

Received: 2010.04.01
Accepted: 2010.08.30
Published: 2010.10.18

Zastosowanie technik PCR w toksykologii

Application of PCR techniques in toxicology

Maja Kazubek¹, Anna Długosz¹, Krzysztof Pawlik²

¹ Katedra i Zakład Toksykologii AM we Wrocławiu

² Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Techniki biologii molekularnej znajdują coraz szersze zastosowanie w toksykologii, co spowodowało powstanie odrębnej dziedziny jaką jest toksykologia molekularna. Toksykologia molekularna zajmuje się wykrywaniem i badaniem zmian wywołanych ksenobiotykami już na poziomie molekularnym, a zwłaszcza badaniem mutacji w genomowym DNA, różnic na poziomie ekspresji mRNA czy genotypu warunkującego osobniczą wrażliwość.

W procesach aktywacji i detoksykacji ksenobiotyków, w tym leków oraz środowiskowych karcynogenów uczestniczy wiele enzymów (xenobiotic-metabolizing enzymes – XMEs). Większość substancji chemicznych wprowadzanych do naszego organizmu, niezależnie czy ma właściwości lecznicze, chorobotwórcze czy kancerogenne, wymaga aktywacji metabolicznej przez enzymy I fazy (cytochrom P-450). Kolejny proces to zwykle detoksykacja przez enzymy II fazy, głównie hydrolazy epoksydowe, transferazy glutationowe, N-acetylotransferazy czy sulfotransferazy. Techniki PCR pozwalają na precyzyjne badanie wpływu ksenobiotyków na komórki i tkanki przez badanie poziomu aktywacji genów kodujących enzymy I i II fazy, bądź przez badanie aktywności innych elementów transkryptomu. Istotne są też badania wrażliwości poszczególnych komórek lub tkanek oparte o badania obecności mutacji lub polimorfizmu genów.

W pracy przedstawiono możliwości zastosowania różnych technik PCR w toksykologii. Wykazano możliwość wykorzystania metod PCR w badaniach nad genetycznie uwarunkowaną wrażliwością na działanie ksenobiotyków, technik qPCR oraz qRT-PCR w wyszukiwaniu biomarkerów ekspozycji ze szczególnym uwzględnieniem poszczególnych izoform cytochromu P-450. Przedstawiono możliwość zastosowania techniki pokazu różnicowego w identyfikacji nowych genów aktywowanych czynnikami toksycznymi.

Słowa kluczowe:

PCR • qRT-PCR • toksykologia molekularna • biomarkery toksyczności

Summary

Molecular biology techniques have become widely used in toxicology, leading to the creation of a new science – molecular toxicology. The goal of molecular toxicology is to detect and study the changes induced by xenobiotics at the molecular level. The research scope of molecular toxicology includes examination of mutations in genomic DNA, differences in mRNA expression and study of genotype indicating individual sensitivity.

The processes of activation and detoxification of xenobiotics, drugs and environmental carcinogens involve several enzymes (xenobiotic-metabolizing enzymes – XMEs). Most of the chemicals entering our bodies, regardless of whether they have medical, pathogenic or carcinogenic properties, require metabolic activation by phase I enzymes (cytochrome P-450). In the next process the phase I products are usually detoxified by phase II enzymes, mainly by epoxide hydrolase, glutathione transferase, N-acetyltransferase or sulfotransferase. PCR techniques allow precise study of the effects of xenobiotics on cells and tissues by examining the level of activation of

genes coding for phase I and II enzymes, or by testing the activity of other elements of the transcriptome. Studies of sensitivity of individual cells or tissues based on examination of mutation or gene polymorphism presence are also relevant.

This paper presents the possibility of using various PCR techniques in toxicology and especially in the study of genetically determined sensitivity to xenobiotics. It also covers the possibilities of applying qPCR and qRT-PCR methods in the search for exposure biomarkers with particular emphasis on individual cytochrome P450 isoforms. Furthermore, it provides information about the possibility of implementing the differential display technique in the identification of new genes activated by toxic agents.

Key words: PCR • qRT-PCR • molecular toxicology • toxicity biomarkers

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=921263>

Word count: 3051

Tables: –

Figures: 2

References: 43

Adres autorki: prof. dr hab. Anna Długosz, Katedra i Zakład Toksykologii, Akademia Medyczna we Wrocławiu, ul. Traugutta 57/59, 50-417 Wrocław; e-mail: adltox@ak.am.wroc.pl

1. WSTĘP

Techniki biologii molekularnej wprowadzone do badań toksykologicznych zapoczątkowały rozwój toksykologii molekularnej. W dzisiejszych czasach, gdy jesteśmy nieustannie narażeni na szkodliwe działanie rozmaitych substancji chemicznych, toksykologia molekularna, badając zmiany już na poziomie molekularnym, poszukuje odpowiedzi na pytania: w jakich dawkach dana substancja jest szkodliwa dla indywidualnej jednostki, czy na każdego z nas ksenobiotyk działa w takim samym stopniu, jakie uszkodzenia wywołuje stałe narażenie na dany czynnik. W zakres toksykologii molekularnej wchodzi techniki, które być może umożliwią w przyszłości wykrycie, wcześniej niż konwencjonalnymi metodami, zmian wywołanych substancjami chemicznymi, czy też pozwolą przewidywać wpływ danego czynnika chemicznego na nasz organizm w zależności od zmienności osobniczej.

Ekspresja genów tworzących genom komórkowy podlega zmianom pod wpływem różnych sygnałów pochodzenia wewnętrznego i zewnętrznego. Sygnały te mogą zmieniać zarówno syntezę mRNA (działać na poziomie transkrypcji), jak i syntezę białka (działać na poziomie translacji) [25], bądź wywoływać zmiany na poziomie DNA (mutacje punktowe). Obecnie toksykologowie coraz częściej sięgają po metody biologii molekularnej w badaniach nad stopniem toksyczności leków, substancji przyjmowanych z pożywieniem czy też czynników środowiskowych.

Jedną z technik wykorzystywanych w toksykologii molekularnej stała się metoda łańcuchowej reakcji polimerazy PCR (polymerase chain reaction), której niewątpliwymi zaletami są szybkość przeprowadzania analiz, niewielka ilość materiału niezbędnego do wykonania badania, powtarzalność wyników, dokładność oraz wysoka czułość.

Możliwe jest, że coraz szerzej stosowane w toksykologii techniki PCR pozwolą nam w przyszłości poznać

odpowiedź na pytanie czy praca w określonym narażeniu zawodowym wywoła chorobę. Poznanie wrażliwości osobniczej pozwoliłoby uniknąć wielu skutków wywołanych substancjami chemicznymi przyjmowanymi z pożywieniem czy też w postaci leków, a znacznie czulsze metody diagnostyczne umożliwiłyby wykrycie zmian chorobowych na odwracalnym jeszcze poziomie.

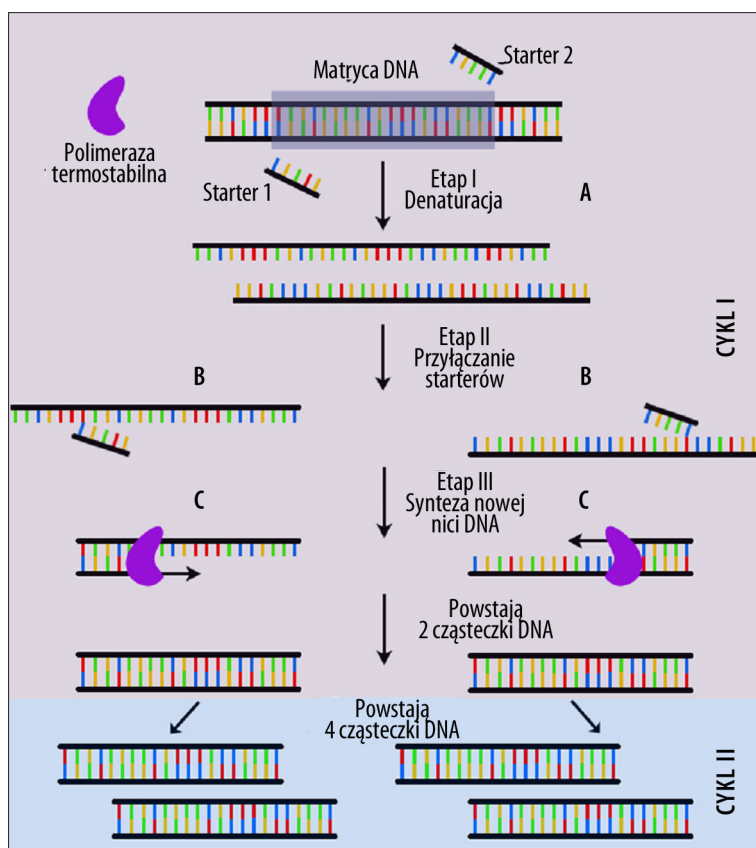
Zasada metody PCR

Rewolucją w dziedzinie biologii molekularnej było opracowanie w 1983 r. przez Mullisa łańcuchowej reakcji polimerazy PCR umożliwiającej uzyskanie dużej liczby kopii dowolnego fragmentu DNA. Ten przełomowy wynalazek, który spowodował szybki rozwój biologii molekularnej i dziedzin pokrewnych, został w 1993 r. uhonorowany Nagrodą Nobla [4,28].

Metoda PCR pozwala na szybkie powielenie wybranego odcinka DNA. Mieszanina substratów: nukleotydów, starterów, matrycy DNA i enzymu – termostabilnej polimerazy poddana zostaje działaniu cyklicznie zmieniającej się temperatury. Do przeprowadzenia reakcji PCR konieczne jest zaprojektowanie dwóch krótkich odcinków DNA, komplementarnych do sekwencji okalających powielany przez nas fragment, zwanych starterami (ryc. 1, starter 1, 2). Następnie w pierwszym cyklu reakcji PCR, podczas 3-częściowego procesu (ryc. 1, etap I, II, III) powstają 2 cząsteczki powielanego DNA. W każdym kolejnym cyklu powstaje 2ⁿ cząsteczek DNA (ryc. 1, cykl II), co umożliwia uzyskanie w krótkim czasie wielu kopii badanego fragmentu DNA [30].

Rodzaje technik PCR

Obecnie 17 lat po odkryciu podstawowej reakcji PCR istnieje już wiele odmian tej metody, pozwalających na coraz to nowe jej zastosowania. Najbardziej znane to **RT-PCR** (reverse transcription – PCR), modyfikacja wykorzystująca



Ryc. 1. Schemat powielania fragmentu DNA metodą PCR. Podczas pierwszego etapu reakcji PCR (etap I) następuje rozplecenie podwójnej helisy matrycowego DNA w temp. 94–98°C (A). W kolejnym etapie reakcji (etap II), podczas którego następuje obniżenie temperatury (40–70°C), do pojedynczej nici DNA wiążą się startery (komplementarne do sekwencji okalających namnażany fragment). W trzecim, ostatnim etapie (etap III), temperatura zostaje podwyższona do ok. 72°C, co powoduje elongację starterów – syntezę nowej nici DNA na ograniczonym starterami fragmencie z udziałem termostabilnej polimerazy. Proces ten jest powtarzany cyklicznie (C) [4,8,28]

mRNA jako matrycę [13], **nested-PCR**, metoda polegająca na zastosowaniu dwóch par starterów różniących się temperaturami topnienia, z których tzw. startery zewnętrzne służą do amplifikacji znacznie dłuższego fragmentu DNA, podczas gdy druga para, tzw. startery wewnętrzne, służy do powielenia znacznie krótszego odcinka znajdującego się w obrębie powielonego wcześniej regionu dłuższego. Metoda ta wykorzystywana powszechnie w diagnostyce pozwala wyeliminować możliwość kontaminacji. Używając do reakcji kilku par starterów, możliwe jest jednoczesne powielenie kilku regionów genomu, do czego wykorzystywany jest tzw. **multipleksowy PCR** (multiplex – PCR), stosowany najczęściej do wykrycia nieswoistych produktów. Kolejną odmianą jest **ASA-PCR** (allele – specific amplification – PCR), gdzie stosowane są specyficzne startery, za pomocą których możliwe jest wykrycie zarówno alleli zmutowanych, jak i prawidłowych. Metoda ta znajduje zastosowanie w wykrywaniu mutacji punktowych poza miejscami restrykcyjnymi. Mutacje punktowe mogą być rozpoznane również za pomocą **SSCP-PCR** (single strand conformation polymorphism – PCR). Istotą tej techniki jest poddanie produktu reakcji PCR denaturacji do pojedynczej nici, a następnie przeprowadzenie elektroforezy w żelu akrylamidowym w warunkach niedenaturujących, co pozwala przyjąć cząsteczki jednoniciowego DNA charakterystyczne dla jej sekwencji struktury przestrzennej [31,34]. Różnice w strukturze wywołane nawet pojedynczą mutacją spowodują odmienną ruchliwość elektroforetyczną. Wykrycie mutacji punktowych w obrębie sekwencji rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne bądź mutacji prowadzących do powstania nowych miejsc restrykcyjnych umożliwia **PCR-RFLP** (restriction fragment length

polymorphism – PCR) na podstawie analizy fragmentów DNA po cięciu danym enzymem restrykcyjnym. Celem **RACE-PCR** (rapid amplification of cDNA ends – PCR), czyli szybkiej amplifikacji końców cDNA, jest poznanie sekwencji jednego z końców badanego fragmentu mRNA, w zależności od analizowanego końca stosowana jest metoda 3'RACE lub 5'RACE [12].

Opisane dotychczas metody służą wyłącznie do analizy jakościowej sekwencji DNA, znacznie szersze zastosowanie znajdują techniki PCR pozwalające określić początkową ilość DNA, jak w przypadku **konkurującego PCR** (competitive – PCR) czy też pozwalające na monitorowanie ilości DNA poddawanego amplifikacji w czasie rzeczywistym za pomocą najnowszej i najdoskonalszej dotychczas metody zwanej **qPCR** (quantitative lub real time – PCR) [32,40].

Jeśli materiałem wyjściowym jest RNA stosowana jest metoda **qRT-PCR**, której pierwszym etapem jest synteza cDNA komplementarnego do matrycy mRNA za pomocą odwrotnej transkryptazy. W przypadku konkurującego PCR w mieszaninie reakcyjnej umieszcza się badany DNA oraz DNA genu referencyjnego o znanym stężeniu. Liczba sekwencji badanej w próbce określa się porównując ilości produktów sekwencji badanej i kontrolnej powstałych podczas reakcji PCR. Stosując qPCR możliwa jest stała kontrola ilości amplifikowanego DNA na podstawie pomiaru sond lub barwników wprowadzonych do reakcji, które łącząc się z powielanym DNA, emitują fluorescencję proporcjonalnie do ilości powstającego w każdym cyklu produktu (ryc. 2, ilustracja G) [17,18]. Pomiar może zostać dokonany w sposób względny w stosunku do

geny o stałej ekspresji w warunkach eksperymentu, tzw. geny referencyjne (housekeeping gene), którym może być dowolny gen stale i jednolicie ekspresjonowany w różnych stadiach życia komórki np. β -aktyna, 18S rRNA, dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa (GADPH) lub cyklofilina [37]. Otrzymany wynik wskazuje wtedy ile razy ekspresja badanego genu jest silniejsza/słabsza od ekspresji genu referencyjnego. Zastosowanie analizy względnej pozwala na wyznaczenie wyjściowej ilości materiału genetycznego biorącego udział w reakcji w jednostkach rzeczywistych, czyli liczbie kopii badanej sekwencji względem określonej liczby ng całkowitego DNA lub RNA w przeliczeniu na komórkę, mililitr krwi lub gram tkanki [43]. Metoda qPCR służy nie tylko do ilościowej analizy badanego fragmentu, jest również wykorzystywana do rozróżniania alleli genów polimorficznych. W tym przypadku do przeprowadzenia reakcji niezbędne są startery lub sondy swoiste dla genu zmutowanego i dla genu typu dzikiego. Wówczas identyfikacja homozygot allelu zmutowanego i dzikiego oraz heterozygot przeprowadzana jest na podstawie krzywej topnienia (ryc. 2, ilustracja E) [22,32,40].

Rycina 2 przedstawia różne rodzaje technik PCR mogących znaleźć zastosowanie w toksykologii, w badaniach nad oddziaływaniem różnych substancji na poziomie molekularnym. Na schemacie przedstawiono przykładowe wyniki elektroforezy w żelu agarozowym dla różnych odmian PCR (ryc. 2, ilustracje A–D, F, H). Produkty zgodne wielkością z kontrolą pozytywną, świadczą o powstaniu pożądanego fragmentu DNA w próbce badanej. Brak prążka lub powstanie fragmentów o różnej wielkości (odmiennej od kontroli pozytywnej) spowodowane jest wystąpieniem mutacji w badanym fragmencie DNA (ryc. 2, ilustracje A–D). Poziom ekspresji danego białka, można określić na podstawie ilości mRNA w komórce. W tym celu izolowany zostaje mRNA, przepisany za pomocą enzymu odwrotnej transkryptazy na cDNA i powielony z użyciem reakcji PCR. Intensywność prążka jest proporcjonalna do intensywności ekspresji badanego polipeptydu (ryc. 2, ilustracje F, H). W metodzie qPCR źródłem informacji o badanym materiale jest wykres zmian w czasie rzeczywistym (ryc. 2, ilustracje E, G).

Inną metodą opartą o technikę PCR jest metoda pokazu różnicowego (differential display), pozwalająca na badanie różnic w ekspresji wielu genów jednocześnie w badanej populacji. Technika pokazu różnicowego polega na amplifikacji produktów na matrycy jednoniciowego cDNA przepisane go z mRNA pochodzącego z dwóch różnych populacji komórek za pomocą różnych kombinacji starterów oligonukleotydowych. Produkty amplifikacji, podobnie jak w przypadku pozostałych odmian PCR, są rozdzielane w żelu poliakrylamidowym. Zidentyfikowane różnice podane są dalszej analizie, np. sekwencjonowaniu [3,23,24].

2. ZNACZENIE TECHNIK PCR W TOKSYKOLOGII

W metabolizmie ksenobiotyków uczestniczy wiele enzymów (xenobiotic-metabolizing enzymes – XMEs) biorących udział zarówno w procesach aktywacji, jak i detoksykacji ksenobiotyków, w tym leków oraz środowiskowych karcynogenów. Większość substancji chemicznych wprowadzanych do naszego organizmu, niezależnie czy ma właściwości lecznicze czy kancerogenne wymaga aktywacji

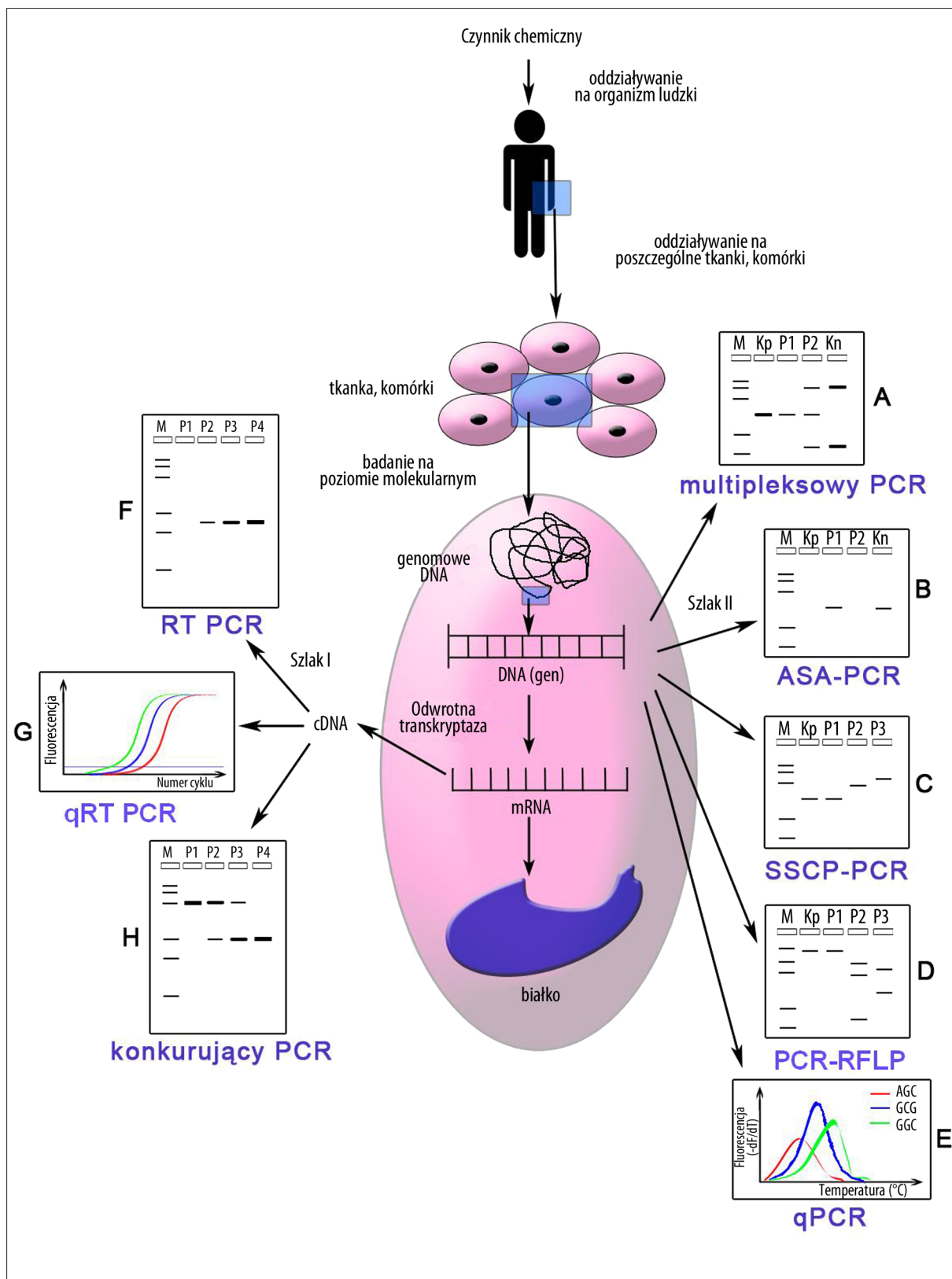
metabolicznej przez enzymy I fazy (cytochrom P-450). Kolejny proces to zwykle detoksykacja przez enzymy II fazy, głównie hydrolazy epoksydowe, transferazy glutationowe, N-acetylotransferazy czy sulfotransferazy [43]. Techniki PCR pozwalają m.in. na badanie mutacji genów kodujących te enzymy, czyli podatność organizmu na działanie ksenobiotyków i ich działanie toksyczne.

Genetycznie uwarunkowana wrażliwość na działanie ksenobiotyków – polimorfizm

Znaczący wpływ na toksyczność związków ma skuteczność detoksykacji drugiej fazy, a zwłaszcza uwarunkowana genetycznie aktywność enzymów z grupy transferaz. S-transferazy glutationowe (GST) to wielogenowa rodzina białek odpowiedzialnych za procesy detoksykacji, w szczególności za sprzężanie z glutationem kancerogennych amin lub węglowodorów [15]. Mutacje genów *GSTM1* (S-transferaza glutationowa mi 1), *GSTT1* (S-transferaza glutationowa theta 1) czy *GSTP1* (S-transferaza glutationowa pi), kodujących transferazy, powodują zmniejszenie lub całkowity brak aktywności GST, co zmienia wrażliwość na niektóre ksenobiotyki. Wykorzystując metodę PCR można określić różnice osobnicze w obrębie genów kodujących enzymy z grupy transferaz warunkujące predyspozycje danych osób na zapadalność na raka, czy też na inne choroby wywołane oddziaływaniem ksenobiotyków na nasz organizm.

Badania wskazują, że występowanie mutacji w obrębie genu *M1* transferazy glutationowej (*GSTM1*) znacząco wpływa na dzienne pobranie kancerogenów środowiskowych [6]. Gen *GSTM1* odpowiada za aktywność S-transferazy glutationowej. Potwierdzono to po zbadaniu zależności między genotypem a zapadalnością na raka pęcherza moczowego u ludzi. Posługując się techniką konkurującego PCR sprawdzono obecność lub brak genu *GSTM1* w grupie badanej z zaawansowanym rakiem pęcherza oraz w grupie kontrolnej bez zmian nowotworowych. Zaobserwowano, że genotyp *GSTM1* 0/0 (brak genu *GSTM1*) warunkuje 70% wzrost zapadalności na raka pęcherza.

GST bierze udział w procesie detoksykacji karcynogenów zawartych w dymie papierosowym, dlatego zbadano zapadalność na raka pęcherza moczowego wśród palaczy. Wyniki wykazały, że wśród osób z genotypem *GSTM1* 0/0 zapadalność na raka pęcherza była zdecydowanie większa u palących niż niepalących [29]. W innych badaniach, wykazano zależność między zapadalnością na raka płuc wśród biernych palaczy poddanych długotrwałej ekspozycji na dym papierosowy a występowaniem polimorfizmu genów S-transferazy glutationowej. Wśród biernych palaczy, u których stwierdzono występowanie polimorfizmu genu *GSTM1*, ryzyko zapadalności na raka płuc zwiększyło się 2–3-krotnie [42]. Ponieważ próby pobierano częściowo od nieżyjących już pacjentów bądź z tkanek zakonserwowanych w parafinie metoda PCR znana jako nested PCR została wykorzystana w celu zwiększenia ilości materiału genetycznego do wykonywania dalszych analiz. Natomiast za pomocą ilościowego RT-PCR zostały oznaczone mutacje *GSTM1*. Badania nad zaćmą starczą wśród Egipcjan wykazały natomiast, że u osób z genotypem *GSTM1* 0/0 ryzyko zachorowań zmalało. Wykorzystując metodę multiplex PCR, wykazano, że delecja genu *GSTM1* ma działanie



Ryc. 2. Schemat zastosowania technik PCR. Badanie zmian w DNA (szlak I), badanie zmian w ekspresji mRNA (szlak II); M – marker DNA, K_p – kontrola pozytywna, K_n – kontrola negatywna, P1, P2, P3 – próby badane

ochronne, podczas gdy u osób posiadających zarówno gen *GSTM1* jak i *GSTT1* ryzyko zachorowań na zaćmę starczą

istotnie wzrosło [1]. Jedną z głównych przyczyn zaćmy starczej może być stres oksydacyjny. Enzymy z rodziny GST

biorą udział w detoksykacji reaktywnych form tlenu [16]. Wyniki powyższych badań wskazują, że enzymy tej grupy mogą nie tylko być zaangażowane w procesy detoksykacji, ale też aktywacji. Badania wśród Włochów wykazały brak związku między zapadalnością na zaćmę a genotypem *GSTM1* [2], natomiast wśród Japończyków będących nościcielami delekcji genu *GSTM1* stwierdzona została zwiększona zapadalność na tę chorobę [33].

Metody PCR wykorzystano także do zbadania acetylotransferazy. Stosując techniki PCR-RFLP, wykazano zwiększoną zapadalność osób z mutacją alleli N-acetylotransferazy (NAT2) na raka pęcherza indukowanego aminami aromatycznymi [5]. DNA został wyizolowany z limfocytów krwi obwodowej, poddany reakcji PCR, a następnie strawiony enzymami restrykcyjnymi charakterystycznymi dla każdego z alleli. W ten sposób zidentyfikowano trzy allele (M1, M2 i M3) odpowiedzialne za wolny fenotyp acetylacji amin arylowych, co korelowało z zapadalnością na raka wśród ich nosicieli. Badania wykazały swoistość NAT2 w detoksykacji karcynogennych aryloamin i w bioaktywacji N-hydroksylowych pochodnych amin heterocyklicznych obecnych w diecie [5].

Analizując wyniki powyższych doświadczeń można wysunąć hipotezę, że ryzyko wystąpienia raka czy też zachorowań u osób narażonych na stałe działanie toksycznych czynników środowiskowych jest ściśle związane ze zmiennością osobniczą. Analiza genomu metodą PCR pozwala w takich przypadkach na podział osobniczy ze względu na podatność na różne choroby.

Badanie wpływu ksenobiotyków na ekspresję białek i poziom mRNA – biomarkery ekspozycji

Metody PCR umożliwiają badanie wpływu toksyn na ekspresję genów, także przez oznaczanie poziomu mRNA. Ze względu na niedokładność podstawowej metody RT-PCR większe znaczenie ma metoda qRT-PCR.

Toksyczne działanie czynników chemicznych można określić przez badanie różnic w poziomie ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w ich metabolizmie. Tak zwane biomarkery ekspozycji, czyli białka których ekspresja koreluje ze skutkami toksycznymi [38], wykorzystywane są w diagnostyce i badaniach populacyjnych jako markery PCR. Technika pozwalająca określić zmiany w syntezie białek na poziomie transkrypcji genów odpowiedzialnych za ich wytwarzanie jest qRT-PCR. Liczba cząsteczek mRNA powstałych podczas transkrypcji jest określona dla danej komórki, a tym samym dla tkanki, organu i całego organizmu w określonym stanie fizjologicznym. Komórki w odpowiedzi na działanie określonego czynnika (ksenobiotyku) uruchamiają bądź też zatrzymują transkrypcję genów, zmieniając w ten sposób skład transkryptomu. Badania na poziomie mRNA pełnią rolę diagnostyczną oraz umożliwiają badanie zmian aktywności genów wywołanych działaniem toksycznych substancji chemicznych [20,41].

Stosując qRT-PCR wykazano zależną od czasu i dawki różnicę w ekspresji genów wątrobowych u myszy przyjmujących etynyloestradiol [7]. Zidentyfikowano potencjalne swoiste tkankowo biomarkery ekspozycji na etynyloestradiol,

które można wykorzystać w badaniach nad mechanizmami zaburzeń endokrynologicznych wywołanych przez ksenobiotyki i produkty naturalne. Stosując metodę qRT-PCR zbadano estrogenozależną ekspresję zewnątrzkomórkowej oraz mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej (ecSOD – extracellular oraz MnSOD – mitochondrial manganese). Wykazano, że wzrost poziomu estrogenu u ludzi powoduje zwiększoną ekspresję mRNA ecSOD oraz MnSOD w monocytach [36].

Nerki są jednym z głównych narządów wydalania toksyn, niestety wczesne wykrycie uszkodzeń tego organu jest często bardzo trudne. Najnowsze badania na szczurach [19] wykazują jednak, że metoda qRT-PCR umożliwia ich wczesne wykrycie. W badaniach tych szczurom podano substancje nefrotoksyczne w dwóch różnych dawkach przez 1, 3 i 14 dni, a następnie zanalizowano potencjalne markery nefrotoksyczności Kim-1 (kidney injury molecule-1), Lcn-1 (lipocalin-2), clusterin i Timp-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1) w nerkach oraz moczu stosując test ELISA, metody immunohistochemiczne i qRT-PCR. Zmiany na poziomie molekularnym w ekspresji białek wykryte metodą qRT-PCR korelowały z wynikami badań histopatologicznych jednak zostały wykryte wcześniej i już po podaniu znacznie mniejszych dawek.

Izoenzymy zespołu CYP

Cytochromy P450 (CYP) należą do grupy enzymów biorących udział prawie w 80% reakcji metabolizmu fazy I leków. Dotychczas u ludzi zidentyfikowano około 39 aktywnych izoform enzymów CYP w jelitach, wątrobie, płucach, mózgu i nerkach. Enzymy te należą do głównych składowych systemu obrony organizmu przeciw wielu ksenobiotykom. Ekspozycja na związki chemiczne często objawia się indukcją enzymów CYP. Ponieważ wzrost aktywności enzymów P450 następuje w odpowiedzi na ksenobiotyk, badanie poziomu ekspresji poszczególnych izoform P450 w tkankach, umożliwia rozpoznanie szkodliwego wpływu danej substancji na organizm [13,21]. Jeszcze do niedawna pomiar stopnia indukcji cytochromu P450 wymagał zastosowania technik Northern i Western blotting, testów z immunosorbentami (ELISA), albo testów aktywności enzymatycznej. Metody te wprawdzie pozwalają na rozróżnienie izoform genu P450, jednak nie jest możliwe precyzyjne oznaczenie ilościowe. Obecnie, ilościowe badanie ekspresji poszczególnych genów P450 możliwe jest przez zastosowanie metody qRT-PCR [18,39].

Większość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) powszechnie obecnych w dymie z pieców koksowniczych, w dymie papierosowym, w spalinach silników wysokoprężnych oraz w przypalonym mięsie jest potencjalnymi karcynogenami [16]. Jednym z nich jest 3-metylocholanren (MC). Metabolizm MC przez enzymy CYP prowadzi do powstania wysoce reaktywnych półproduktów, które łącząc się kowalencyjnie z DNA często prowadzi do karcynogenezy [13]. Najnowsze badania *in vitro* [10] dowiodły, że MC wywołuje trwałą indukcję ekspresji *CYP1A1* w ludzkich komórkach raka wątroby HepG2 (human hepatoma cells). Wykorzystując technikę qRT-PCR oznaczono poziom ekspresji mRNA *CYP1A1* wyizolowanego z komórek HepG2 wystawionych na działanie MC. Zaobserwowano 8–20-krotny wzrost ekspresji w porównaniu z komórkami

kontrolnymi (komórki HepG2 poddane działaniu DMSO), utrzymujący się na stałym poziomie przez 96 h.

Wykrywanie genów aktywowanych przez określone czynniki chemiczne

Reakcja PCR jest również niezawodną metodą w poszukiwaniach nowych genów, których ekspresja wywoływana jest substancjami chemicznymi. Metoda pokazu różnicowego (differential display) mRNA służy do identyfikacji nowych genów bądź też wykazania różnic w ekspresji mRNA przez porównanie wyników ekspresji w dwóch próbach, tj. badanej, wystawionej na działanie danego czynnika toksycznego i kontrolnej [23,27]. Analiza zmian w ekspresji genów (pobudzenie, zahamowanie bądź utrzymywanie na stałym poziomie) w komórkach eksponowanych na działanie różnych czynników chemicznych jest ważnym zadaniem toksykologii molekularnej.

Metodą pokazu różnicowego zbadano ekspresję genów w mózgu szczurów po zażyciu kokainy lub amfetaminy [9]. Wyizolowano RNA z mózdzku, prądkowia i hipokampa szczurów godzinę po iniekcji dootrzewnowej, jednorazowej dawki amfetaminy, kokainy i roztworu soli jako kontroli, a następnie przeprowadzono pokaz różnicowy PCR. Otrzymano 12000 produktów PCR z czego 0,05% wykazywało różnice w ekspresji po zastosowaniu amfetaminy lub kokainy. Wyniki wskazują, że metoda pokazu różnicowego PCR może być wykorzystywana w celu wykazania swoistych zmian na poziomie transkryptomu wywołanych działaniem substancji chemicznej. Tą metodą wykryto również zmiany w ekspresji genów u ludzi chorych na raka mózgu [35].

Wykorzystując qRT-PCR zbadano ekspresję genów wywołaną oksydowanymi fosfolipidami (OxPAPC) *in vitro* i *in vivo* w porównaniu do ekspresji wywołanej przez lipopolisacharydy (LPS) [22]. W badaniach nad wpływem OxPAPC na ludzkie komórki śródbłonka żyły pępowinowej (human umbilical vein endothelial cells – HUVEC) oraz na myszy wykazano przydatność metody qRT-PCR zarówno w analizie *in vitro* jak i *in vivo*. Wykazano, że obydwa związki zarówno OxPAPC and LPS już po trzech godzinach po podaniu indukują ekspresję EGR-1 (early growth response factor 1) oraz MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) w komórkach HUVEC, natomiast u myszy ekspresję homologu MCP-1 w wątrobie i sercu.

Znaleziono również różnice w ekspresji oksygenazy hemowej 1 (HO-1). Tylko OxPAPC, ale nie LPS, wywoływał indukcję ekspresji oksygenazy w komórkach HUVEC, aortcie, sercu, wątrobie oraz w wyizolowanych krwinkach. Zastosowanie metody qRT-PCR pozwoliło na wykazanie znaczących różnic w ekspresji genów w różnych komórkach i narządach mysich poddanych działaniu oksydowanych fosfolipidów oraz LPS.

Bardzo czułą metodą qRT-PCR zbadano ekspresję mRNA enzymów I i II fazy biotransformacji oraz białkowych transporterów błonowych pod wpływem rifampicyny i omeprazolu w ludzkich hepatocytach. Wykazano, że indukują one odmienne izoenzymy i białka, których stężenia wracają do normy po usunięciu induktora [30].

Te badania przedstawiają korzyści wynikające ze stosowania ilościowego RT-PCR do analizy różnic w ekspresji genów wywołanej różnymi bodźcami chemicznymi.

3. PODSUMOWANIE

Od wynalezienia przez K.B Mullisa metody PCR upłynęło już wiele lat, a metoda ta wciąż jest rozwijana, ulepszana i wykorzystywana w coraz to innych dziedzinach nauki. Rozwój technik PCR pozwala na odkrywanie coraz to nowych zastosowań tej metody, a co za tym idzie rozwój wielu dziedzin nauki, w tym także toksykologii. Dzięki zastosowaniu metody PCR, a przede wszystkim bardzo czułej qPCR w toksykologii możliwe staje się wykrycie zmian wywołanych przez daną substancję chemiczną w bardzo krótkim czasie, we wczesnym, jeszcze uleczalnym stadium. Techniki PCR pozwalają na wykrycie zmian chorobowych wywołanych już niewielkimi dawkami danej substancji, co ułatwi badania nad dawkowaniem leków. Być może prawdopodobne stanie się w przyszłości określenie czy dana wrażliwość osobnicza w połączeniu z ekspozycją na dany ksenobiotyk warunkuje zachorowalność na raka bądź inne zmiany chorobowe. Badanie nowych biomarkerów ekspozycji technikami PCR pozwoliłoby na usprawnienie diagnostyki toksykologicznej. Wykrycie nowych białek indukowanych narażeniem na dany czynnik chemiczny pozwoli być może uzyskać informacje na temat mechanizmu działania danego ksenobiotyku w całej populacji bądź, badając jednocześnie uwarunkowania genetyczne, na indywidualną jednostkę.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abdel Azeem A.A., Mahmoud A.A., Salaheldine M.M., Amr K.: Implication of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms in the development of senile cataract among Egyptians. Bratisl. Lek. Listy, 2009; 110: 678–683
- [2] Alberti G., Oguni M., Podgor M.: Glutathione S-transferase M1 genotype and age-related cataracts. Lack of association in an Italian population. Invest. Ophthalmol. Vic. Sci., 1996; 37: 1167–1173
- [3] Bauer D., Muller H., Reich J., Riedel H., Ahrenkiel V., Warthoe P., Strauss M.: Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). Nucleic Acids Res., 1993; 21: 4272–4280
- [4] Bej A.K., Mahubani M.H., Atlas R.M.: Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 1991; 26: 301–334
- [5] Bell D.A., Taylor J.A., Butler M.A., Stephens E.A., Wiest J., Brubaker L.H., Kadlubar F.F., Lucier G.W.: Genotype/phenotype discordance for human arylamine N acetyltransferase (NAT2) reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans. Carcinogenesis, 1993; 14: 1689–1692
- [6] Bell D.A., Taylor J.A., Paulson D.F., Robertson C.N., Mohler J.L., Lucier G.W.: Genetic risk and carcinogen exposure: A common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. J. Natl. Cancer Inst., 1993; 85: 1159–1164
- [7] Boverhof D.R., Fertuck K.C., Burgoon L.D., Eckel J.E., Gennings C., Zacharewski T.R.: Temporal- and dose-dependent hepatic gene expression changes in immature ovariectomized mice following exposure to ethynyl estradiol. Carcinogenesis, 2004; 25: 1277–1291
- [8] Cotter F.E.: The role of polymerase chain reaction in pathology. J. Histotechnol., 1994; 17: 253–259

- [9] Douglass J., McKinzie A.A., Couceyro P.: PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J. Neurosci.*, 1996; 15: 2471–2481
- [10] Fazili I.S., Jiang W., Wang L., Felix E.A., Khatlani T., Coumoul X., Barouki R., Moorthy B.: Persistent induction of cytochrome P4501A1 in human hepatoma cells by 3-methylcholanthrene: Evidence for sustained transcriptional activation of the CYP1A1 promoter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2010; 333: 99–109
- [11] Felley-Bosco E., Pourzand C., Zijlstra J., Amstad P., Cerutti P.: A genotypic mutation system measuring mutations in restriction recognition sequences. *Nucleic Acids Res.*, 1991; 19: 2913–2919
- [12] Fromont-Racine M., Bertrand E., Pictet R., Grange T.: A highly sensitive method for mapping the 5' termini of mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 1993; 7: 1683–1684
- [13] Guengerich F.P.: Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res.*, 1988; 48: 2946–2954
- [14] Hayashi K.: PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl.*, 1991; 1: 34–38
- [15] Hayes J.D., Flangan J.U., Jowsey I.R.: Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2005; 45: 51–88
- [16] Hemminki K.: Environmental carcinogens. W: *Handbook of Experimental Pharmacology* (red.: Cooper C.S., Grover P.L.), 33–61, Springer Verlag
- [17] Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R.: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 1992; 10: 413–417
- [18] Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R.: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 1993; 11: 1026–1030
- [19] Hoffmann D., Adler M., Vaidya V., Rached E., Mulrane L., Gallagher W.M., Callanan J.J., Gautier J.C., Matheis K., Staedtler F., Dieterle F., Brandenburg A., Sposny A., Hewitt P., Ellinger-Ziegelbauer H., Bonventre J.V., Dekant W., Mally A.: Performance of novel kidney biomarkers in preclinical toxicity studies. *Toxicol. Sci.*, 2010; 116: 8–22
- [20] Ingelman-Sundberg M.: Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology*, 2002; 181–182: 447–452
- [21] Ingelman-Sundberg M.: Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2004; 25: 193–200
- [22] Kadl A., Huber J., Gruber F., Bochkov V.N., Binder B.R., Leitinger N.: Analysis of inflammatory gene induction by oxidized phospholipids *in vivo* by quantitative real-time RT-PCR in comparison with effects of LPS. *Vascular Pharmacology*, 2002; 38: 219–227
- [23] Liang P., Pardee A.B.: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992; 257: 967–971
- [24] Liang P., Pardee A.B.: Differential display. A general protocol. *Mol. Biotechnol.*, 1998; 10: 261–267
- [25] Lutz W., Kur B.: Toksykogenomika. Nowe perspektywy toksykologii molekularnej. *Medycyna Pracy*, 2004; 55: 193–202
- [26] Malarkey D.E., Maronpot R.R.: Polymerase chain reaction and *in situ* hybridization: applications in toxicological pathology. *Toxicol. Pathol.*, 1996; 24: 13–23
- [27] Mou L., Miller H., Li J., Wang E., Chalifour L.: Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994; 199: 564–569
- [28] Mullis K.B., Faloona F.A.: Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 1987; 155: 335–350
- [29] Muscat J.E., Pittman B., Kleinman W., Lazarus P., Stellman S.D., Richie J.P. Jr.: Comparison of CYP1A2 and NAT2 phenotypes between black and white smokers. *Biochem. Pharmacol.*, 2008; 76: 929–937
- [30] Nishimura M., Yoshitsugu H., Naito S., Hiraoka I.: Evaluation of gene induction of drug-metabolizing enzymes and transporters in primary culture of human hepatocytes using high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi*, 2002; 122: 339–361
- [31] Papp A.C., Pinsonneault J.K., Cooke G., Sadée W.: Single nucleotide polymorphism genotyping using allele-specific PCR and fluorescence melting curves. *Biotechniques*, 2003; 34: 1068–1072
- [32] Riedy M.C., Timm E.A. Jr, Stewart C.C.: Quantitative RT-PCR for measuring gene expression. *Biotechniques*, 1995; 18: 70–74
- [33] Sekine Y., Hommura S., Harada S.: Frequency of glutathione S-transferase 1 gene deletion and its possible correlation with cataract formation. *Exp. Eye Res.*, 1995; 60: 159–163
- [34] Sheffield V.C., Beck J.S., Kwitek A.E., Sandstrom D.W., Stone E.M.: The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, 1993; 16: 325–332
- [35] Shinoura N., Shamraj O.I., Hugenholz H., Zhu J.G., McBlack P., Warnick R., Tew J.J., Wani M.A., Menon A.G.: Identification and partial sequence of a cDNA that is differentially expressed in human brain tumors. *Cancer Lett.*, 1995; 89: 215–221
- [36] Strehlow K., Rotter S., Wassmann S., Adam O., Grohé C., Laufs K., Böhm M., Nickenig G.: Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ. Res.*, 2003; 93: 170–177
- [37] Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., De Borman B., Coumans B., Hennen G., Grisar T., Igout A., Heinen E.: Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.*, 1999; 75: 291–295
- [38] Timbrell J.A.: Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, 1998; 129: 1–12
- [39] Vanden Heuvel J.P., Clark G.C., Kohn M.C., Tritscher A.M., Greenlee W.F., Lucier G.W., Bell D.A.: Dioxin-responsive genes: Examination of dose-response relationships using quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res.*, 1994; 54: 62–68
- [40] Walker N.J.: Real-time and quantitative PCR: Applications to mechanism-based toxicology. *J. Biochem. Molecular Toxicology*, 2001; 15: 121–127
- [41] Wang E.J., Snyder R.D., Fielden M.R., Smith R.J., Gu Y.Z.: Validation of putative genomic biomarkers of nephrotoxicity in rats. *Toxicology*, 2008; 246: 91–100
- [42] Wenzlaff A.S., Cote M.L., Bock C.H., Land S.J., Schwartz A.G.: GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms, environmental tobacco smoke exposure and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogenesis*, 2005; 26: 395–401
- [43] Wyska E., Rosiak M.: Zastosowanie łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR) w badaniach farmakokinetycznych. *Postepy Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 660–666

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.