

PŘÍRODOVĚCKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Buňky jako zdroj toxikologické informace

Radan Matura

Školitel: RNDr. Karel Nesměrák Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Praze, 19. 8. 2011

Na tomto místě bych se chtěl omluvit svému školiteli, RNDr. Karlu Nesměrákovi Ph.D. za to, že jsem zanedbal konzultace s ním a přesto práci odevzdal.

Souhrn

Tato práce se zabývá testováním genotoxických účinků cigaretového kouře metodami *in vitro* a zároveň přibližuje mutagenní působení polyaromatických uhlovodíků, které jsou jeho významnou součástí. V práci je uvedeno celkem 6 metod, které se pro *in vitro* testování genotoxicity cigaretového kouře a jeho složek, využívají nejvíce. Jedná se o thymidin kinázový test na myší buněčné linii L5178Y, mikrojádrový test, test výměny sesterských chromatid, chromozómový aberační test, kometový test a hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázový test.

Klíčová slova

Cigaretový kouř, *in vitro*, polyaromatické uhlovodíky, genotoxicita

Summary

This work is about cigarette smoke genotoxicity *in vitro* testing methods and also elucidate polycyclic aromatic hydrocarbons mutagenic activity for these are cigarette smoke's heavy players. There are 6 methods we use to test cigarette smoke and its compounds here in this elaborate. These are Mouse lymphoma assay (or Mouse lymphoma thymidine kinase assay), Micronucleus assay, Sister chromatid exchange assay, Comet assay, Chromosome Aberration Test and Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase assay.

Key words

Cigarette smoke, *in vitro*, polycyclic aromatic hydrocarbons, genotoxicity

Obsah

Souhrn	4
Summary	5
Obsah	6
Seznam použitých zkratek	7
Úvod	8
Genotoxicita	9
Cigarety	9
Nebezpečnost cigaretového kouře	9
Složení cigaretového kouře	9
Získávání testovatelného materiálu	10
Polyaromatické uhlovodíky	12
Úvod do polyaromatických uhlovodíků v cigaretovém kouři	12
Vznik intermediátů a mechanismy navázání na DNA	13
Teorie oblasti zálivu dihydrodiol epoxidů (Bay region dihydrodiol epoxides pathway).....	14
Teorie vzniku radikálovým kationem (Radical kation pathway)	15
Teorie vzniku přes o-chinon (PAH-o-quinone activation).....	16
Metody testování genotoxicity <i>in vitro</i>	18
Metabolická aktivace pomocí frakce S9	18
Thymidin kinázový test na myší buněčné linii L5178Y (MLA – Mouse Lymphoma Assay (popř. Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Assay)).....	19
Hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázový test (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase assay (HGPRT či HPRT))	21
Mikrojádrový test (Micronucleus (MN) assay)	22
Test výměny sesterských chromatid (Sister chromatide exchange (SCE) assay)	23
Kometový test (Commet assay)	24
Chromozómový aberační test (Chromosome Aberration Test)	25
Závěr.....	26
Seznam použité literatury	27
Příloha	33

Seznam použitých zkratk

BrdU – Bromdeoxyuridin
CSC – Cigarette smoke condensate
CYP – Cytochrom P (superrodina)
DMSO – dimethyl sulfoxid
DNA – Deoxyribonukleová kyselina
EH – Epoxid hydroláza
HPV – Human papiloma virus
CHL (V79) – Chinese hamster lung (V79)
CHO – Chinese hamster ovary
IARC – International Agency for Research on Cancer
MLA – Mouse Lymphoma Assay
MMS – Methylmethan sulphonate
MN – Micronucleus
MS – Mainstream smoke
PAH – Polycyclic aromatic hydrocarbon
PAU – Polycyklické aromatické uhlovodíky
SCE – Sister chromatide exchange
SCGE – Single cell gel electrophoresis
SS – Sidestream smoke
TFT – Trifluorthymidin
TK – Thymidin kynáza
TPM – Total particulate matter
WS – Whole smoke

Úvod

Při spalování tabáku v cigaretách dochází k vzniku polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) (anglicky: „Polycyclic aromatic hydrocarbons“ (PAHs)). Tyto se následně dostávají do organismu, kde dochází k jejich metabolizování pro účely jejich vyloučení. Tím však vznikají poměrně reaktivní meziprodukty, které interagují s deoxyribonukleovou kyselinou (DNA) a proteiny. Tak navozují mutace v DNA (genotoxicita) a nádorové zvrhávání buněk. Byly vyvinuty laboratorní testovací postupy na odhalení míry mutagenity a karcinogenity chemických individuí. Testování na živých zvířatech s sebou ale nese značné morální, finanční a časové nároky. A proto se v co největší míře využívá (tam kde je to možné) *in vitro* toxikologického testování na buňkách.

V této práci přiblížím proces, který vede od cigarety k odhalení míry genotoxických účinků cigaretového kouře, jehož významnou složku tvoří PAU, metodami *in vitro* na savčích buňkách, společně s podstatou, která se za tím skrývá.

Práce je strukturována do tří částí. První se zabývá cigaretami a získem chemické informace z nich, kterou lze využít pro *in vitro* studium genotoxicity. Druhá část shrnuje významnou genotoxickou součást cigaretového kouře, polyaromatické uhlovodíky, ve vztahu k deoxyribonukleové kyselině. Třetí část popisuje samotné *in vitro* testování genotoxicity cigaretového kouře.

V textu se objevují ne plně zaměnitelné výrazy „tabákový kouř“ a „cigaretový kouř“. Tyto nejsou záměrně sjednoceny, jelikož některé články uvádí první výraz a některé druhý. Nicméně v mém textu mají stejnou vypovídací hodnotu.

Genotoxicita

Genotoxicita je pojem, kterým označujeme účinek látek, které poškozují genetickou informaci uloženou v DNA. Genotoxické látky jsou mutagenní, karcinogenní, či obojí. Mutagenní působení mění primární strukturu dvoušroubovice DNA. Karcinogenní působení umožňuje buňkám nekontrolovatelně proliferovat. Mutageny a karcinogeny tvoří dvě množiny látek, které se navzájem překrývají, ale nejsou totožné (Williams, 1989).

Cigarety

Nebezpečnost cigaretového kouře

Epidemiologické studie uvádějí, že kouření tabáku (kde značný podíl tvoří právě cigarety) způsobuje přibližně 30% všech nádorových úmrtí ve vyspělých zemích. Jedná se o nádory: plic, ledvinové pánvičky, močového měchýře, ústní dutiny, hrtanu, hltanu, jícnu, nosní dutiny, vedlejších dutin nosních, nosohltanu, žaludku, ledvin, jater, děložního krčku, pravděpodobně tlustého střeva, prsu, prostaty a endometria (Vineis *et al.*, 2004).

V roce 2000 se kouření tabáku připsalo 4,8 milionů mrtvých po celém světě (domnělý rozsah 3,94 – 5,93 milionu) (Ezzati and Lopez, 2003). Jen v České republice v témže roce zemřelo v důsledku kouření 17 700 lidí (Peto *et al.*, 2003).

Složení cigaretového kouře

Tabákový kouř obsahuje více než 4000 komponent (Hoffmann *et al.*, 1997). Přes 60 z nich jsou karcinogeny ze skupin polycyklických aromatických uhlovodíků, heterocyklických sloučenin, N-nitrosaminů, aromatických aminů, heterocyklických aromatických aminů, aldehydů, kovů a dalších. Jejich kompletní výčet pro rok 2010 obsahuje příloha 1 (Office of the Surgeon General, 2010).

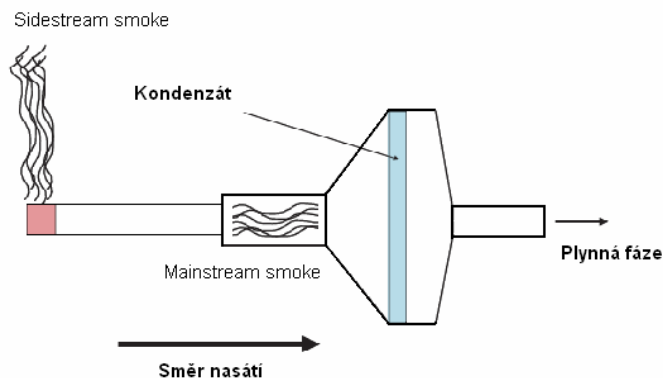
Tabákový kouř také obsahuje uhlíkové polymery, jež jsou v cigaretovém kouři přítomny v koncentraci 10^{10} částic/ml. Na tyto polymery adherují některé komponenty cigaretového kouře, jako těžké kovy, PAU, N-nitrosaminy a další složky (Hecht, 1999).

Získávání testovatelného materiálu

Prvním krokem k určení složení cigaretového kouře je nakuřování cigaret rutinním analytickým nakuřovacím přístrojem dle normy ISO 3308:2000. To jest jedno potáhnutí z cigarety za 60 sekund, o objemu 35 centimetrů krychlových a trvající 2 sekundy (ISO 3308, 2000).

Cigaretový kouř pro potřeby analýz rozdělujeme na „mainstream smoke“ (MS) a „sidestream smoke“ (SS). MS vystupuje na konci cigarety, který se vkládá do úst a pokračuje do plic, kde se zachytává značná část látek v něm obsažených. Paradoxně tedy MS vydechnutý kuřákem obsahuje velmi nízké koncentrace látek jinak přítomných v cigaretovém kouři (část také před plícemi pohltní cigaretový filtr, pokud je přítomen). SS se uvolňuje z hořícího konce cigarety, jde přímo do okolního prostředí a obsahuje vyšší koncentrace toxických a karcinogenních látek než MS. (Bacsik *et al.*, 2007; Valavanidis *et al.*, 2009). Nicméně i MS který nebyl „očišťen“ v plicích je méně toxický než SS, jelikož vzniká při dokonalejším spalování a obsahuje tedy méně zdraví škodlivých látek (MS vzniká při nasávání vzduchu skrz cigaretu, tedy za vyšší koncentrace O_2 , (větší hoření, vyšší teplota) než SS). SS má obecně vyšší mutagenní a karcinogenní potenciál než MS (Mohtashamipur *et al.* 1990; Schick and Glantz, 2005)

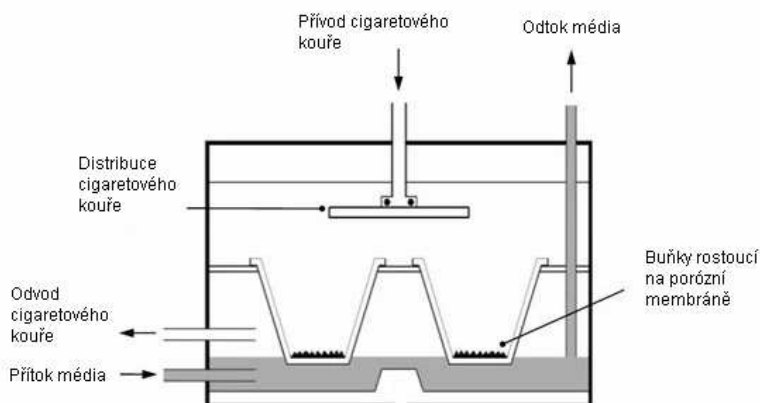
Cigaretový kouř MS i SS, jakožto aerosol, můžeme rozdělit na pevnou a plynnou fázi. Pevná fáze se od plynné oddělí zachycením na Cambridžské filtry. Plynná fáze (cca. 500 složek) obsahuje plyny, těžké organické látky, volné radikály a další. Pevná fáze (cca. 3500 složek), též nazývaná „total particulate matter“ (TPM) či „cigarette smoke condensate“ (CSC), je známá jako dehet a pod ní spadají i PAU (Valavanidis *et al.*, 2009). Názorné schéma ukazuje obrázek 1.



Obr. 1: Schéma zisku kondenzátu a plynné fáze z cigaretového kouře. Převzato a upraveno z http://www.esainc.com/admin/preview/docs/spool/70-7984_cigarette_smoke_condensate.pdf, ke dni 15.8.2011.

Pro *in vitro* analýzy se užívá právě dehtu uvolněného z Cambridžských filtrů pomocí rozpouštědel (DMSO, methanol, ethanol), jelikož se dobře získává a aplikuje. Nicméně takovýto materiál neobsahuje veškeré složky obsažené v původním, tzv.: „whole smoke“ (WS) cigaretovém kouři (chybí plynná fáze). Proto se začaly používat i složitější systémy, které umožňují přímou *in vitro* aplikaci WS na buňky (Bombick *et al.*, 1997; Okuwa *et al.*, 2010). Názorné schéma ukazuje obrázek 2.

Důvod, proč potřebujeme testovat kompletní cigaretový kouř, je ten, že látky v něm obsažené spolu navzájem interagují a interferují. Proto má takto postavený experiment vyšší vypovídací hodnotu, než kdybychom testovali pouze jednotlivé složky (White, 2002).



Obr. 2: Schéma aplikace „whole smoke“ cigaretového kouře. Převzato a upraveno z http://www.bat-science.com/groupms/sites/bat_7awfh3.nsf/vwPagesWebLive/DO7AXGRG?opendocument&SKN=1, ke dni 15.8.2011.

Polyaromatické uhlovodíky

Úvod do polyaromatických uhlovodíků v cigaretovém kouři

PAU jsou organické sloučeniny kondenzovaných benzenových jader. Jejich výskyt je způsoben jak lidskou činností (prakticky veškerá lidská činnost, při které dochází ke spalování), tak jsou přítomny přirozeně v přírodě (ve vzduchu, vodě, půdě...). Jednou z možností, kdy mohou vznikat, je spalování tabáku v cigaretách.

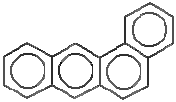
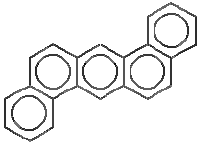
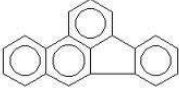
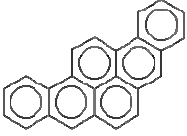

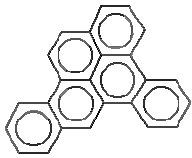
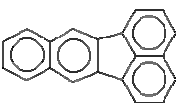
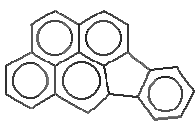
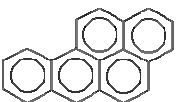
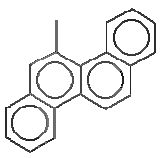
Již zpráva International Agency for Research on Cancer (IARC) z roku 1983 podává přehled o PAU, které mají prokázanou spojitost se vznikem nádorových onemocnění a vykazují mutagenní aktivitu (nicméně, ne všechny z nich se nachází v cigaretovém kouři) (IARC, 1983).

PAU, vzhledem k jejich planárnímu uspořádání a vysoké míře konjugace aromatických jader, samy o sobě s DNA neinteragují. K takovému aktu je potřeba metabolická aktivace, jíž bude věnována další část této kapitoly. Nicméně poté se z PAU stávají vysoce reaktivní molekuly kovalentně se vážající na DNA (i proteiny) a způsobující mutace (Wogan and Gorelick, 1985).

V cigaretovém kouři se nachází deset s DNA interagujících PAU, viz tabulka 1 (Office of the Surgeon General, 2010).

Známe dva hlavní způsoby, kterými PAU v cigaretách vznikají. První říká, že se tabákové komponenty za vysoké energie pyrolyticky rozkládají na menší reaktivní molekuly a volné radikály, které spolu následně utvoří PAU. Druhý způsob zahrnuje jednomolekulární zacyklení, dehydrataci, aromatizaci a spojování benzenových jader. Nejzásadnějšími zdroji PAU jsou lipofilní látky (lipidy, steroly) a obecně složky buněčné stěny (McGrath *et al.*, 2007).

Tabulka 1: Karcinogenní PAU obsažené v cigaretovém kouři.

benz(a)anthracen		dibenz(a,h)anthracen	
benzo(b)fluoranthen		dibenzo(a,i)pyren	
benzo(j)fluoranthen		dibenzo(a,e)pyren	
benzo(k)fluoranthen		indeno(1,2,3-cd)pyren	
benzo(a)pyren		5-methylchrysen	

Vznik intermediátů a mechanismy navázání na DNA

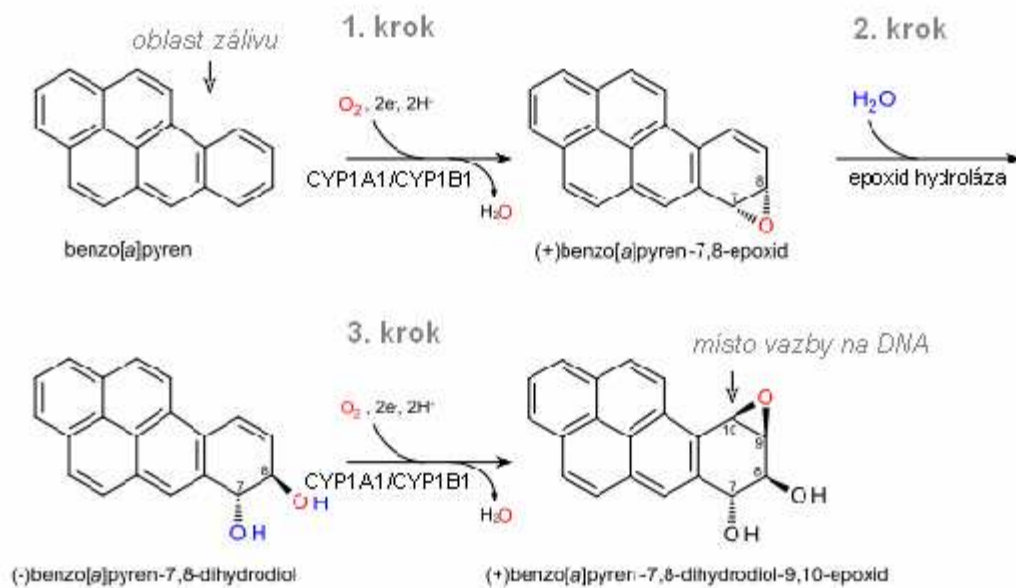
K metabolické aktivaci PAU dochází, jelikož se organismus tyto látky lipofilní povahy snaží vyloučit močí, což by z podstaty jejich struktury nebylo bez chemických modifikací možné. Proto nejdříve dochází k oxidačním a redukčním krokům a následně ke konjugaci s látkami dále zvyšujícími hydrofilitu.

Známe několik aktivačních drah pro PAU, v této práci budou uvedeny tři nejzásadnější: Teorie oblasti zálivu dihydrodiol epoxidů, teorie vzniku radikálovým kationem a teorie vzniku přes o-chinon.

Teorie oblasti zálivu dihydrodiol epoxidů (Bay region dihydrodiol epoxides pathway)

Tato dráha metabolické aktivace PAU sestává ze tří enzymatických kroků (znázorněných na obrázku 3).

1. krok – Proteiny ze superrodiny cytochromů P450 (CYP) CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 (Shimada *et al.*, 1998; Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004) oxidují „dvojnou vazbu“ (či spíše využívají dva z dislokovaných π elektronů) na epoxidy PAU.
2. krok – Enzym epoxid hydroláza (EH) následně tyto nestabilní molekuly hydrolyzuje na PAU dihydrodioly (zpravidla *trans* stereoizomery).
3. krok – „Dvojná vazba“ sousedící s hydroxylovými skupinami je oxidována CYP450 a vzniká PAU dihydrodiol epoxid.

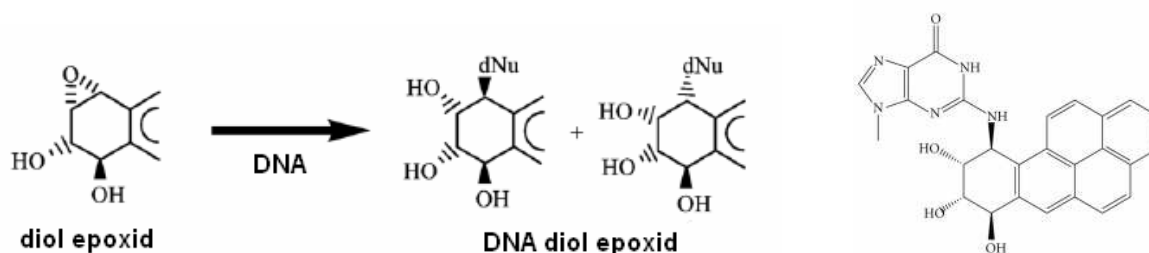


Obr. 3: Schéma metabolické aktivace PAU dihydrodiol epoxidovou cestou. Převzato a upraveno z http://en.wikipedia.org/wiki/File:Benzo%28a%29pyrene_metabolism.svg, ke dni 15.8.2011.

Oblast zálivu je nyní vysoce elektrofilní a bude ochotně tvořit kovalentní vazby s DNA (Harvey, 1991; Xue and Warshawsky, 2005). Tento proces je velice stereochemicky obsáhlý a je podrobněji rozpracován v Yang, 1988; Xue and Warshawsky, 2005; Shimada, 2006.

Samotné vazbě dihydrodiol epoxidu PAU na DNA ještě předchází nekovalentní interkalace (Geacintov, 1986). Následně dochází ke kovalentní vazbě mezi uhlíkem dihydrodiol epoxidu PAU, který spolutvoří funkční *epoxy* skupinu (konkrétně tím, co je dále od hydroxylových skupin – je znázorněn v obrázku 3) a nukleotidovou aminoskupinou mimo cyklus nukleotidu. Aminoskupina disponuje volným elektronovým párem a je tedy nukleofilní, oproti uhlíku oblasti zálivu, který je elektrofilní (vazba znázorněna na obrázku 4 a obrázku 5). Dihydrodiol epoxidu PAU slouží jako vazební partneři především deoxyguanosinmonofosfát a deoxyadenosinmonofosfát (Dipple, 1994). Existují ale záznamy o aduktech, které využívají i další atomy dusíku přítomné v nukleotidech (Wolfe *et al.*, 2004).

Z PAU, které se nacházejí v cigaretovém kouři jako karcinogeny, jsou takto metabolicky aktivovány benzo[a]pyren (Gelboin *et al.*, 1980); 5-metylchrysen (Hecht *et al.*, 1986); benz[a]antracen (Levin *et al.*, 1978).



Obr. 4 vlevo: Adukce diol epoxidu PAU na DNA (dvě stereovarianty). Převzato a upraveno z Xue and Warshawsky, *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005.

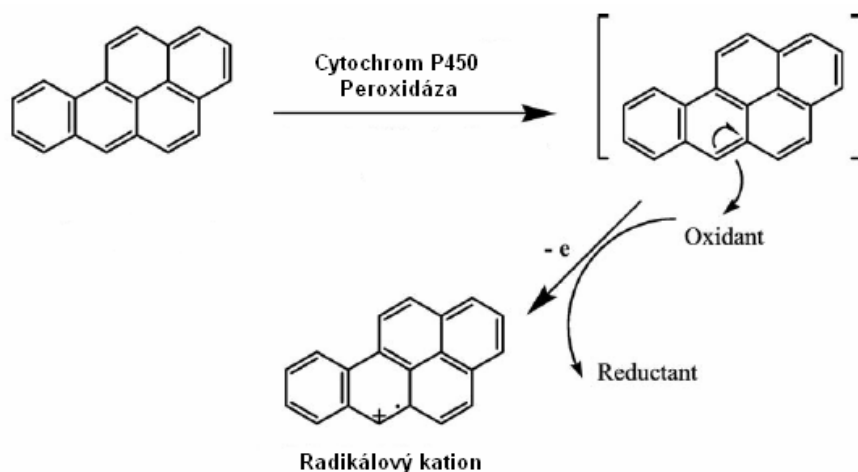
Obr. 5 vpravo: Vazba PAU na DNA přes exocyklickou aminoskupinu. Převzato a upraveno z Hang, *J Nucleic Acids*, 2010.

Teorie vzniku radikálovým kationem (Radical kation pathway)

Radikálový kation PAU vzniká odstraněním jednoho dislokovaného elektronu π . To má na svědomí enzym cytochrom P450 peroxidáza (proces znázorněn na obrázku 6) (Cavalieri and Rogan, 1985). Aby mohlo k tomuto dojít, je nutné, aby měl PAU relativně nízký ionizační potenciál (tj. energii potřebnou k odtržení elektronu) cca 7,35 eV a méně. Náboj také musí být vhodně lokalizován a stericky přístupný. (Cavalieri and Rogan, 1992).

Bylo objeveno, že DNA adukty PAU vzniklé cestou radikálového kationu jsou značně nestabilní a dochází k samovolnému odštěpení purinových bazí od cukerné části nukleotidu

(tzv. depurinace). Hlavními vazebnými partnery pro kationové radikály jsou dusík v pozici 7 (N7) na deoxyguanosinmonofosfátu a deoxyadenosinmonofosfátu. V případě deoxyadenosinmonofosfátu ještě dusík v pozici 3 (N3) (Cavallieri and Rogan, 1995).

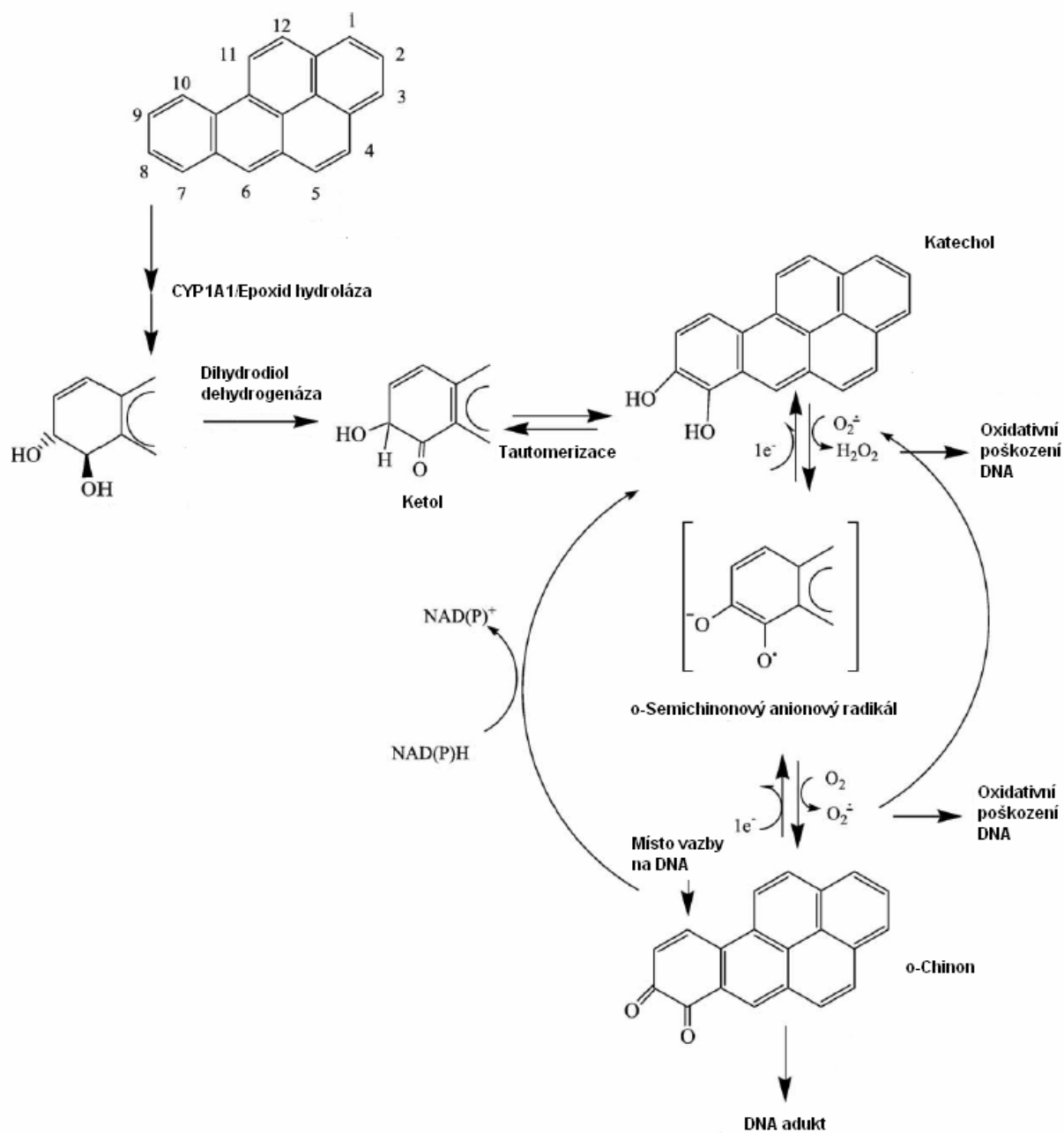


Obr. 6: Ustavení kationového radikálu PAU. Převzato a upraveno z Xue and Warshawsky, *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005.

Teorie vzniku přes *o*-chinon (PAH-*o*-quinone activation)

Pro vznik *o*-chinonu PAU je nejprve nutný vznik dihydrodiolu, stejnou cestou jako v případě vzniku dihydrodiol epoxidů PAU. Následně enzym dihydrodiol dehydrogenáza takovou molekulu oxiduje a vzniká ketol. Ten tautomerizuje na katechol, který následně spontánně oxiduje až na PAU-*o*-chinon. Dva kyslíky *o*-chinon PAU výrazně odčerpávají elektrony, a tím činí protilehlý uhlík dostatečně elektrofilní pro vazbu s DNA (Penning *et al.*, 1999). Tento mechanismus je zanesen na obrázku 7.

o-chinon PAU tvoří adukty přednostně s deoxyguanosinmonofosfátem a deoxyadenosinmonofosfátem, stabilní i nestabilní (depurinační) (Xue and Warshawsky, 2005).



Obr. 7: Mechanismus vzniku *o*-chinonu PAU s vyznačeným místem adukce na DNA.

Převzato a upraveno z Xue and Warshawsky, *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005.

Metody testování genotoxicity *in vitro*

Změny genetické informace, jako jsou genové mutace, chromozomální přestavby nebo chromozomální dalece nebo celogenomové změny, jsou spojeny s nepříznivými účinky na viabilitu organismu. Pro odhalení látek s genotoxickými účinky bylo vyvinuto více než 100 různých typů testů akutní genotoxicity (zároveň existují další testy chronické toxicity). Ne všechny z nich jsou ale dle mezinárodních standardů využitelné, dostatečně spolehlivé a citlivé pro použití v genotoxických testech látek z cigaretového kouře (Andreoli *et al.*, 2003). *In vitro* genotoxické testy mohou být založeny na bakteriálních i savčích buňkách. Nejznámějším genotoxickým testem prováděným na bakteriích je Amesův test (Ames *et al.*, 1975). Tato práce se však dále bude podrobněji věnovat pouze testům využívajících savčí buňky. Šest hlavních jsou tyto:

- 1) Thymidin kinázový test na myší buněčné linii L5178Y
- 2) Hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázový test
- 3) Mikrojadrový test
- 4) Test výměny sesterských chromatid
- 5) Kometový test
- 6) Chromozómový aberační test

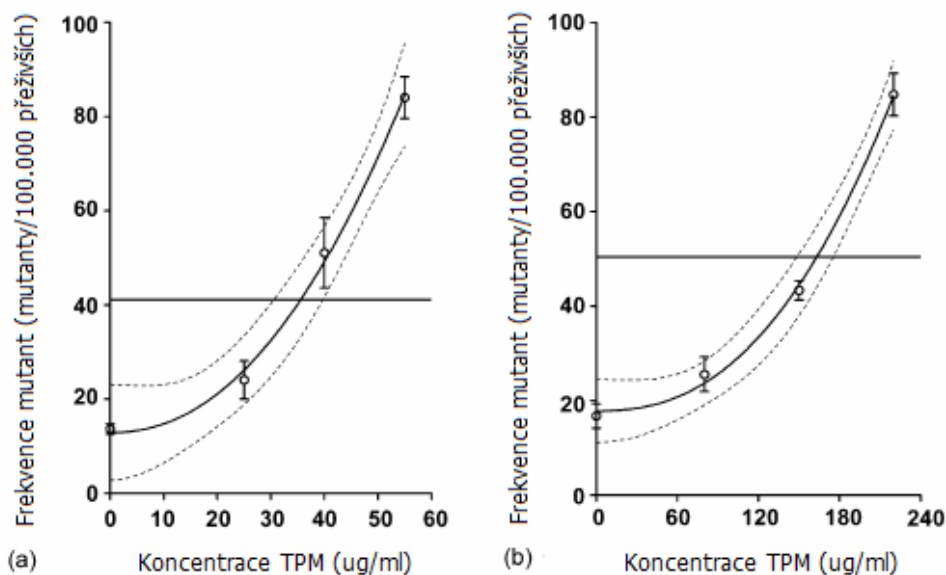
Všechny tyto testy mají společný problém, že pozitivní výsledky mohou být dosaženy i látkami, které nejsou genotoxické ale pouze cytotoxické. Zároveň vysoká koncentrace genotoxické látky může mít cytotoxické účinky, což také dává falešně pozitivní výsledky (Schramke *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2009).

Metabolická aktivace pomocí frakce S9

Aby bylo docíleno co nejuvěrnější simulace *in vivo* podmínek, užíváme v *in vitro* uspořádání tzv. frakce S9. Většina linií totiž za svoji *in vitro* existenci dediferenciuje do té míry, že ztratí schopnost sama metabolizovat jisté skupiny látek. To však neodráží skutečnost, že v živém organismu prochází cizorodé látky detoxifikačními procesy, které někdy toxicitu snižují a někdy naopak stojí na jejím začátku (jako v případě PAU). Proto k buňkám přidáváme frakci S9, část supernatantu z jaterního homogenátu (dle potřeby i z jiných tkání)

z potkana (dle potřeby z jiného zvířete) předem ošetřeného chemikáliemi. S9 frakce obsahuje cytosol (buněčnou šťávu) a mikrozomy (Duffus *et al.*, 2007).

Frakce S9 může látky jak detoxifikovat (viz obrázek 8) (Schramke *et al.*, 2006), tak toxicky potencovat (Devanesan *et al.*, 1992).



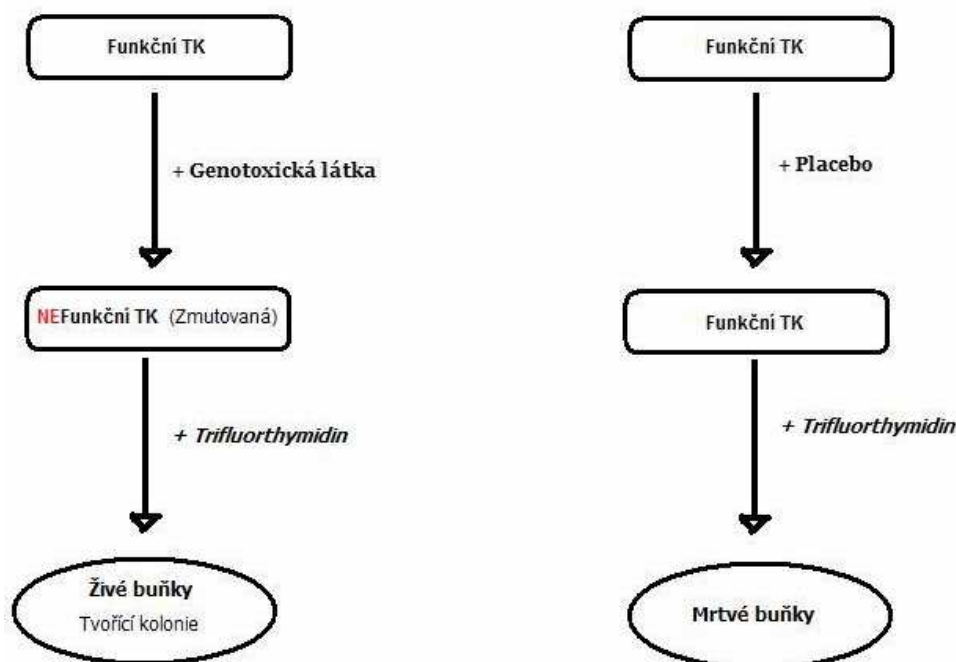
Obr. 8: Příklad detoxifikačního působení frakce S9 (TPM = SCS). (a) TPM bez S9. (b) TPM s S9. Převzato a upraveno z Schramke *et al.*, Toxikology, 2006.

Thymidin kinázový test na myší buněčné linii L5178Y (MLA – Mouse Lymphoma Assay (popř. Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Assay))

V testu MLA se využívá myší buněčné linie L5178Y, která je metodami molekulární genetiky upravena tak, že obsahuje pouze jednu funkční kopii genu pro thymidin kinázu (TK) (buňky jsou tedy TK⁺/TK⁻). Tento gen je náchylný k mutacím působeným mutageny. Pokud v něm dojde k mutaci, která vyřadí enzymovou aktivitu TK, nic se nestane, jelikož TK není pro buňku esenciální. Ovšem pokud se k buňkám přidá specifický substrát TK, např. trifluorthymidin (TFT) (toxický analog thymidinu), a gen TK je stále funkční (tj. nedošlo k mutaci, způsobené testovanou látkou, která by vyřadila enzymovou aktivitu TK), dochází k interferencím v metabolismu DNA, které jsou pro buňku smrtící. Pokud přidáme TFT a gen TK je nefunkční (tj. došlo k mutaci, způsobené testovanou látkou, která vyřadila enzymovou

aktivitu TK), nedochází k interferencím v metabolismu DNA (nic se nestane) a buňka přežívá (Clive and Spector, 1975; Clive *et al.*, 1987). Toto uspořádání je shrnuto na obrázku 9.

Tento test je pokládán za nejcitlivější test mutagenicity látek prováděný na savčích buňkách *in vitro*. Často je také využíván k určení karcinogenních účinků látek, ale protože ne všechny karcinogeny působí zároveň genotoxicky, není vypovídací hodnota vždy úplná (Kirkland *et al.*, 2005).



Obr. 9: Schéma uspořádání Thymidin kinázového testu na myší buněčné linii L5178Y. Vlastní tvorba.

V případě cigaretového kouře se tento test používá pro ohodnocení mutagenních účinků CSC (popřípadě WS). CSC se vymyje z filtru a v určité koncentraci se přidá do média, ve kterém se buňky kultivují. V rámci testování je také nutná validace testovacího systému, při které se otestuje mutagenní odpověď buněk na negativní (např.: DMSO) a pozitivní kontrolu (např.: methylmethan sulphonate (MMS) a benzo[a]pyren) a CSC z referenční cigarety. Po inkubaci s kontrolami i testovanou látkou se buňky selektují použitím např. TFT a buňky, které přežijí se spočítají. Pozitivní výsledky byly získány u vzorků CSC, které byly i nebyly metabolicky aktivované. U metabolicky aktivovaných vzorků byla ukázána nižší mutagenní aktivita testovaných látek. Možným vysvětlením je detoxifikace jednotlivých složek a jejich nespecifické vyvázání (Schramke *et al.*, 2006). Toto vysvětlení je částečně

paradoxní, jelikož některé látky obsažené v cigaretovém kouři, například výše popsané PAU, pro svoji mutagenní aktivitu naopak metabolickou aktivaci vyžadují.

V roce 1997 bylo pomocí tohoto testu stanoveno 60 látek (z 106 testovaných) nacházejících se v cigaretovém kouři jako předpokládané nebo potvrzené mutagenní látky. Mezi nimi byly takto identifikovány i PAU (Mitchel *et al.*, 1997).

Hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázový test (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase assay (HGPRT či HPRT))

HPRT je testovacím uspořádáním v zásadě shodný s MLA. HPRT je enzym, schopný do DNA metabolismu vpravit toxický analog guaninu 6-thioguanin. Tento buňku následně zahubí. Tedy buňka, jejíž HPRT je díky mutacím na úrovni DNA nefunkční, přežije a následně utvoří spočítatelné kolonie. HPRT testování probíhá na buňkách ovárií čínského křečka (Chinese hamster ovary (CHO) cells) a v plicích buňkách V79 z čínského křečka (chinese hamster lung (CHL) cells) (AssaySheetsHPRT, 2011).

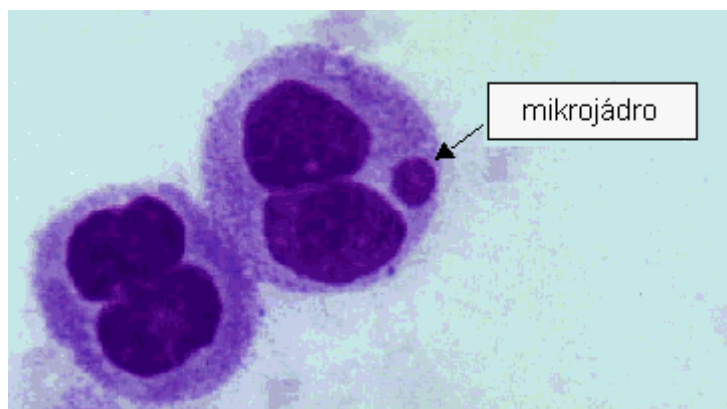
Rozdíl ovšem je, že buňky užívané pro MLA je heterozygotní pro *Tk* a buňky užívané pro HPRT jsou pro *Hprt* hemizigotní, a MLA je (tudíž) více senzitivní (Moore *et al.*, 1989). Můj osobní názor je takový, že hemizigotní gen, byť neesenciální, si nemůže dovolit tak vysokou náchylnost k mutacím, na rozdíl od genu o dvou lokusech, kde je případná nefunkčnost genu kompenzována druhou alelou.

Velice zajímavý pokus byl proveden v roce 1944 v Německu, kdy se srovnávaly dvě podlinie CHL V79. Experimentátorům vyšlo, že náchylnost *Hprt* lokusů (obou linií) k mutacím se od sebe významně odlišuje. Toto ukazuje, že při práci s liniemi by se mělo postupovat velice obezřetně při provádění genotoxických vyhodnoceních (Speit *et al.*, 1994).

Velice zajímavé je srovnání testů genotoxicity MLA a HPRT u cigaretového kouře. Zatímco u MLA v případě testování CSC vyšlo, že při metabolické aktivaci S9 se mutagenita snižuje, pro HPRT byl výsledek opačný. CHL V79 neošetřené S9 nevykazovaly prakticky žádnou mutagenní aktivitu, zatímco CHL V79 ošetřené S9 zaznamenaly zvýšenou genotoxicitu (Jonger *et al.*, 1984; Schramke *et al.*, 2006). To však neznamená, že jiné výsledky vznikly nutně díky rozdílným užitým buněk. Rozdíl mohl být v médiu, S9 aktivaci, kvalitě buněk a dalším.

Mikrojádrový test (Micronucleus (MN) assay)

Mikrojádrový test byl vyvinut v letech 1973-1975. Pokud v anafázi jaderného dělení dojde k poškození chromozomů takovým způsobem, že vznikají chromozomální fragmenty nebo celé chromozomy bez centromery, nemohou být takovéto chromozomy zachyceny dělicím vřeténkem a začleněny do nově vznikajícího dceřiného jádra. Po telofázi z těchto chromozomů a jejich fragmentů vzniká jedno nebo více sekundárních jader, které jsou menší než dceřiná jádra, a tudíž se nazývají mikrojádra. Tedy v případě, že testovaná látka má genotoxické účinky poškozující chromozómy, pozorujeme vznik mikrojader (jak je znázorněno na obrázku 10). Pokud testovaná látka nemá genotoxické účinky poškozující chromozómy, mikrojádra nevznikají. Tento test je možné provádět také in vivo (Heddle 1973, Schmid 1975).



Obr. 10: Vizualizace mikrojádra. Převzato a upraveno z http://www.crios.be/genotoxicitytests/micronucleus_test.htm, ke dni 15.8.2011.

V současné době je uspořádání testu doplněno o použití cytochalasinu B, který buňku zastavuje po jaderném dělení, ještě než podstoupí buněčné dělení. Mikrojádrový test s blokováním cytokineze přináší přesnější výsledky, protože nezahrnuje toxické účinky sledované látky na průběh buněčného dělení ale jen jaderného dělení. Přednostmi tohoto testu jsou spolehlivost, jednoduchost, nízké náklady a rychlost provedení. (Fenech, 2000).

U testování účinků cigaretového kouře byly používány následující buněčné typy: buněčná linie BALB/c-3T3, CHL V79, CHO, buňky Hepa1c1c7, TAOc1BP(r)c1, myší lymfoidní linie L5178Y/Tk+/- (Johnson *et al.*, 2009). K buňkám se nejprve přidává CSC vymytý z filtru, ten se následně odstraní a buňky se nechají zotavit. Buňky při tom mohou a

nemusejí být metabolicky aktivované. Tvorba mikrojader se detekuje na optickém (Ellard and Parry, 1993) nebo fluorescenčním mikroskopu (Channarayappa *et al.*, 1992) či průtokovém analyzátoru (Avlasevich *et al.*, 2006). Díky tomuto testu bylo zjištěno, že látky z cigaretového kouře způsobují chromozomální zlomy, a tím vznik fragmentů bez centromery a zároveň způsobují také nesprávné rozmístění chromozomů (Channarayappa *et al.*, 1992). Navíc se tento test dá využít i pro kvalitativní a kvantitativní analýzu účinků látek přímo z WS (Okuwa *et al.*, 2010).

Test výměny sesterských chromatid (Sister chromatide exchange (SCE) assay)

Výměna sesterských chromatid je děj, kdy dojde k vzájemné výměně části DNA mezi sesterskými chromatidami duplikujícího se chromozómu. Protože bylo zjištěno, že působení genotoxických látek na buňky zvyšuje frekvenci SCE, lze tento proces použít jako metodu testování toxicity látek (Tucker, 1993). Aby bylo možné SCE v buňce vizualizovat, je potřeba sesterské chromatidy rozdílně nabarvit. Toho se dosáhne tak, že se buňky nechají po dobu dvou buněčných cyklů v přítomnosti bromdeoxyuridinu (BrdU) namísto thymidinu. Takto připravené buňky se následně zastaví v metafázi buněčného cyklu např.: kolcemidem, zafixují a barví Giemsou. Části DNA chromatid, které obsahují BrdU se barví slaběji, a tak lze detekovat počet SCE (Perry and Wolff, 1974). Další možností je detekce fluorescenčním mikroskopem (Latt, 1974). Toto uspořádání je znázorněno na obrázku 7. Výsledek na obrázku 11.



Obr. 11 vlevo: Schéma značení BrdU. Převzato a upraveno z German and Alhadeff, Curr Protoc Hum Genet, 2001. Obr. 8 vpravo: Vizualizace SCE. Převzato a upraveno z <http://chromosometesting.com/html/samples3.html>, ke dni 15.8.2011.

Tento test podobně jako MLA vykazuje vysokou citlivost (Zeiger E *et al.*, 1990), ale v případě testování cigaretového kouře se nepoužívá pro srovnávací studie vlivu jeho jednotlivých složek .

Na testování cigaretového kouře se používají lidské lymfocyty nebo buňky ováří čínské křečka (CHO) (Johnsons *et al.*, 2009). SCE prokázala pozitivní genotoxické účinky cigaretového kouře u metabolicky aktivovaných i neaktivovaných vzorků a je využitelná pro stanovení genotoxických účinků jak CSC, tak plynné fáze cigaretového kouře (Curvall *et al.*, 1985; Bombick *et al.*, 1997).

Kometový test (Commet assay)

Kometový test (popř. single cell gel electrophoresis (SCGE)) slouží k detekci jedno- nebo dvouřetězcových zlomů, které v buňce vznikají vlivem genotoxických látek. Buňky opůsobené genotoxickou látkou se přenesou na agarózový gel, kde se následně zlyzují a zbaví proteinů (difuzí), aby v gelu zůstala pouze DNA. Zlomy na DNA za konkrétních podmínek umožní její relaxaci a uvolnění jednotlivých fragmentů, které v následné elektroforéze dávají vzniknout kometě, kde její „hlavu“ tvoří fixovaná DNA (taková, která nemůže efektivně putovat gelem) a „ocas“ jednotlivé fragmenty putující gelem. K detekci se používá ethidium bromid nebo fluorescenční látky s afinitou k DNA (Ostling and Johanson, 1984).

Tato metoda je rychlá, nenákladná, senzitivní a výhodou je, že k jejímu provedení stačí malé množství buněk, které navíc nemusí proliferovat. I když některé práce pomocí kometového testu na lidských lymfoblastoidních liniích prokázaly genotoxické účinky CSC z cigaretové kouře (Wolz *et al.*, 2002), jiné práce naopak uvádějí, že kometový test má jistá omezení ve schopnosti detekovat poškození DNA způsobená CSC (Speit *et al.*, 2003). Tato metoda také odhalila, že CSC v součinnosti s virem HPV (Human papillomavirus) vyvolává dlouhodobě přetrvávající zlomy, což vede k úvaze, že pro lidi nakažené HPV představuje cigaretový kouř větší riziko nádorového onemocnění (Moktar *et al.*, 2009).

Chromozómový aberační test (Chromosome Aberration Test)

Genotoxické látky vyvolávají zlomy DNA, které mohou vést až k chromozomálním aberacím, tedy ztrátě, zdvojení nebo přestavbě určitého chromozomálního segmentu. Tyto aberace lze u obarvených metafázních buněk vizualizovat mikroskopem. Barvení může být provedeno Giemsou (Evans and and O'Riordan, 1975), ale také fluorescenčními barvami metodou *in situ* hybridizace (FISH) (Nishioka *et al.*, 1981).

V rámci metody chromozomálních aberací se používají buněčné linie CHO, CHL V79 nebo lidské linie. Nevýhodou v tomto případě je skutečnost, že buňky linií mají tendenci podléhat chromozomálním aberacím bez působení genotoxických látek. Je tedy výhodnější používat i lidské lymfocyty, které jsou stabilnější (Johnson *et al.*, 2009).

Buňky kuřáků vykazují vyšší množství chromozomálních přestaveb. Testem chromozomálních aberací bylo prokázáno, že příčinou je právě CSC z cigaretového kouře (Sierra-Torres *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2004.). Konkrétní vysvětlení negativního vlivu CSC na chromozomální stabilitu je však stále předmětem výzkumu (Hays *et al.*, 2008)

Závěr

In vivo experimentům se ještě nějakou dobu nevyhneme. *In vitro* metody mohou sloužit jako doplňkové testy, ale chybí jim komplexita živých zvířat. I přesto je užívání *in vitro* metod pro studium genotoxicity cigaretového kouře značně využívaným prostředkem jelikož šetří peníze, zvířata i čas. Máme uspořádání sledující genové mutace (thymidin kinázový test na myší buněčné linii L5178Y a hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázový test) a uspořádání sledující chromozomální integritu, popřípadě integritu dvojitě vlákna DNA (mikrojádrový test, test výměny sesterských chromatid, chromozómový aberační test a kometový test). Určitým trendem je testovat cigaretový kouř jako co nejkompexnější substanci, jelikož jeho jednotliviny se nesčítají, ale nepředvídatelně ovlivňují. Nicméně *in vitro* metod se užívá i k testování jeho jednotlivých složek, byť za účely jinými, než je přímo studium genotoxicity (v textu neprobíráno).

Seznam použité literatury

Ames BN, Mccann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res.* 1975 Dec;31(6):347-64.

Andreoli C, Gigante D, Nunziata A. A review of in vitro methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. *Toxicol In Vitro.* 2003 Oct-Dec;17(5-6):587-94.

AssaySheetHPRT, 2011. HPRT-Forward-Mutation-Assay. Dostupné na <http://www.genpharmtox.de/downloads/AssaySheetsHPRT.pdf>, ke dni 15.8. 2011.

Avlasevich SL, Bryce SM, Cairns SE, Dertinger SD. In vitro micronucleus scoring by flow cytometry: differential staining of micronuclei versus apoptotic and necrotic chromatin enhances assay reliability. *Environ Mol Mutagen.* 2006 Jan;47(1):56-66.

Bacsik Z, McGregor J, Mink J. FTIR analysis of gaseous compounds in the mainstream smoke of regular and light cigarettes. *Food Chem Toxicol.* 2007 Feb;45(2):266-71. Epub 2006 Sep 7.

Bombick DW, Bombick BR, Ayres PH, Putnam K, Avalos J, Borgerding MF, Doolittle DJ. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic potential of mainstream whole smoke and smoke condensate from a cigarette containing a novel carbon filter. *Fundam Appl Toxicol.* 1997 Sep;39(1):11-7.

Bombick DW, Ayres PH, Putnam K, Bombick BR, Doolittle DJ. Chemical and biological studies of a new cigarette that primarily heats tobacco. Part 3. In vitro toxicity of whole smoke. *Food Chem Toxicol.* 1998 Mar;36(3):191-7.

Cavalieri E, Rogan E. Role of radical cations in aromatic hydrocarbon carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 1985 Dec;64:69-84.

Cavalieri EL, Rogan EG. The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacol Ther.* 1992;55(2):183-99.

Cavalieri EL, Rogan EG. Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica.* 1995 Jul;25(7):677-88.

Clive D, Spector JF. Laboratory procedure for assessing specific locus mutations at the TK locus in cultured L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutat Res.* 1975 Feb;31(1):17-29.

Clive D, Caspary W, Kirby PE, Krehl R, Moore M, Mayo J, Oberly TJ. Guide for performing the mouse lymphoma assay for mammalian cell mutagenicity. *Mutat Res.* 1987 Oct;189(2):143-56.

Curvall M, Jansson T, Pettersson B, Hedin A, Enzell CR. In vitro studies of biological effects of cigarette smoke condensate. I. Genotoxic and cytotoxic effects of neutral, semivolatile constituents. *Mutat Res.* 1985 Aug-Sep;157(2-3):169-80.

Devanesan PD, RamaKrishna NV, Todorovic R, Rogan EG, Cavalieri EL, Jeong H, Jankowiak R, Small GJ. Identification and quantitation of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed by rat liver microsomes in vitro. *Chem Res Toxicol.* 1992 Mar-Apr;5(2):302-9.

Dipple A. Reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA. *IARC Sci Publ.* 1994;(125):107-29.

Duffus JH, Nordberg M, Templeton DM. International union of pure and applied chemistry (IUPAC). Glossary of terms used in toxicology (second edition). *Pure Appl Chem.* 2007; 79(7):1153–1344.

Ellard S, Parry EM. A modified protocol for the cytochalasin B in vitro micronucleus assay using whole human blood or separated lymphocyte cultures. *Mutagenesis.* 1993 Jul;8(4):317-20.

Evans HJ, O'Riordan ML. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Mutat Res.* 1975 Jun;31(3):135-48.

Ezzati M, Lopez AD. Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. *Lancet.* 2003 Sep 13;362(9387):847-52.

Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 2000 Nov 20;455(1-2):81-95.

Geacintov NE. Is intercalation a critical factor in the covalent binding of mutagenic and tumorigenic polycyclic aromatic diol epoxides to DNA? *Carcinogenesis.* 1986 May;7(5):759-66.

Gelboin HV. Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev.* 1980 Oct;60(4):1107-66.

Hays LE, Zodrow DM, Yates JE, Deffebach ME, Jacoby DB, Olson SB, Pankow JF, Bagby GC. Cigarette smoke induces genetic instability in airway epithelial cells by suppressing FANCD2 expression. *Br J Cancer.* 2008 May 20;98(10):1653-61. Epub 2008 May 13.

Harvey RG. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Chemistry and Carcinogenicity. Cambridge Univ Press, Cambridge. 1991;11 –87.

Heddle JA. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat Res.* 1973 May;18(2):187-90.

Hecht SS, Melikian AA, Amin S. Methylchrysenes as probes for the mechanism of metabolic activation of carcinogenic methylated polynuclear aromatic hydrocarbons. *Acc Chem Res.* 1986 Jun;19(6):174–180

Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Jul 21;91(14):1194-210.

Hoffmann D, Djordjevic MV, Hoffmann I. The changing cigarette. *Prev Med.* 1997 Jul-Aug;26(4):427-34.

Channarayappa, Nath J, Ong T. Clastogenic and aneuploidogenic effects of cigarette smoke condensate, mitomycin C and vincristine sulfate. *Mutagenesis.* 1992 Nov;7(6):457-60.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Polynuclear aromatic compounds. Part I: chemical, environmental and experimental data. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemical to Man. Lyon, France. 1983 vol 32.

International Organisation for Standardisation: International Standard ISO 3308. Routine analytical cigarette-smoking machine. Definitions and standard conditions, 4th Edition. 2000.

Johnson MD, Schilz J, Djordjevic MV, Rice JR, Shields PG. Evaluation of in vitro assays for assessing the toxicity of cigarette smoke and smokeless tobacco. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Dec;18(12):3263-304.

Jongen WM, Hakkert BC, van der Hoeven JC. Genotoxicity testing of cigarette-smoke condensate in the SCE and HGPRT assays with V79 Chinese hamster cells. *Food Chem Toxicol.* 1985 Jun;23(6):603-7.

Kirkland D, Aardema M, Henderson L, Müller L. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat Res.* 2005 Jul 4;584(1-2):1-256.

Latt SA. Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974 Aug;71(8):3162-6.

Levin W, Thakker DR, Wood AW, Chang RL, Lehr RE, Jerina DM, Conney AH. Evidence that benzo(a)anthracene 3,4-diol-1,2-epoxide is an ultimate carcinogen on mouse skin. *Cancer Res.* 1978 Jun;38(6):1705-10.

Luo LZ, Werner KM, Gollin SM, Saunders WS. Cigarette smoke induces anaphase bridges and genomic imbalances in normal cells. *Mutat Res.* 2004 Oct 4;554(1-2):375-85.

McGrath TE, Wooten JB, Geoffrey Chan W, Hajaligol MR. Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from tobacco: the link between low temperature residual solid (char) and PAH formation. *Food Chem Toxicol.* 2007 Jun;45(6):1039-50. Epub 2006 Dec 24.

Mitchell AD, Auletta AE, Clive D, Kirby PE, Moore MM, Myhr BC. The L5178Y/tk+/- mouse lymphoma specific gene and chromosomal mutation assay a phase III report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 1997 Nov 27;394(1-3):177-303.

Mohtashamipur E, Mohtashamipur A, Germann PG, Ernst H, Norpoth K, Mohr U. Comparative carcinogenicity of cigarette mainstream and sidestream smoke condensates on the mouse skin. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1990;116(6):604-8.

Moktar A, Ravoori S, Vadhanam MV, Gairola CG, Gupta RC. Cigarette smoke-induced DNA damage and repair detected by the comet assay in HPV-transformed cervical cells. *Int J Oncol*. 2009 Dec;35(6):1297-304.

Moore MM, Harrington-Brock K, Doerr CL, Dearfield KL. Differential mutant quantitation at the mouse lymphoma tk and CHO hgpRT loci. *Mutagenesis*. 1989 Sep;4(5):394-403

Nishioka H, Nishi K, Kyokane K. Human saliva inactivates mutagenicity of carcinogens. *Mutat Res*. 1981 Oct;85(5):323-33.

Office of the Surgeon General. A Report of the Surgeon General: How Tobacco Smoke Causes Disease, chapter 5. 2010.
<http://www.surgeongeneral.gov/library/tobaccosmoke/report/index.html>, ke dni 15.8.2011.

Okuwa K, Tanaka M, Fukano Y, Nara H, Nishijima Y, Nishino T. In vitro micronucleus assay for cigarette smoke using a whole smoke exposure system: a comparison of smoking regimens. *Exp Toxicol Pathol*. 2010 Jul;62(4):433-40. Epub 2009 Jun 28.

Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 Aug 30;123(1):291-8.

Penning TM, Burczynski ME, Hung CF, McCoull KD, Palackal NT, Tsuruda LS. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem Res Toxicol*. 1999 Jan;12(1):1-18.

Perry P, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*. 1974 Sep 13;251(5471):156-8.

Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, and Heath C Jr. Mortality from Smoking in Developed Countries 1950-2000. Oxford Univ Press, Oxford. 1994. (Second edition; data updated 15 July 2003).

Shimada T, Yamazaki H, Foroozesh M, Hopkins NE, Alworth WL, Guengerich FP. Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. *Chem Res Toxicol*. 1998 Sep;11(9):1048-56.

Shimada T, Fujii-Kuriyama Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci*. 2004 Jan;95(1):1-6.

Shimada T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006 Aug;21(4):257-76.

Schick S, Glantz S. Philip Morris toxicological experiments with fresh sidestream smoke: more toxic than mainstream smoke. *Tob Control*. 2005 Dec;14(6):396-404.

Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res*. 1975 Feb;31(1):9-15.

Schramke H, Meisgen TJ, Tewes FJ, Gomm W, Roemer E. The mouse lymphoma thymidine kinase assay for the assessment and comparison of the mutagenic activity of cigarette

mainstream smoke particulate phase. *Toxicology*. 2006 Oct 29;227(3):193-210. Epub 2006 Jul 29.

Sierra-Torres MS, Arboleda-Moreno YY, Hoyos LS, Sierra-Torres CH. Chromosome aberrations among cigarette smokers in Colombia. *Mutat Res*. 2004 Aug 8;562(1-2):67-75.

Speit G, Habermeier B, Helbig R. Differences in the response to mutagens between two V79 sublines. *Mutat Res*. 1994 Nov;325(2-3):105-11.

Speit G, Witton-Davies T, Heepchantree W, Trenz K, Hoffmann H. Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutat Res*. 2003 Dec 9;542(1-2):33-42.

Tucker JD, Auletta A, Cimino MC, Dearfield KL, Jacobson-Kram D, Tice RR, Carrano AV. Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res*. 1993 Sep;297(2):101-80.

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *Int J Environ Res Public Health*. 2009 Feb;6(2):445-62. Epub 2009 Feb 2.

Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, Gupta PC, Hackshaw A, Matos E, Samet J, Sitas F, Smith J, Stayner L, Straif K, Thun MJ, Wichmann HE, Wu AH, Zaridze D, Peto R, Doll R. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Jan 21;96(2):99-106.

Williams GM. Methods for evaluating chemical genotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1989;29:189-211.

White PA. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutat Res*. 2002 Mar 25;515(1-2):85-98.

Wogan GN, Gorelick NJ. Chemical and biochemical dosimetry of exposure to genotoxic chemicals. *Environ Health Perspect*. 1985 Oct;62:5-18.

Wolfe AR, Smith TJ, Meehan T. Benzo[a]pyrene diol epoxide forms covalent adducts with deoxycytidylic acid by alkylation at both exocyclic amino N(4) and ring imino N-3 positions. *Chem Res Toxicol*. 2004 Apr;17(4):476-91.

Wolz L, Krause G, Scherer G. The comet assay with MCL-5 cells as an indicator of genotoxic treatment with chemicals and cigarette smoke condensates. *Altern Lab Anim*. 2002 May-Jun;30(3):331-9.

Xue W, Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Aug 1;206(1):73-93. Epub 2005 Jan 8.

Yang SK. Stereoselectivity of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Pharmacol*. 1988 Jan 1;37(1):61-70.

Zeiger E, Haseman JK, Shelby MD, Margolin BH, Tennant RW. Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. *Environ Mol Mutagen.* 1990;16 Suppl 18:1-14.

Wolz L, Krause G, Scherer G. The comet assay with MCL-5 cells as an indicator of genotoxic treatment with chemicals and cigarette smoke condensates. *Altern Lab Anim.* 2002 May-Jun;30(3):331-9.

Příloha

Příloha 1: Karcinogeny obsažené v cigaretovém kouři (dle The International Agency for Research on Cancer (IARC), 2010)

Carcinogen ^a	Quantity (per cigarette)	IARC evaluations of evidence of carcinogenicity in humans			IARC Monograph ^c (volume, year)
		In animals	In humans	IARC group ^b	
Polycyclic aromatic hydrocarbons					
Benz[<i>a</i>]anthracene	20–70 ng	Sufficient		2A	32, 1983; S7, 1987
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene	4–22 ng	Sufficient		2B	32, 1983; S7, 1987
Benzo[<i>j</i>]fluoranthene	6–21 ng	Sufficient		2B	32, 1983; S7, 1987
Benzo[<i>k</i>]fluoranthene	6–12 ng	Sufficient		2B	32, 1983; S7, 1987
Benzo[<i>a</i>]pyrene	8.5–17.6 ng	Sufficient	Limited	1	32, 1983; S7, 1987; 92, in press
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	4 ng	Sufficient		2A	32, 1983; S7, 1987
Dibenzo[<i>a,i</i>]pyrene	1.7–3.2 ng	Sufficient		2B	32, 1983; S7, 1987
Dibenzo[<i>a,e</i>]pyrene	Present	Sufficient		2B	32, 1983; S7, 1987
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	4–20 ng	Sufficient		2B	32, 1983; S7, 1987
5-methylchrysene	ND–0.6 ng	Sufficient		2B	32, 1983; S7, 1987
Heterocyclic compounds					
Furan	20–40 µg	Sufficient		2B	63, 1995a
Dibenz[<i>a,h</i>]acridine	ND–0.1 ng	Sufficient		2B	32, 1983; S7, 1987
Dibenz[<i>a,i</i>]acridine	ND–10 ng	Sufficient		2B	32, 1983; S7, 1987
Dibenzo[<i>c,g</i>]carbazole	ND–0.7 ng	Sufficient		2B	32, 1983; S7, 1987
Benzo[<i>b</i>]furan	Present	Sufficient		2B	63, 1995a
<i>N</i>-nitrosamines					
<i>N</i> -nitrosodimethylamine	0.1–180 ng	Sufficient		2A	17, 1978; S7, 1987
<i>N</i> -nitrosoethylmethylamine	ND–13 ng	Sufficient		2B	17, 1978; S7, 1987
<i>N</i> -nitrosodiethylamine	ND–25 ng	Sufficient		2A	17, 1978; S7, 1987
<i>N</i> -nitrosopyrrolidine	1.5–110 ng	Sufficient		2B	17, 1978; S7, 1987
<i>N</i> -nitrosopiperidine	ND–9 ng	Sufficient		2B	17, 1978; S7, 1987
<i>N</i> -nitrosodiethanolamine	ND–36 ng	Sufficient		2B	17, 1978; 77, 2000
<i>N'</i> -nitrosornicotine	154–196 ng	Sufficient	Limited	1	37, 1985; S7, 1987; 89, in press
4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl) 1-butanone	110–133 ng	Sufficient	Limited	1	37, 1985; S7, 1987; 89, in press
Aromatic amines					
2-toluidine	30–200 ng	Sufficient	Limited	2A	S7, 1987; 77, 2000
2,6-dimethylaniline	4–50 ng	Sufficient		2B	S7, 1993
2-naphthylamine	1–22 ng	Sufficient	Sufficient	1	4, 1974; S7, 1987
4-aminobiphenyl	2–5 ng	Sufficient	Sufficient	1	1, 1972; S7, 1987
Heterocyclic aromatic amines					
2-amino-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i>]indole	25–260 ng	Sufficient		2B	40, 1986; S7, 1987
2-amino-3-methyl-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i>]indole	2–37 ng	Sufficient		2B	40, 1986; S7, 1987
2-amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoline	0.3 ng	Sufficient		2A	S7, 1987; 56, 1993
3-amino-1,4-dimethyl-5 <i>H</i> -pyrido [4,3- <i>b</i>]indole	0.3–0.5 ng	Sufficient		2B	31, 1983; S7, 1987
3-amino-1-methyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i>]indole	0.8–1.1 ng	Sufficient		2B	31, 1983; S7, 1987
2-amino-6-methylpyrido[1,2- <i>a</i> :3', 2'- <i>d</i>]imidazole	0.37–0.89 ng	Sufficient		2B	40, 1986; S7, 1987
2-aminodipyrido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazole	0.25–0.88 ng	Sufficient		2B	40, 1986; S7, 1987
2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5- <i>b</i>]pyridine	11–23 ng	Sufficient		2B	56, 1993

Carcinogen ^a	Quantity (per cigarette)	IARC evaluations of evidence of carcinogenicity in humans			IARC Monograph ^c (volume, year)
		In animals	In humans	IARC group ^b	
Aldehydes					
Formaldehyde	10.3–25 µg	Sufficient	Sufficient	1	S7, 1987; 62, 1995b
Acetaldehyde	770–864 µg	Sufficient		2B	S7, 1987; 71, 1999
Phenolic compounds					
Catechol	59–81 µg	Sufficient		2B	S7, 1987; 71, 1999
Caffeic acid	<3 µg	Sufficient		2B	56, 1993
Volatile hydrocarbons					
1,3-butadiene	20–40 µg	Sufficient	Limited	2A	S7, 1987; 71, 1999
Isoprene	450–1,000 µg	Sufficient		2B	60, 1994; 71, 1999
Benzene	12–50 µg	Sufficient	Sufficient	1	29, 1982; S7, 1987
Nitrohydrocarbons					
Nitromethane	0.5–0.6 µg	Sufficient		2B	77, 2000
2-nitropropane	0.7–1.2 ng	Sufficient		2B	S7, 1987; 71, 1999
Nitrobenzene	25 µg	Sufficient		2B	65, 1996
Miscellaneous organic compounds					
Acetamide	38–56 µg	Sufficient		2B	S7, 1987; 71, 1999
Acrylamide	Present	Sufficient		2A	S7, 1987; 60, 1994
Acrylonitrile	3–15 µg	Sufficient		2B	S7, 1987; 71, 1999
Vinyl chloride	11–15 ng	Sufficient	Sufficient	1	19, 1979; S7, 1987
1,1-dimethylhydrazine	Present	Sufficient		2B	4, 1974; 71, 1999
Ethylene oxide	7 µg	Sufficient	Limited	1	60, 1994; S7, 1987
Propylene oxide	0–100 ng	Sufficient		2B	60, 1994; S7, 1987
Urethane	20–38 ng	Sufficient		2B	7, 1974; S7, 1987
Metals and inorganic compounds					
Arsenic	40–120 ng	Sufficient	Sufficient	1	84, 2004
Beryllium	0.5 ng	Sufficient	Sufficient	1	S7, 1987; 58, 1993
Nickel	ND–600 ng	Sufficient	Sufficient	1	S7, 1987; 49, 1990
Chromium (hexavalent)	4–70 ng	Sufficient	Sufficient	1	S7, 1987; 49, 1990
Cadmium	41–62 ng	Sufficient	Sufficient	1	S7, 1987; 58, 1993
Cobalt	0.13–0.20 ng	Sufficient		2B	52, 1991
Lead (inorganic)	34–85 ng	Sufficient	Limited	2A	23, 1980; S7, 1987; 87, in press
Hydrazine	24–43 ng	Sufficient		2B	S7, 1987; 71, 1999
Radioisotope polonium-210	0.03–1.0 picocurie	Sufficient		1	78, 2001

Source: Adapted from Hoffmann et al. 2001 and International Agency for Research on Cancer 2004 with permission from American Chemical Society, © 2001 and International Agency for Research on Cancer, © 2004.

Note: IARC = International Agency for Research on Cancer; ND = not detected; ng = nanograms; S7 = Supplement 7; µg = micrograms.

^aVirtually all these compounds are known carcinogens in experimental animals, and IARC found sufficient evidence for carcinogenicity in animals for all the compounds.

^bUsing data on cancer in humans and, in some cases, other data, IARC established classifications for compounds as group 1 (carcinogenic to humans), group 2A (probably carcinogenic to humans), and group 2B (possibly carcinogenic to humans).

^cIf more than two IARC evaluations were performed, only the two most recent monographs are listed.