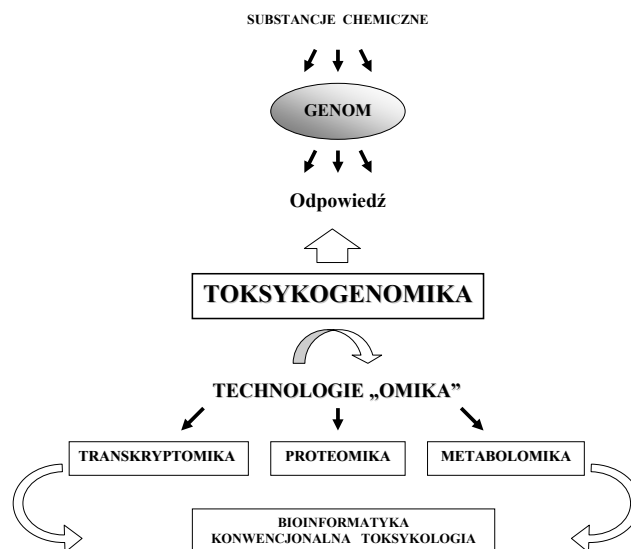
Nalożony przez rozporządzenie w sprawie REACH\* obowiązek poddania ocenie toksykologicznej ponad 30 tysięcy substancji chemicznych obecnych na rynku europejskim [36] wiąże się z koniecznością przeprowadzenia ogromnej liczby badań, wykorzystania wielu milionów zwierząt laboratoryjnych oraz przeznaczenia wielomilionowych funduszy. Według danych EC [43], wprowadzenie alternatywnych badań może zmniejszyć wykorzystanie zwierząt o 1,3-1,9 milionów i obniżyć koszt badań o 800-1130 milionów euro.

Co więcej, każdego roku w Europie, liczba zwierząt kręgowych, wykorzystywanych do badań wynosi ok. 10 milionów [12], a koszt badań szacowany jest na 2,5-6,5 miliarda euro. Dlatego coraz więcej uwagi poświęca się propagowaniu metod alternatywnych.

Aktualnie dostępne i zwalidowane alternatywne metody mogą być stosowane w badaniach ostrej i krótkoterminowej toksyczności. Przykładem stanowią testy *in vitro* dla badania działania żrącego na skórę, tj. test przezskórnej oporności elektrycznej (TER) z użyciem skóry szczura (OECD TG 430) oraz test wykorzystujący model ludzkiej skóry (OECD TG 431). Innym przykładem testu alternatywnego zaakceptowanego przez ECVAM (*European Centre for Validation of Alternative Methods*) i znajdującym się w ustawodawstwie Unii Europejskiej, jest test przesiewowy do oceny działania uczulającego na myszach (OECD TG 429). Jednak badania przewlekłej toksyczności, włączając rakotwórczość, nie są aktualnie możliwe przy wykorzystaniu strategii alternatywnych metod. Szczególnym problemem w ocenie zagrożeń, jakie stwarzają substancje rakotwórcze jest brak aktualnie szybkich metod skринingowych (przesiewowych) dla potencjalnych substancji rakotwórczych, które działają poprzez mechanizmy epigenetyczne, a które to mechanizmy, zgodnie z aktualną wiedzą na temat rozwoju procesu nowotworowego odgrywają w nim istotną rolę [4, 15, 18]. Potencjalne możliwości w rozwiązaniu tych problemów stwarza relatywnie nowa dyscyplina naukowa, jaką jest toksykogenomika, która umożliwia poznanie oddziaływań substancji toksycznych na poziomie molekularnym z wykorzystaniem najnowszych osiągnięć biologii molekularnej, klasycznej toksykologii oraz bioinformatyki.

Toksykogenomika definiowana jest, jako nauka, która bada odpowiedź genomu na działanie toksycznych substancji, przy wykorzystaniu technologii określanych

terminem „omika”, transkryptomiki, proteomiki i metabolomiki [29, 33].



Ryc. 1. Toksykogenomika jako zintegrowana nauka badająca odpowiedź genomu na działanie substancji chemicznych  
Toxicogenomics as a science integrated investigating of the response of a genome to chemicals

Transkryptomika, to globalna analiza, w danej tkance ekspresji genów na poziomie mRNA, pozwalająca na identyfikację genów w określonym czasie, tych aktywnych i/lub wyciszonych przy zastosowaniu mikromacierzy: cDNA (komplementarnego DNA) lub oligonukleotydowych [44]. Systemową analizę jakościową i ilościową białek, produktów ekspresji genów umożliwia proteomika, dysponująca wieloma technikami [28, 44], które wynikają z modyfikacji i unowocześnień technik podstawowych takich jak: dwukierunkowa elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (2DE) i spektrometria mas (MS). Natomiast metabolomika pozwala na identyfikację jakościową i ilościową wszystkich metabolitów, jako wtórnych i końcowych produktów ekspresji genów jednego lub wielu szlaków metabolicznych, definiujące fenotyp biochemiczny komórki, tkanki i organizmu [14, 37]. Jej podstawowymi narzędziami jest chromatografia gazowa w połączeniu ze spektrometrią mas (GC/MS), magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) czy też wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC). Dla właściwej interpretacji uzyskanych informacji przy wykorzystaniu technologii „omika” niezbędna jest jeszcze dziedzina wiedzy, jaką jest bioinformatyka, która nie tylko analizuje uzyskane informacje biologiczne, ale również je wizualizuje w formie umożliwiającej ich interpretację. Tak więc, badania z zakresu transkryptomiki, proteomiki i metabolomiki w połączeniu z klasyczną toksykologią i bioinformatyką, stanowiąc mogą zintegrowaną formę interdyscyplinarnej „systemomiki”,

\* Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady WE Nr 1907/2006 dotyczące bezpiecznego stosowania substancji chemicznych poprzez ich rejestrację, ocenę, udzielanie zezwoleń i stosowanych ograniczeń.

umożliwiającej zarówno poznanie jak i zrozumienie efektów biologicznych na poziomie molekularnym.

Zastosowanie technologii „omika” w toksykologii sprowadza się do założenia, że wszystkie istotne toksykologiczne efekty są związane ze zmianami w profilu ekspresji genów [28]. Oznacza to, że toksyczność może być charakteryzowana poprzez zmiany transkrypcyjne i translacyjne w połączeniu ze zmianami metabolizmu, a specyficzny profil zmian ekspresji („*fingerprint*”- „odcisk palca”) indukowany czynnikami toksycznymi będzie analogiczny dla związków charakteryzujących się podobnym mechanizmem działania (MOA, *mode of action*).

Postuluje się [9, 22], że nieprawidłowości na poziomie ekspresji genów, odzwierciedlające nieprawidłowości fenotypowe na poziomie komórki lub tkanki, mogą umożliwić identyfikację prognostycznych biomarkerów, które będzie można wykorzystać przy szacowaniu ryzyka zdrowotnego dla ludzi i środowiska.

## MIĘDZYNARODOWE INICJATYWY DLA ROZWOJU TOKSYKOGENOMIKI

Alternatywne metody testowania substancji chemicznych oznaczają badania toksykologiczne prowadzone *in vitro*, w których zwierzęta są zastąpione przez modele badawcze wykorzystujące kultury komórkowe, tkankowe, jak również zmodyfikowane badania *in vivo*, umożliwiające redukcję liczby zwierząt wykorzystywanych w badaniach. W ich zatwierdzeniu, wdrażaniu, walidacji, uznawaniu i propagowaniu na szczeblu międzynarodowym, kluczową rolę pełni OECD (*Organization for Economic Co-Operation and Development*), IPCS (*International Programme on Chemical Safety*), czy też CAAT (*Centre for Alternatives to Animal Testing*), które jest głównym ośrodkiem rozwoju metod alternatywnych, działającym ponad 20 lat w Stanach Zjednoczonych Ameryki. Unia Europejska odgrywa również wiodącą rolę w tych działaniach. Europejskie Centrum Walidacji Metod Alternatywnych (ECVAM) przy Wspólnym Centrum Badawczym Wspólnot Europejskich (JRC) prowadzi ścisłą współpracę z OECD, w zakresie rozwoju i walidacji metod alternatywnych. W ostatnich latach, podjęte zostały działania mające na celu ustalenie strategii rozwoju toksykogenomiki i ocenę możliwości jej zastosowania w badaniach toksykologicznych i ekotoksykologicznych. W latach 2003 i 2004 odbyły się dwa robocze spotkania ekspertów OECD i IPCS w Berlinie i Kyoto, na których omawiane były zagadnienia związane z potencjalnym wykorzystaniem technologii „omika” w ocenie zagrożeń zdrowia i środowiska. Jednocześnie zwrócono uwagę na istniejące aktualnie ograniczenia (natury biologicznej, technicznej i bioinformatycznej) ich zastosowania dla

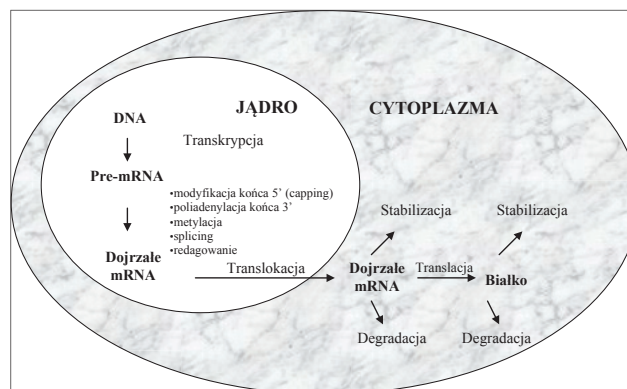
podjęcia regulacyjnych decyzji, pomimo niezmiernie intensywnego rozwoju i ciągłego udoskonalania narzędzi badawczych stosowanych w toksykogenomice.

Zdefiniowane na spotkaniach w Berlinie i Kyoto działania OECD i IPCS [29], zmierzające do zastosowania toksykogenomiki w ocenie zagrożeń, jako elementu oceny ryzyka dla zdrowia wynikającego z oddziaływania substancji chemicznych, obejmują trzy główne obszary: 1) wykorzystania toksykogenomiki w molekularnym skriningu, 2) wykorzystania toksykogenomiki do identyfikacji nowych biomarkerów oraz 3) oceny technologii „omika” w kontekście ich zastosowania w analizie toksykologicznej.

W 2007 roku OECD zainicjowała realizację projektu „Molecular Screening for Characterizing Individual Chemicals and Chemical Categories” koordynowanego przez USA oraz nadzorowanego przez Komitet Doradczy OECD/IPCS ds. Toksykogenomiki. W tym samym roku Agencja Ochrony Środowiska USA (US EPA) rozpoczęła program badawczy „Developing Predictive Signatures for Chemical Toxicity”, którego podstawowym celem jest rozwój metod (wykorzystujących m.in. profil genomowy i metabolomowy) do testowania i skriningu substancji chemicznych. Również realizowany przez Wspólne Centrum Badawcze 7 program ramowy Wspólnoty Europejskiej (2007-2013) w dziedzinie badań i rozwoju technologicznego, do priorytetowych zagadnień zalicza opracowywanie metod badawczych wykorzystujących toksykogenomikę, celem ograniczenia badań na zwierzętach.

## EKSPRESJA GENÓW - PREDYKTYWNY PARAMETR TOKSYCZNOŚCI

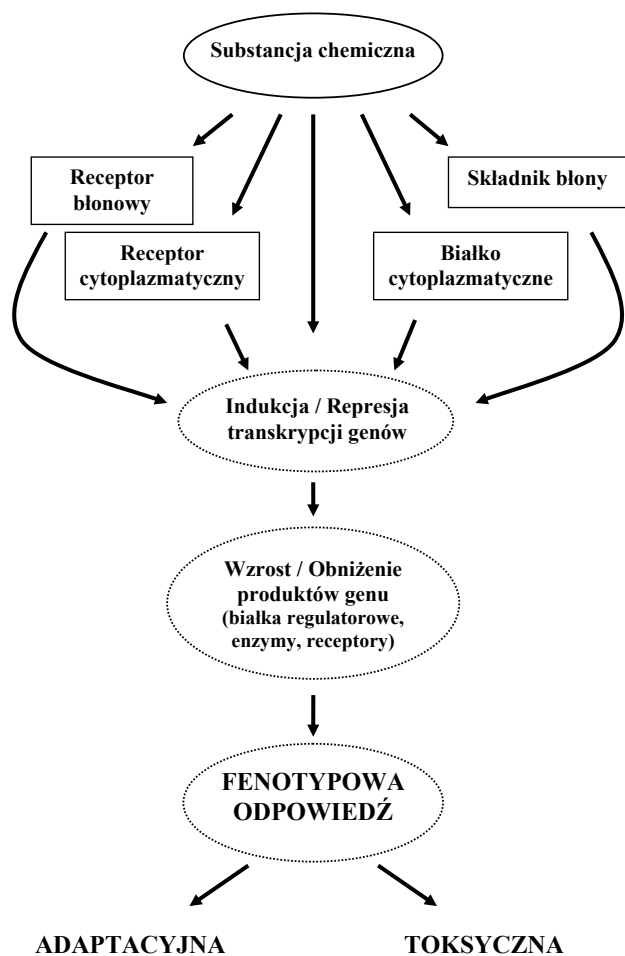
Aby komórka mogła wykorzystać informację genetyczną zawartą w DNA, ekspresja genów, z których każdy jest nośnikiem określonej informacji, musi



Ryc. 2 Schemat przedstawiający etapy regulacji ekspresji genów [wg 23].  
Scheme introduced of gene expression regulation [from ref. 23].

zachodzić w skoordynowany, podlegający regulacji sposób. Dla większości genów, o ile nie dla wszystkich, regulacja ekspresji odbywa się na etapie transkrypcji, modyfikacji pierwotnego transkryptu, translacji i modyfikacji produktu białkowego [17].

Co więcej, poszczególne etapy tej regulacji odbywają się w różnych przedziałach komórkowych, tj. w jądrze komórkowym i cytoplazmie, co również daje dodatkowe możliwości regulacyjne, np. warunkiem transportu mRNA z jądra do cytoplazmy jest prawidłowe uformowanie końca 3' pierwotnego transkryptu [23]. Każdy z etapów regulacji ekspresji genów zdeterminowany jest znaczną ilością powiązanych ze sobą układów kontrolujących, a sygnały niezbędne dla tych procesów powstawać mogą wewnątrz komórki jak również mogą docierać ze środowiska zewnętrznego, oddziałując na DNA, RNA i białka. Zaburzenie prawidłowego funkcjonowania genów pod wpływem zarówno endo- jak i egzogennych czynników, stanowiące wykładnię zmian w ich ekspresji determinują



Ryc. 3 Komórkowa odpowiedź na substancje chemiczne i aktywność transkrypcyjna genów stanowiąca element tej odpowiedzi [wg 24]  
The cellular response to chemicals and gene transcriptional activity being just one component part [from ref. 24]

patologię komórki i w konsekwencji umożliwić mogą zdefiniowanie potencjalnych toksycznych następstw tych zmian. Oddziaływanie egzogennych czynników (ksenobiotyków; w tym środowiskowych czynników chemicznych) na aktywność transkrypcyjną genów należy rozważać, jako proces dynamiczny obejmujący biochemiczne/molekularne zdarzenia [24].

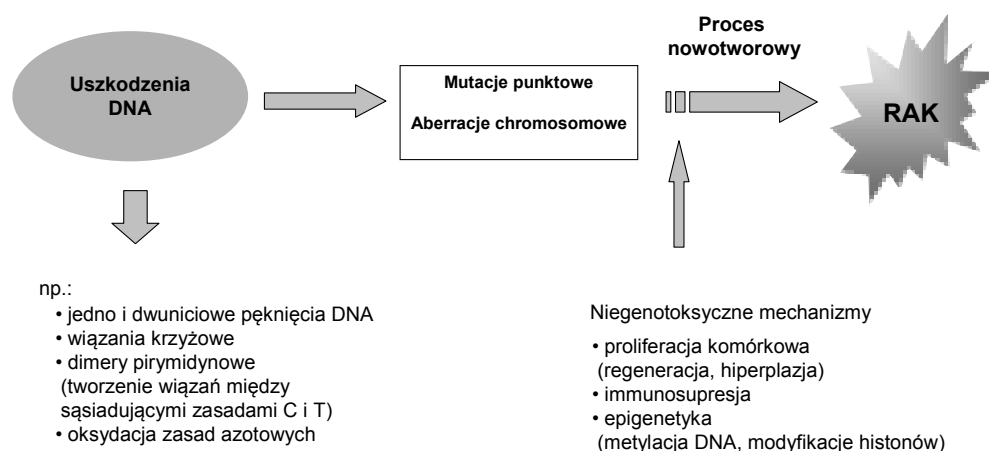
Uogólniając zagadnienie, droga zmiany ekspresji genów pod wpływem substancji chemicznej może zostać zainicjowana związaniem się substancji chemicznej z odpowiednim receptorem błony komórkowej, co uruchamia kaskadę przekazywania sygnału do jądra komórkowego i aktywację czynników transkrypcyjnych. Egzogenne substancje chemiczne mogą wywoływać zmiany aktywności genów również na drodze aktywacji wewnątrzkomórkowych białek receptorowych, takich jak konstytutywny receptor androstanu, CAR (*constitutive androstane receptor*) czy też receptory PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*). Na przykład fenobarbital (PB), niegenotoksyczny związek o udowodnionym działaniu rakotwórczym dla gryzoni, ułatwia translokację CAR z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie w formie heterodimeru z receptorem retinoidu X (CAR/RXR) rozpoznaje odpowiednią sekwencję odpowiedzi w DNA (PBRE, *phenobarbital-responsive element*), co prowadzi do wzmożonej transkrypcji CYPs [32]. Z kolei związki z grupy tzw. proliferatorów peroksysomów (PPs) poprzez interakcję z receptorem PPAR $\alpha$  (jedna z form molekularnych PPAR) wpływają na zmianę transkrypcji licznych genów związanych z metabolizmem oraz z proliferacją komórek i apoptozą [35]. Transkrypcyjna odpowiedź może również uwzględniać interakcje substancji chemicznych z niereceptorowymi komponentami komórkowymi (błonowymi i/lub wewnątrzkomórkowymi); w tym przypadku w wyniku sprzężenia zwrotnego oddziałują na jądro komórkowe indukując lub hamując transkrypcję określonych genów. Zmiany aktywności transkrypcyjnej genów przekładają się na modulowanie ich produktów białkowych, a efektem końcowym jest fenotypowa odpowiedź, która może mieć charakter adaptacyjny lub toksyczny [24]. Dlatego, pomimo istniejącego poglądu [27, 32], że zmiany w ekspresji genów odzwierciedlają każdy toksyczny efekt, ten postawiony znak równości nie wydaje się być tak jednoznaczny i bezwzględny. Zdefiniowanie, które zmiany ekspresji genów (określone w funkcji dawki i czasu) odzwierciedlają efekt toksyczny, a które adaptacyjny/kompensacyjny efekt, ma fundamentalne znaczenie. To rozróżnienie nie jest proste, jeżeli weźmie się pod uwagę, że adaptacyjny charakter zmian ekspresji genów wykrywany w badaniach krótkoterminowych i rozważany jako nietożsamy z toksycznością, w badaniach przewlekłych może okazać się determinantą efektu szkodliwego, przydatną w identyfikacji zagro-

zeń. Przykład stanowić może indukcja ekspresji genów cytochromu P450 (CYP).

## TOKSYKOGENOMIKA A CHEMICZNA KANCEROGENEZA

W procesie chemicznej kancerogenezy zarówno zmiany genetyczne jak i epigenetyczne odgrywają istotną rolę [18, 45]. Czynniki wykazujące potencjał kancerogeny indukować mogą obydwaj typy zmian; ich mechanizmy nie wykluczają się wzajemnie, ale wspólnie wpływają na rozwój procesu nowotworowego.

zane z bezpośrednimi uszkodzeniami DNA [10, 34]. Na przykład w badaniach znanych genotoksycznych hepatokancerogenów, N-nitrozodietylaminy (NDEA) i 1, 2 - dimetylohydrazyny (SDHM) wykazano, że związki te oprócz genotoksycznych efektów wywołują zmiany w metylacji DNA [30, 34]. Niegenotoksyczne kancerogeny (NGCs) działają poprzez mechanizmy, wykluczające mutacyjne uszkodzenia DNA komórek (mechanizmy epigenetyczne). W docelowych komórkach wywołują efekty biologiczne, które pośrednio prowadzić mogą do transformacji nowotworowej albo stymulują rozwój nowotworu już z zainicjowanych komórek [11, 45]. Zróżnicowane mechanizmy działania



Ryc. 4 Chemiczna kancerogeneza – wieloetapowy proces uwzględniający zarówno genotoksyczne i niegenotoksyczne zdarzenia. Zmodyfikowany wg [ 9 ]  
Chemical carcinogenesis – a multi-step process regarding both genotoxic and non-genotoxic events. Modified from ref.[ 9].

Inicjację procesu chemicznej kancerogenezy rozpatrywać należy na poziomie pojedynczej komórki, w której nastąpiła kumulacja błędów genetycznych. Zmieniona genetycznie komórka (komórka zainicjowana) przejawia potencjalną zdolność do trwałej ekspresji fenotypu nowotworowego pod warunkiem utrwalenia tych zmian, co wymaga jednej lub więcej rund cyklu komórkowego. Zarówno zwiększona proliferacja komórkowa jak i supresja apoptozy prowadzić mogą do klonalnej ekspansji zainicjowanych komórek [38]. W tym kontekście chemiczne kancerogeny są klasyfikowane, jako: genotoksyczne i niegenotoksyczne [11]. Jednak ten prosty system klasyfikacji związków rakotwórczych jest aktualnie kwestionowany, zwłaszcza w aspekcie oceny ryzyka [2]. Genotoksyczne związki rakotwórcze (GCs) wykazujące zdolność kowalencyjnego wiązania się do miejsc nukleofilowych obecnych w zasadach purynowych i pirymidynowych DNA, tworząc addukty z DNA powodują uszkodzenia materiału genetycznego komórek ujawniane, jako mutacje genowe i chromosomowe. Należy jednak podkreślić, że związki te mogą również działać poprzez mechanizmy niezwią-

NGCs obejmują między innymi, tworzenie reaktywnych form tlenu (ROS) uszkodzających DNA, lipidy i białka [2, 11]. Bezpośrednie albo w wyniku oddziaływania produktów peroksydacji lipidów, tlenowe uszkodzenia DNA mogą uczestniczyć w inicjacji kancerogenezy. Z kolei, tlenowe uszkodzenia białek mogą zmieniać ścieżki sygnałowe, np. regulacji czynników transkrypcyjnych i kaskady kinaz, co w konsekwencji prowadzić może do zaburzenia ekspresji genów i wzrostu proliferacji komórkowej oraz zahamowania apoptozy. Brak równowagi pomiędzy replikacją i śmiercią komórek determinuje zaburzenie homeostazy komórkowej [15, 38], której konsekwencją może być transformacja nowotworowa.

Wprowadzenie krótkoterminowych testów *in vitro* i *in vivo* do wykrywania uszkodzeń genetycznych, rozwiązało częściowo problem wstępnej i szybkiej oceny potencjału rakotwórczego substancji chemicznych. Jednak żadna z obecnych znanych metod oceny genotoksyczności substancji chemicznych (*in vitro* oraz *in vivo*), nie spełnia warunków idealnego systemu badawczego i nie może zastąpić długookresowych badań

rakotwórczości z zastosowaniem modeli zwierzęcych. Podkreśla się [42] trudności i ograniczenia przy ekstrapolacji pozytywnych wyników testów genotoksycznych na ryzyko nowotworowe ponieważ zastosowane w nich modele doświadczalne jak i warunki badania są zbyt wyspecjalizowane pod kątem czułości, szczególnie dotyczy to testów *in vitro*, docelowe geny/chromosomy w nich badane nie odpowiadają docelowym genom/chromosomom biorącym udział w procesie kancerogenezy. Ponadto, wykrywane w testach uszkodzenia DNA, w warunkach fizjologicznych mogą być naprawiane, a komórki z uszkodzeniami DNA usuwane na drodze martwicy i/lub apoptozy. I aczkolwiek związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy uszkodzeniem DNA i rozwojem nowotworu jest dobrze udokumentowany, to jednak zastosowana w badaniach [19] bateria trzech testów *in vitro* (test Ames, mikrojądrowy oraz test na aberracje chromosomowe), jako różnicujący wskaźnik dla związków rakotwórczych v. nierakotwórczych, nie spełniła oczekiwań. Wykazane liczne fałszywie pozytywne wyniki wskazują na niską specyficzność zastosowanych testów w tym zakresie. Do chwili obecnej, mimo licznych prób [1, 32], wytypowanie wczesnych wskaźników służących, jako testy do identyfikacji i oceny oddziaływania NGCs, pozostaje nadal problemem otwartym. Dlatego, jak dotąd standardem z wyboru do identyfikacji związków rakotwórczych są 2-letnie badania przeprowadzane na zwierzętach laboratoryjnych.

Zastosowanie toksykogenomiki w badaniach związków rakotwórczych, nie tylko stwarza możliwości dogłębnego poznania mechanizmów ich działania, ale również stanowić może podstawę dla wczesnej oceny potencjału kancerogenego czynników chemicznych o epigenetycznych mechanizmach działania [3, 5, 33]. Wyniki badań z tego zakresu wskazują na realność tych założeń.

Nie i wsp. [25] stosując technikę mikromacierzy cDNA, wyselekcjonowali geny, których profil ekspresji ulegał zmianie w wątrobie szczurów, narażonych na pojedynczą dawkę 24 NGCs w porównaniu do 28 nierakotwórczych związków (NCs). Spośród aktywowanych genów w wyniku oddziaływania NGCs, 50% związana była z protoonkogenem *c-myc*, którego aktywacja w wyniku mutacji lub nadekspresja prowadzi do dysregulacji cyklu komórkowego [9]. Białko *myc* jest mitogennym czynnikiem transkrypcyjnym aktywującym geny cyklin i kinaz cyklicznych (CDKs), które inicjują i uczestniczą w progresji cyklu komórkowego [20]. Stwierdzono blisko 90% dokładność analizy profilu ekspresji genów z klasyfikacją przebadanych związków. Thomas et al. [41] porównali profil ekspresji genów komórek płuc myszy B6C3F1, którym podawano drogą pokarmową albo w diecie przez okres 13 tygodni rakotwórcze związki (różniące się strukturą chemiczną, potencjałem genotoksycznym oraz mechanizmem

działania), z ekspresją genów myszy narażonych na NCs. Zidentyfikowano 6 genów (kodujące enzymy biorące udział w endogennym, jak i ksenobiotyków metabolizmie oraz 1 gen receptora czynnika wzrostu), których ekspresja wykazywała dodatnią, predyktywną korelację (93,9% dokładność, 95,2% czułość i 91,8% specyficzność) z potencjałem rakotwórczym badanych związków. W innej pracy [26], przeprowadzono porównawczą analizę ekspresji genów (techniką ilościowego PCR; qPCR), związanych z proliferacją komórkową (*myc*, *cdc2* i *mcm6*) w wątrobie szczurów po krótkoterminowym narażeniu drogą pokarmową (do 5 dni) na NGCs (fenobarbital, acetaminofen i metapirylen) i NCs (fluoksetyna i ranitydyna). Wykazano brak zmian w ekspresji badanych genów pod wpływem NCs. Metapirylen i acetaminofen już po jednorazowej dawce wywoływały odpowiednio 3 i ponad 5-krotny wzrost ekspresji genu *myc* oraz 2 i ponad 4-krotny *cdc2*. Kontynuowanie narażenia zwierząt (5 dawek) wzmagало przedstawiony powyżej efekt. Fenobarbital stymulował tylko nadekspresję genu *cdc2* (4-krotny wzrost ekspresji). Należy jednak podkreślić, że w mechanizmach rakotwórczego działania metapiryleny i acetaminofenu uwzględniana jest hiperplazja regeneracyjna, podczas gdy w przypadku fenobarbitalu, aktywacja jądrowego receptora CAR [32]. Z badań przeprowadzonych przez Fieldena i wsp. [13] wynika, że na podstawie profilu ekspresji określonego zestawu genów możliwa jest nie tylko predyktywna ocena potencjału kancerogenego danego związku, ale również możliwe jest wskazanie jego potencjalnego mechanizmu działania, poprzez porównanie jego profilu ekspresji genów z profilem związków o znanym MOA. Ponadto autorzy pracy wykazali, że wzorzec ekspresji genów może być bardziej czułym, swoistym i dokładniejszym biomarkerem hepatokancerogenezy indukowanej NGCs, niż tradycyjne wskaźniki biologiczne (hipertrofia, wzrost masy wątroby, martwica hepatocytów, aktywność ALT w surowicy, indukcja mRNA P450 i represja mRNA *alfa-2*-makroglobuliny).

Wyniki powyższych badań sugerują, że zmiany w aktywności transkrypcyjnej genów mogą być rozważane, jako prognostyczne biomarkery transformacji nowotworowej indukowanej NGCs. Jednocześnie wskazują na możliwość oceny potencjału rakotwórczego związków na podstawie profilu ekspresji genów w badaniach krótkoterminowych.

Podjęte zostały również próby wykorzystania toksykogenomiki w badaniach mechanizmów rakotwórczego działania substancji chemicznych, reprezentujących kancerogeny genotoksyczne (GCs) i niegenotoksyczne (NGCs). Ellinger-Ziegelbauer et al. [11] przeprowadzili analizę profilu ekspresji genów (na mikromacierzy Affymetrix RGU 34A) w komórkach wątrobowych szczurów, poddanych działaniu GCs (2-nitrofluore-

nu, dimetylonitrozoaminy, aflatoksyny B1 i NNK<sup>1</sup>) oraz NGCs (dietylostilbestrolu, Wy-14,643, tlenku piperonylobutyli i metapiryleny) przez okres 14 dni. Badane związki stymulowały nadekspresję charakterystycznych, odpowiadających ich MOAs grup genów, uczestniczących w komórkowej odpowiedzi. Przykład stanowić może wykazana po narażeniu zwierząt na GCs, silna nadekspresja genu *MGMT*, który koduje białko naprawcze DNA, usuwające grupy alkilowe z pozycji O<sup>8</sup> guaniny, miejsca alkilacji DNA [31]. Potencjał GCs do bezpośredniego indukowania uszkodzeń DNA można również łączyć z wykazanim wzrostem ekspresji *p53*-zależnego genu *p21* (*Waf1/Cip1*). Białko *p21* zaangażowane jest w regulację naprawy DNA. Jego aktywacja po uszkodzeniu DNA powoduje zahamowanie wejścia komórki w fazę S cyklu komórkowego [8], co wydłuża tym samym czas na reperację uszkodzeń. Wykazany nieznaczny wzrost ekspresji genu *p21* pod wpływem NGCs, autorzy tłumaczą indukcją przez te związki stresu oksydacyjnego, co wydaje się być prawdopodobne w świetle stwierdzonej jednocześnie aktywacji przez NGCs, innych genów uczestniczących w odpowiedzi na reaktywne formy tlenu (ROS), tj. genu *Apex1* czy też genów kodujących białka szoku cieplnego (HSPs). Zgodnie z oczekiwaniami, NGCs silnie aktywowały również geny, kodujące białka związane z replikacją DNA (*MCM6*, *PCNA*, *TOP2A*) i progresją cyklu komórkowego (*Cdc2*, cyklina B1). Kontynuowane przez ten zespół [10] badania zmian profilu ekspresji genów w wątrobie szczurów pod wpływem GCs i NGCs, rozszerzone o nowe związki i uwzględniające ponadto związki nierakotwórcze (NCs), dla których profil ekspresji genów stanowił kontrolę, umożliwiły zdefiniowanie grup genów (biomarkerów), które mogą odgrywać rolę we wczesnych efektach biologicznych związanych z rozwojem chemicznej kancerogenezy. Biomarkery te umożliwiły identyfikację GCs i NGCs z dokładnością do 88%.

Interesujące wydają się wyniki *Hestera* i wsp. [16], którzy na podstawie oceny ekspresji genów indukowanych glutaraldehydem i formaldehydem sugerują, że brak działania rakotwórczego glutaraldehydu wynika z jego większej toksyczności. Autorzy [16] wykazali, że związki te indukowały odmienny szlak apoptotyczny. Stymulacja apoptozy przez formaldehyd związana była z indukcją receptora TNF i FAS, z dalszą indukcją kaspaz. Natomiast glutaraldehyd stymulował ekspresję genów związanych z mitochondrialną rodziną genów *Bcl-2*, tj. *BAD* i *BAX* oraz genu *OCTN2*, kodującego białko, transportera karnityny biorącej udział w oksydacji kwasów tłuszczowych [40]. Badane aldehydy wykazywały również odmienny profil ekspresji genów naprawy DNA.

Pomimo pewnych ograniczeń (uwzględnianie głównie wątroby, jako docelowego narządu, zazwyczaj jeden poziom dawkowania) oraz niekompletności danych (np. brak wyznaczonej zależności dawka-odpowiedź), wyniki dotychczas przeprowadzonych badań wskazują na potencjalne, praktyczne możliwości zastosowania transkryptomiki w klasyfikacji związków rakotwórczych, w badaniach ich mechanizmów jak również w identyfikacji NGCs. Rozszerzenie badań rakotwórczych związków o analizę proteomiczną i metabolomiczną może wnieść wiele nowych, istotnych informacji do ich MOAs. Nieliczne dotychczas przeprowadzone badania z zakresu proteomiki, których przykładem jest praca *Dail'a* i wsp. [6], potwierdzają przydatność analizy proteomicznej jako metodologii, która może znaleźć zastosowanie w badaniach toksykologicznych. Wynikiem analizy przez autorów [6] proteomu wątroby szczurów, było utworzenie listy białek, których ekspresja ulegała zmianie w wyniku działania fenobarbitalu (PB). Spośród zidentyfikowanych 3342 białek, 121 białek ulegało silnej nadekspresji a 127 charakteryzowało się ekspresją obniżoną w porównaniu do grupy kontrolnej szczurów. Efekt działania PB dotyczył 3 podstawowych grup białek, obejmujących te związane z regulacją cyklu komórkowego, białka CYP i apoptozy. Wyniki te dobrze korespondowały (z wyjątkiem białek zaangażowanych w apoptozę) z dwiema hipotezami dotyczącymi rakotwórczego działania PB. Jedną z tych hipotez zakłada [21, 39] obniżenie pod wpływem PB apoptozy i międzykomórkowej komunikacji oraz indukcję proliferacji komórkowej, jako efektu zaburzenia funkcji genów supresorowych i w konsekwencji ograniczenie czasu na procesy naprawcze DNA. Konkurencyjna hipoteza [7] głównie uwzględnia indukowany PB wzrost metabolizmu, szczególnie indukcję CYP2B, co skutkuje tworzeniem reaktywnych form tlenu (ROS) i uszkodzeniem DNA.

## PODSUMOWANIE

Potrzeba dysponowania nowymi testami zarówno do wykrywania GCs jak i NGCs związków nie ulega wątpliwości wobec szybko wzrastającej liczby substancji chemicznych, z którymi wiąże się wzrost ryzyka wystąpienia choroby nowotworowej oraz kosztami i czasem trwania klasycznych metod badań ich działania. Aczkolwiek proces rozwoju testów toksykogenomicznych, ich walidacja i implementacja do ustawodawstwa może być długi, ich zastosowanie w przewlekłych badaniach substancji chemicznych wydaje się być bardzo realne. Przemawia za tym wzrastająca lawinowo, w ostatnich latach ilość badań z tego zakresu. Już dzisiaj, na podstawie dotychczasowych wyników badań można stwierdzić, że technologie „omika” stanowią obiecujące

<sup>1</sup> 4-(metylonitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-1-butanon

narzędzie badawcze dla skringingu potencjalnych rakotwórczych substancji chemicznych poprzez:

- skrócenie czasu testowania,
- obniżenie kosztów testowania,
- znaczną redukcję zwierząt doświadczalnych,
- możliwość dogłębnego wyjaśniania mechanizmów działania,
- możliwość klasyfikacji związków rakotwórczych na podstawie profilu ekspresji genów.

## PIŚMIENNICTWO

1. Allen D.G., Pearse G., Haseman J.K., Maronpot R.R.: Prediction of rodent carcinogenesis: an evaluation of prechronic liver lesions as forecasters of liver tumors in NTP carcinogenicity studies. *Toxicol. Pathol.* 2004, 32, 393-401.
2. Bolt H.M., Foth H., Hengstler J.G., Degen G.H.: Carcinogenicity categorization of chemicals-new aspects to be considered in a European perspective. *Toxicol. Lett.* 2004, 151, 29-41.
3. Boverhof D.R., Zacharewski T.R.: Toxicogenomics in risk assessment: applications and needs. *Toxicol. Sci.* 2006, 89, 352-360.
4. Brena R.M., Costello J.F.: Genome-epigenome interactions in cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2007, 16, R96-105.
5. Cohen S.M.: Human carcinogenic risk evaluation: an alternative approach to the two-year rodent bioassay. *Toxicol. Sci.* 2004, 80, 225-229.
6. Dail M.B., Shack A.L., Chambers J.E., Burgess S.: Global liver proteomics of rats exposed for 5 days to Phenobarbital identifies changes associated with cancer and with CYP metabolism. *Toxicol. Sci.* 2008, 106, 556-569.
7. Dostalek M., Brooks I.D., Hardy K.D., Milne G.I., Moore M.M., Sharma S., Morrow J.D., Guengerich F.P.: In vivo oxidative damage in rats is associated with barbiturate response but not other cytochrome P450 inducers. *Mol. Pharmacol.* 2007, 72, 1419-1424.
8. El-Deiry W.S., Harper J.W., O'Connor P.M.: WAF/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 1994, 54, 1169-1174.
9. Ellinger-Ziegelbauer H., Aubrecht J., Kleinjans J.C., Ahr H.J.: Application of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity. *Toxicol. Lett.* 2009, 186, 36-44.
10. Ellinger-Ziegelbauer H., Gmuender H., Bandenburg A., Ahr H.J.: Prediction of a carcinogenic potential of rat hepatocarcinogens using toxicogenomics analysis of short-term *in vivo* studies. *Mut. Res.* 2008, 637, 23-39.
11. Ellinger-Ziegelbauer H., Stuart B., Wahle B., Bomann W., Ahr H.J.: Comparison of the expression profiles induced by genotoxic and nongenotoxic carcinogens in rat liver. *Mutat. Res.* 2005, 575, 61-84.
12. European Commission. Forth Report from the Commission to the Council and the European Parliament on the Statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the member states of the European Union. COM (2005)7 final.
13. Fielden M.R., Brennan R., Gollub J.: A gene expression biomarker provides early prediction and mechanistic assessment of hepatic tumor induction by nongenotoxic chemicals. *Toxicol. Sci.* 2007, 99, 90-100.
14. Goodacre R., Vaidyanathan S., Dunn W.B., Harrigan G.G., Kell D.B.: Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* 2004, 22, 245-252.
15. Guyton K.Z., Kyle A.D., Aubrecht J., Cogliano J., Eastmond D.A., Jackson M., Keshava N., Sandy M.S., Sonawane B., Zhang L., Waters M.D., Smith M.T.: Improving prediction of chemical carcinogenicity by considering multiple mechanisms and applying toxicogenomic approaches. *Mutat. Res.* 2009, 681, 230-240.
16. Hester S.D., Barry W.T., Zou F., Wolf D.C.: Transcriptomic analysis of F344 rat nasal epithelium suggests that the lack of carcinogenic response to glutaraldehyde is due to its greater toxicity compared to formaldehyde. *Toxicol. Pathol.* 2005, 33, 415-424.
17. Jefferson L.S., Kimball S.R.: Amino acids as regulators of gene expression at the level of mRNA translation. *J. Nutr.* 2003, 133, 2046S-2051S.
18. Jones P.A., and Baylin S.B.: The epigenomics of cancer. *Cell* 2007, 128, 683-692.
19. Kirkland D., Aardema M., Müller L., Hayashi M.: Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. II Further analysis of mammalian cell results, relative predictivity and tumour profiles. *Mut. Res.* 2006, 608, 29-42.
20. Knoepfler P.S.: Myc goes global: new tricks for an old oncogene. *Cancer Res.* 2007, 67, 5061-5063.
21. Kolaja K.L., Engelken D.T., Klaassen C.D.: Inhibition of gap junctional-intercellular communication in intact rat liver by nongenotoxic hepatocarcinogens. *Toxicology* 2000, 146, 15-22.
22. Kramer J.A., Curtiss S.W., Kolaja K.L., Alden C.L., Blomme E.A., Curtiss W.C., Davila J. C., Jacksons C.J., Bunch R.T.: Acute molecular markers of rodent hepatic carcinogenesis identified by transcription profiling. *Chem. Res. Toxicol.* 2004, 17, 463-470.
23. Kren B.T., Steer C.J.: Posttranscriptional regulation of gene expression in liver regeneration: role of mRNA stability. *FASEB J.* 1996, 10, 559-573.
24. Lord P.G.: Progress in applying genomics in drug development. *Toxicol. Lett.* 2004, 149, 371-375.
25. Nie A.Y., McMillian M., Brandon P.J., Leone A., Bryant S., Yieh L., Bittner A., Nelson J., Carmen A., Wan J., Lord P.G.: Predictive toxicogenomics approaches reveal underlying molecular mechanisms of nongenotoxic carcinogenicity. *Mol. Carcinog.* 2006, 45, 914-933.
26. Nioi P., Pardo I.D.R., Sherratt P.J., Snyder R.D.: Prediction of non-genotoxic carcinogenesis in rats using changes in gene expression following acute dosing. *Chem. Biol. Interac.* 2008, 172, 206-215.
27. Nuwaysir E.F., Bittner M., Trent J., Barrett J.C., Afshari C.A.: Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Mol. Carcinog.* 1999, 24, 153-159.



28. *Oberemm A., Onyon L., Gundert-Remy U.*: How can toxicogenomics inform risk assessment? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005, 207, S592-S598.
29. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD activities to explore and evaluate regulatory application of toxicogenomics an molecular screening assays. OECD 2009 <http://www.oecd.org/documentprint>
30. *Park T.J., Kim H.S., Byun K.H., Lee Y.S., Lim I.K.*: Sequential changes in hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine plus thiacetamide in Fisher 344 rats: induction of gankyrin expression in liver fibrosis, pRB degradation in cirrhosis, and methylation of p16(INK4A) exon 1 in hepatocellular carcinoma. *Mol. Carcinogenesis* 2001, 30, 138-150.
31. *Pegg A.E.*: Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mut. Res.* 2000, 462, 83-100.
32. *Phillips J.M., Yamamoto Y., Negishi M., Maronpot R.R., Goodman J.I.*: Orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor-mediated alterations in DNA methylation during Phenobarbital promotion of liver tumorigenesis. *Toxicol. Sci.* 2007, 96, 72-82.
33. *Plant N.*: Can systems toxicology identify common biomarkers of non-genotoxic carcinogenesis? *Toxicology* 2008, 254, 164-169.
34. *Pogribny I.P., Rusyn I., Eland F.A.*: Epigenetic aspects of genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogenesis: studies in rodents. *Environ. Mol. Mutagen.* 2008, 49, 9-15.
35. *Pogribny I.P., Tryndyak V.P., Woods S.E., Witt S.E., Rusyn I.*: Epigenetic effects of the continuous exposure to peroxisome proliferator Wy-14,643 in mouse liver are dependent upon peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Mutat. Res.* 2007, 625, 62-71.
36. Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No. 793/93 and Commission Regulation (EC) No. 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC, Official Journal L396, 30/12/2006 p.1; Corrected Official Journal L136, 29/05/2007 p.3.
37. *Robertson D.G.*: Metabonomics in Toxicology: a review. *Toxicol. Sci.* 2005, 85, 809-822.
38. *Schulte-Herman R., Bursch W., Marian W., Grasl-Kraupp B.*: Active cell death (apoptosis) and cell proliferation as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci. Publ., Lyon*, 1999, 146, 273-285.
39. *Seidel S.D., Ston W.T., Kan H.L., Sparrow B.R., Gollapudi B.B.*: Gene expression dose-response of liver with a genotoxic and nongenotoxic carcinogen. *Int. J. Toxicol.* 2006, 25, 57-64.
40. *Steiber A., Kerner J., Hoppel Ch.L.*: Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective. *Mol. Asp. Med.* 2004, 25, 455-473.
41. *Thomas R.S., Pluta I., Yang L., Halsey T.A.*: Application of genomic biomarkers to predict increased lung tumor incidence in 2-year rodent cancer bioassays. *Toxicol. Sci.* 2007, 97, 55-64.
42. *Uno Y.*: Understanding of genotoxic mechanism of action for carcinogen risk assessment to humans: a commentary to the discussion At the 4<sup>th</sup> International Workshop on Genotoxicity testing (IWGT). *Genes and Environ.* 2006, 28, 38-39.
43. *Van der Jagt K., Munn S., Torslov J., De Bruijn J.*: Alternative approaches can reduce the use of test animals under REACH. JRC Report EUR 21405 EN, Ispra, Italy 2004.
44. *Waters M.D., and Fostel J.M.*: Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. *Nat. Rev. Genet.* 2004, 5, 936-948.
45. *Williams G.M.*: Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology* 2001, 166, 3-10.

Otrzymano: 20.01.2010

Zaakceptowano do druku: 15.03. 2010

