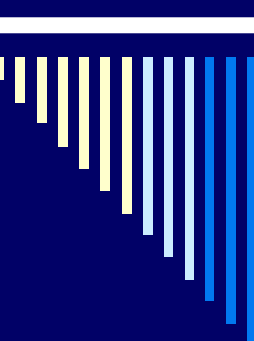


HLAVNÍ MECHANISMY TOXICITY CIZORODÝCH LÁTEK

HLAVNÍ MECHANISMY TOXICITY XENOBIOTIK

- „Přímé“ mutageny / genotoxiny; metabolická aktivace promutagenů, adukty s proteiny a DNA, chromosomální aberace; oxidativní stres - oxidativní poškození DNA
- Mechanismy nádorové promoce – (negenotoxické) modulace intracelulární signální transdukce a změny genové exprese, oxidativní stres aj.
- AhR-dependentní (dioxinová) aktivita
- Další receptor-dependentní mechanismy endokrinní disrupce (např. estrogenita)
- Inhibice mitochondriálních funkcí (respirace, syntéza ATP, ale také apoptóza)
- Neurotoxická, imunotoxická, poruchy metabolismu endogenních látek atd.

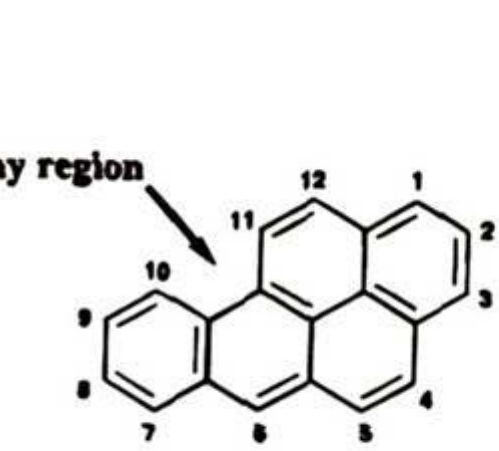


HLAVNÍ MECHANISMY TOXICITY XENOBIOTIK NA BUNĚČNÉ ÚROVNI (jsou výsledkem molekulárních procesů v buňce a na povrchu buňky)

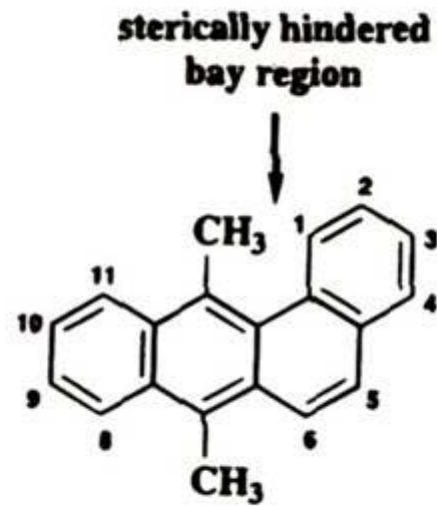
- **Modulace buněčného cyklu, zvýšená proliferace buněk, modulace diferenciaci, inhibice apoptózy**
- **Disrupce mezibuněčných spojení (gap junctions, adherens junctions,...)**
 - ↙
 - ↘
- **Cytotoxicita, indukce apoptózy**
- **Přežívání, transformace buněk (komplexní mnohastupňový proces iniciace, promoční mechanismy – de/diferenciaci, angiogeneze, ...)**

GENOTOXICITA – METABOLICKÁ AKTIVACE POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ

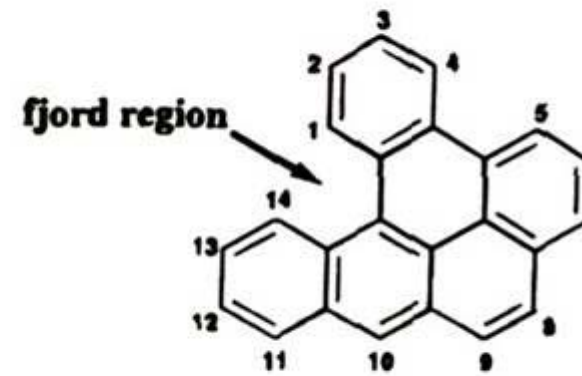
Hlavní enzymy metabolické aktivace PAHs:
CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1



B[a]P

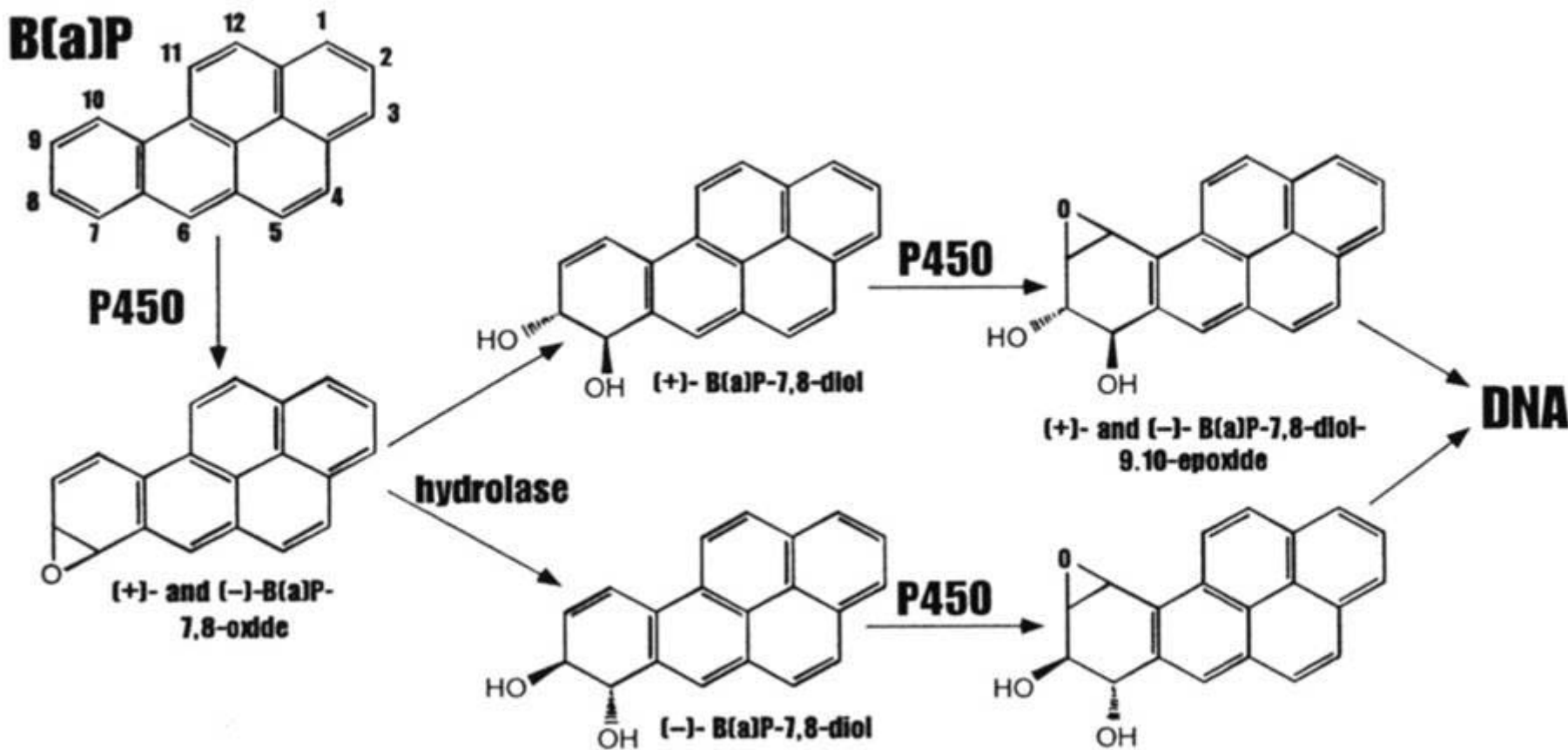


DMBA



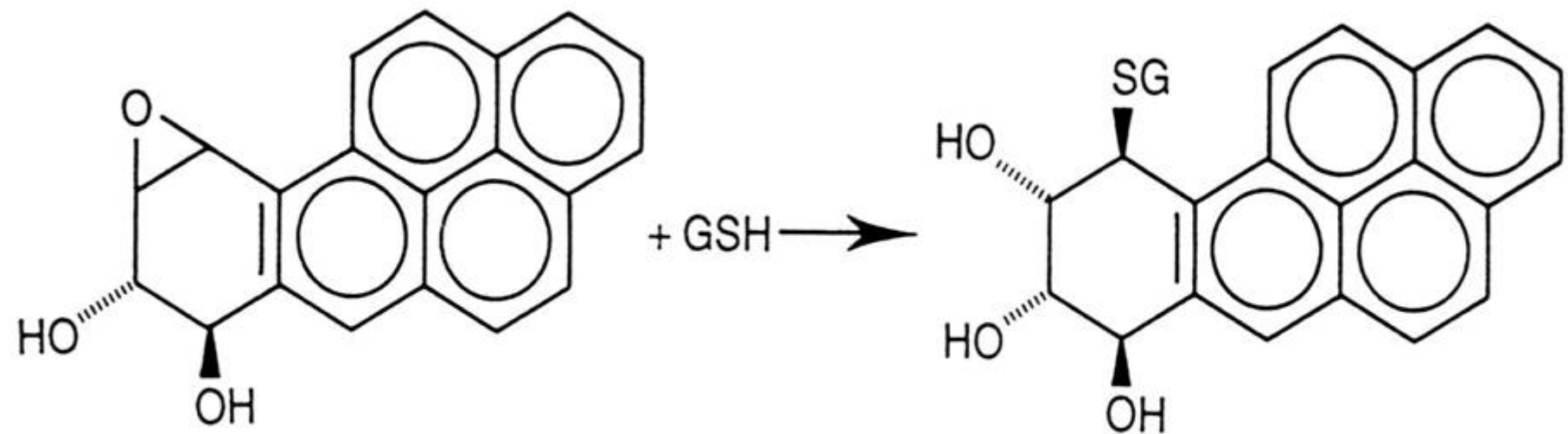
DB[a,l]P

GENOTOXICITA – METABOLICKÁ AKTIVACE POLYCYKLIČKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ



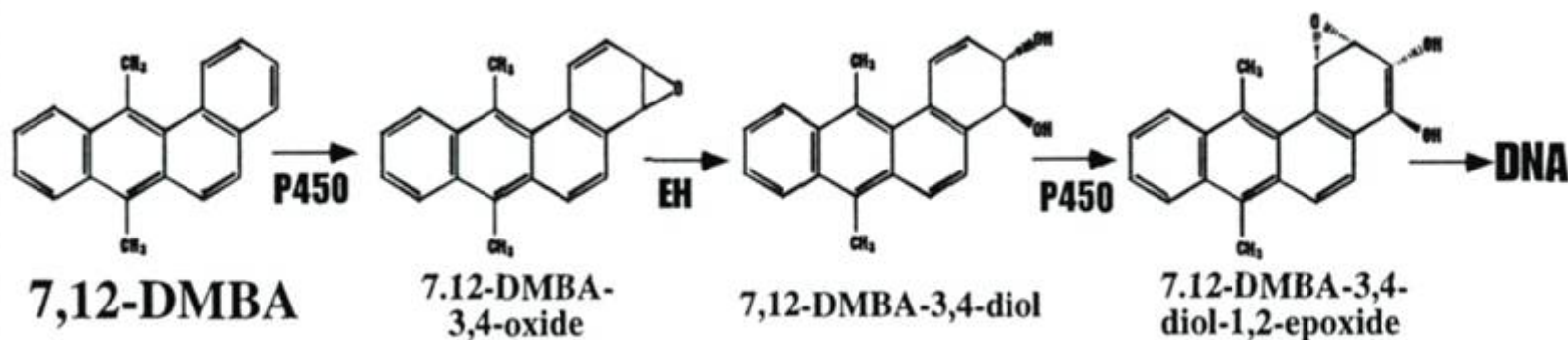
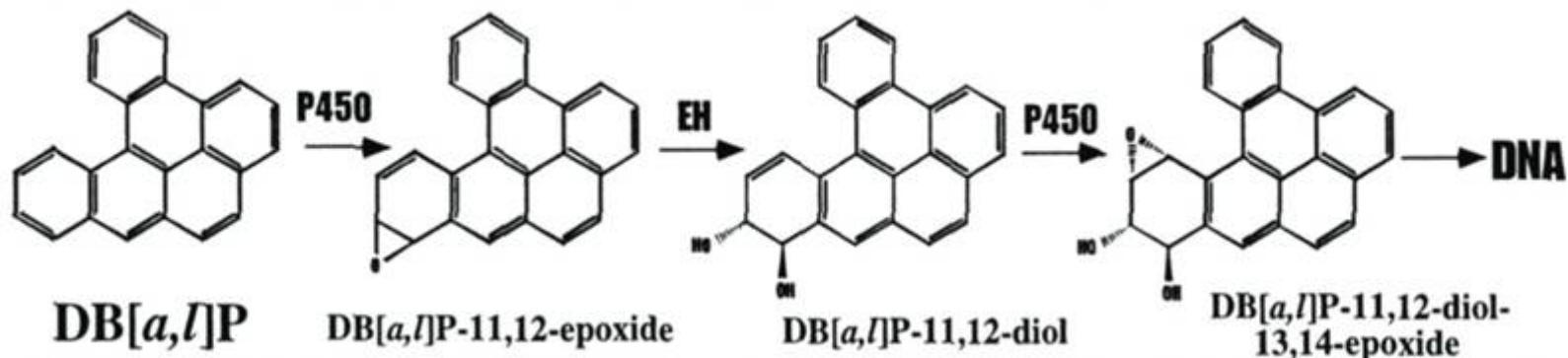
DETOXIKACE POLYCYKLIČKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ:

Protektivní úloha GST, UDPGT aj. enzymů 2. fáze biotransformace



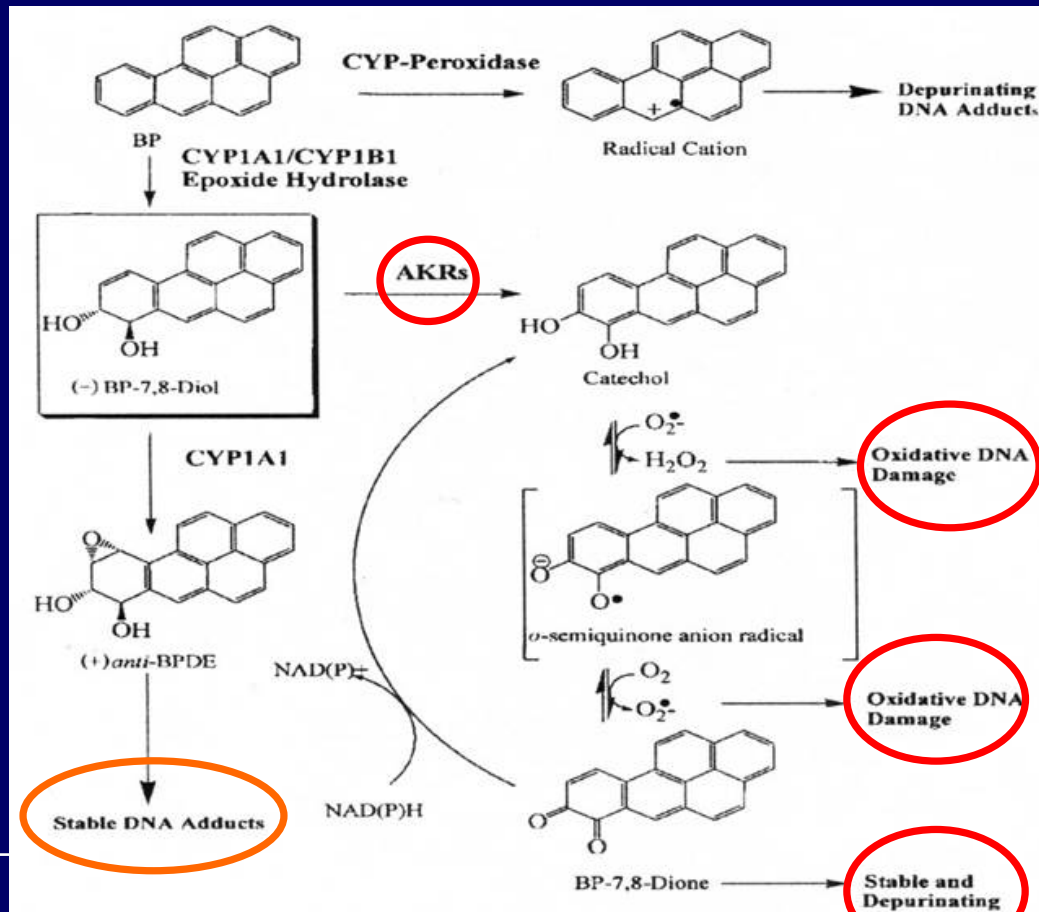
Glutathione-S-transferase

GENOTOXICITA – METABOLICKÁ AKTIVACE POLYCYKLIČKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ



GENOTOXICKÉ EFEKTY PAHs A POSTGENOTOXICKÉ SIGNÁLY

1. Metabolická aktivace – cytochromy P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1) + alternativní dráha (AKR1C9, AKR1A1)



Stabilní adukty
DNA-PAH

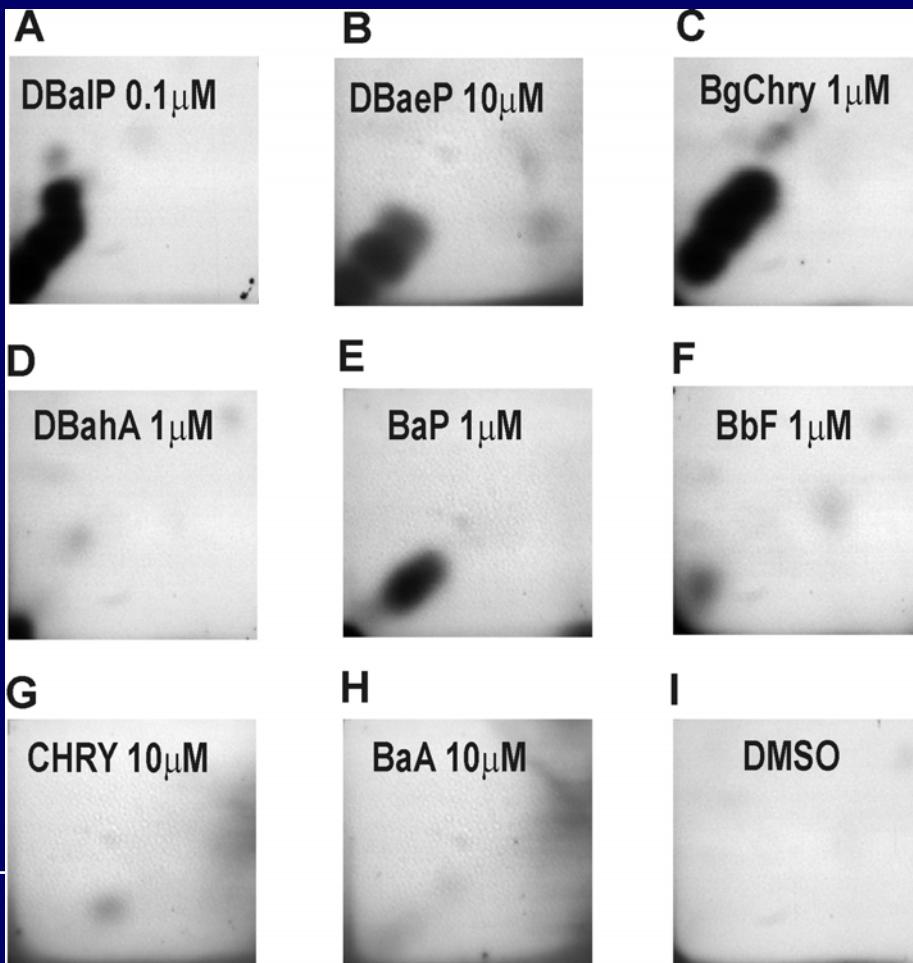
Oxidativní stres

Oxidativní
poškození DNA
(oxidace bazí,
apurinová místa)

Stable and
Depurinating

GENOTOXICKÉ EFEKTY PAHs A POSTGENOTOXICKÉ SIGNÁLY

2. DETEKCE POŠKOZENÍ DNA (stabilní adukty DNA s metabolity PAHs)

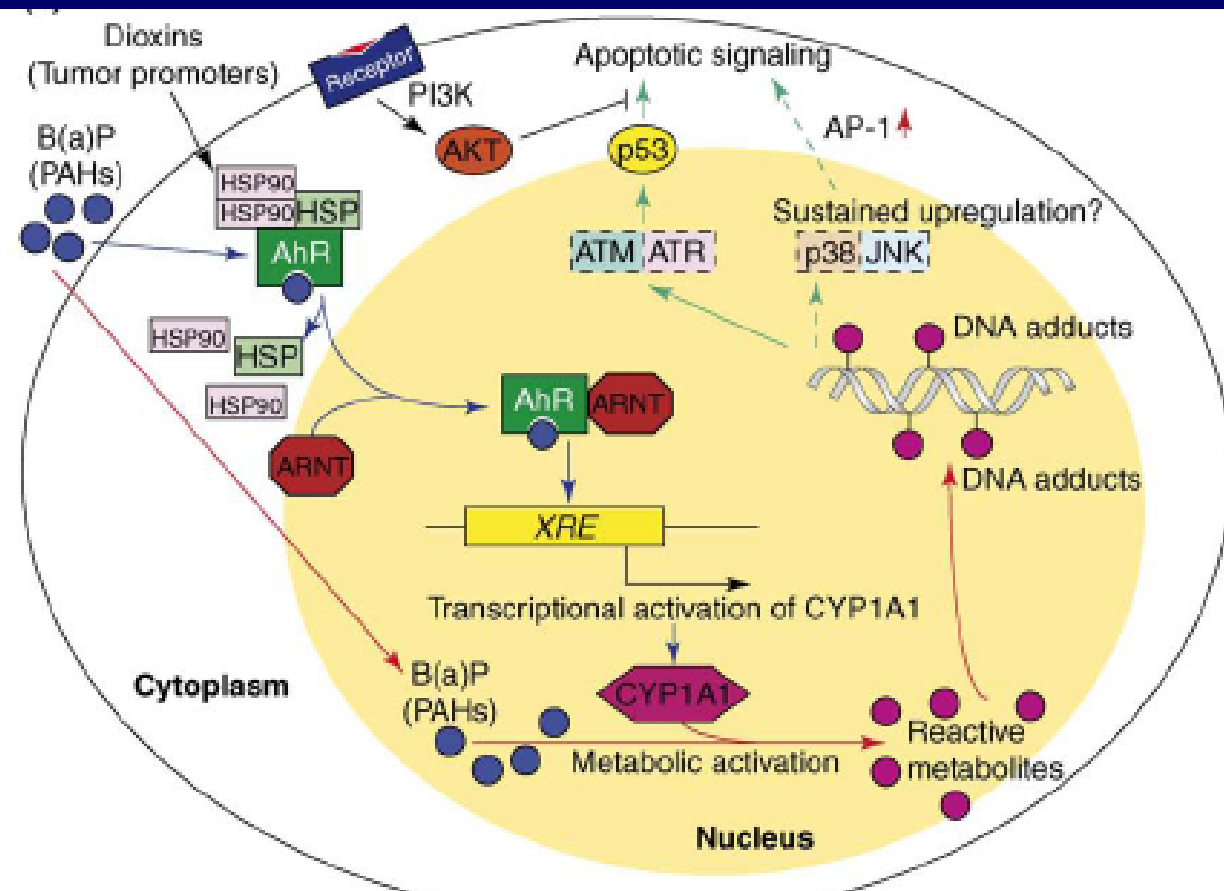


Metoda 32 P-postlabeling:
expozice buněk, izolace DNA,
digesce a značení 32 P,
TLC, detekce radiograficky

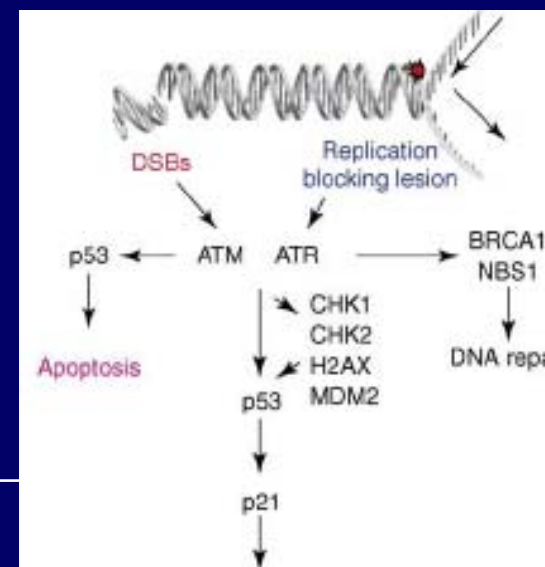
GENOTOXICKÉ EFEKTY PAHs A POSTGENOTOXICKÉ SIGNÁLY

3. POSTGENOTOXICKÉ SIGNÁLY (sensory poškození, regulátory DNA „repairu“ a apoptózy)

Roos, Kaina, 2006



Sensory genotoxicity,
přenos post-genotoxický
signálů a regulace:
ATM, ATR, H2AX, ChK1,
ChK2, p53

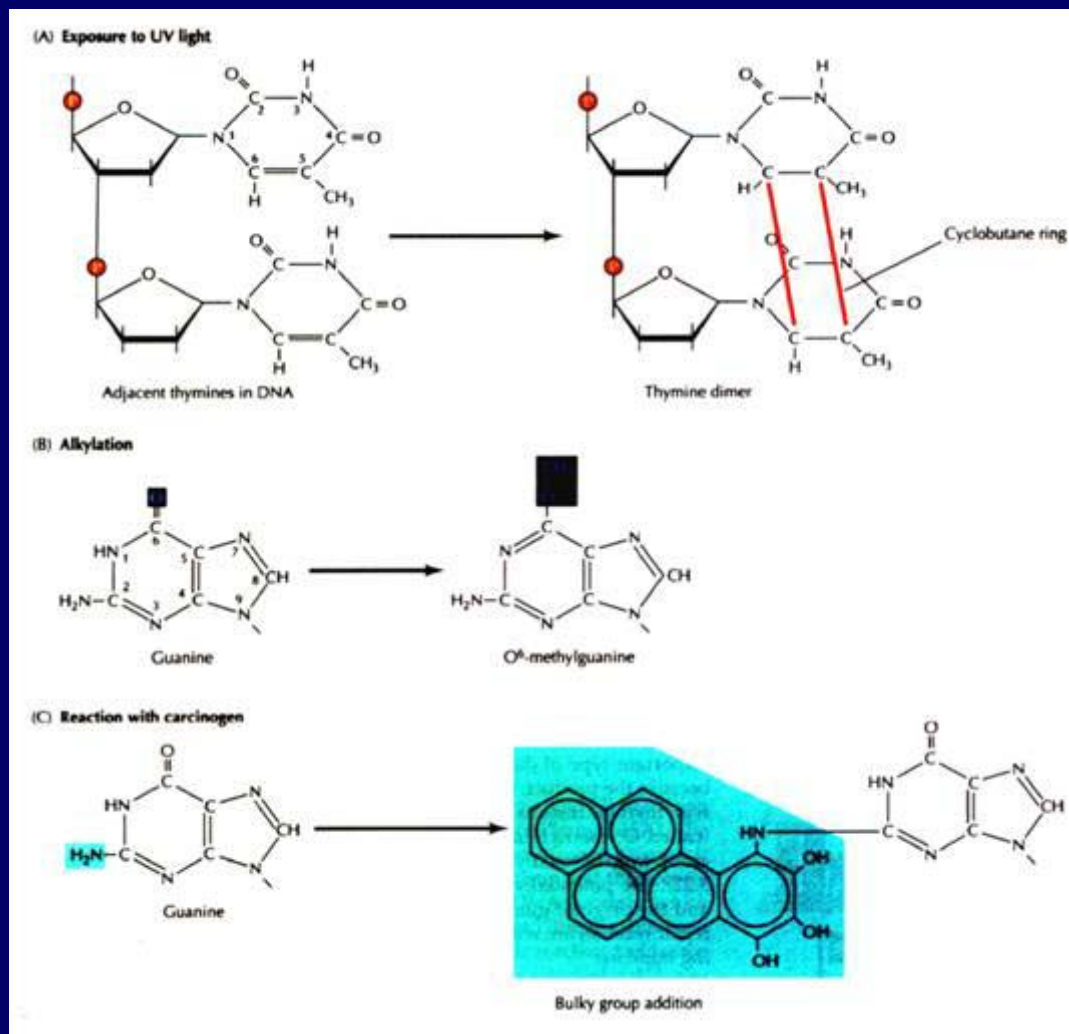


HLAVNÍ TYPY POŠKOZENÍ DNA („bulky adducts“)

UV záření:
dimerizace

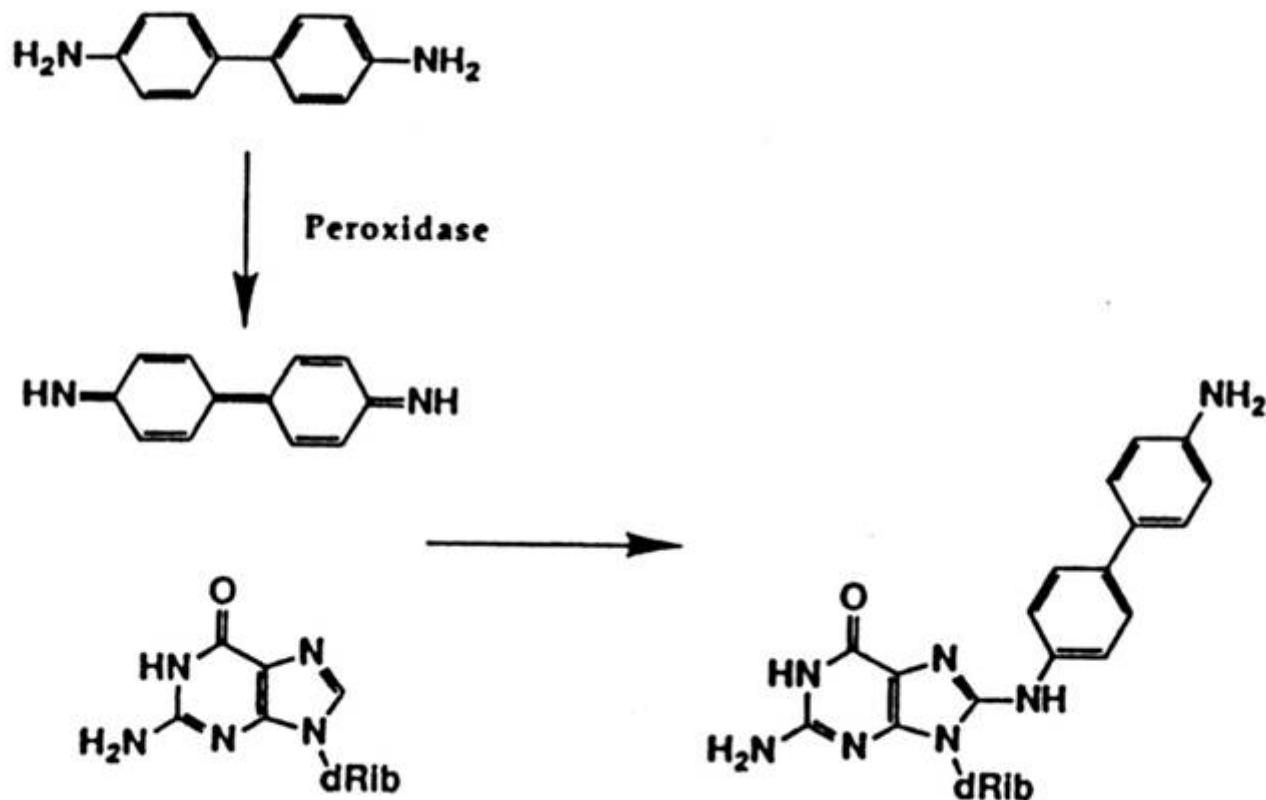
Alkylace (methylace)
= O \longrightarrow -OCH₃

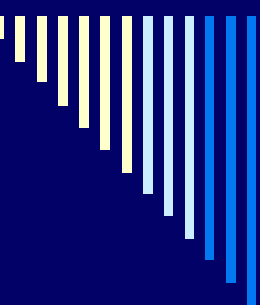
Vznik „bulky adducts“



GENOTOXICITA – METABOLICKÁ AKTIVACE BENZIDINU:

bioaktivními
enzymy mohou
vytvořit peroxidázy
další enzymy





AKRYLAMID:

-detoxikace

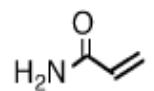
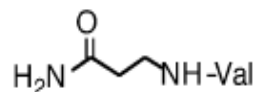
-metabolická
aktivace

-tvorba aduktů
s proteiny

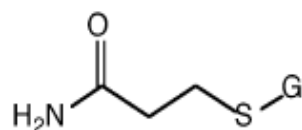
-tvorba aduktů
s DNA

ET AL.

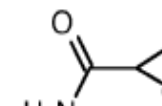
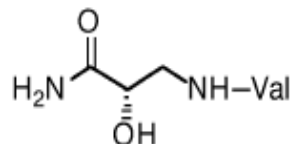
N-(2-carbamoylethyl)-
valine (AAVal)



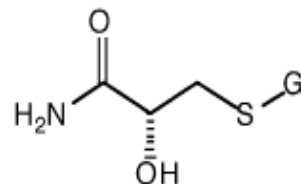
Acrylamide



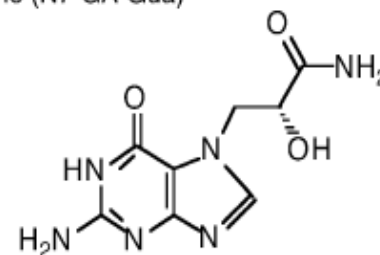
N-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-
valine (GAVal)



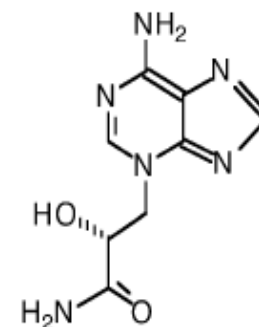
Glycidamide



N7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-
guanine (N7-GA-Gua)



OR

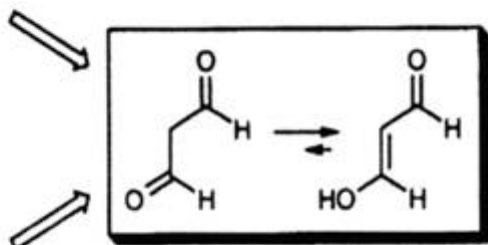


N3-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-
adenine (N3-GA-Ade)

MALONDIALDEHYD - TYPICKÝ PRODUKT PEROXIDACE LIPIDŮ TVOŘÍ ADUKTY S DNA

Lipid Peroxidation

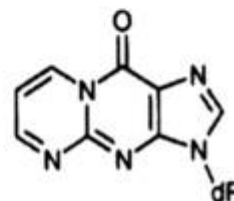
Prostaglandin Endoperoxides



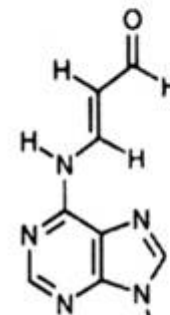
MDA

β -hydroxyacrolein

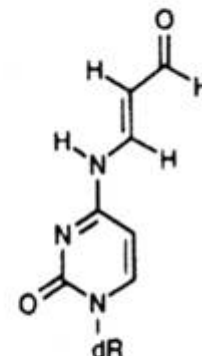
DNA



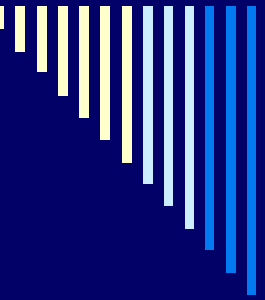
M₁G



M₁A



M₁C



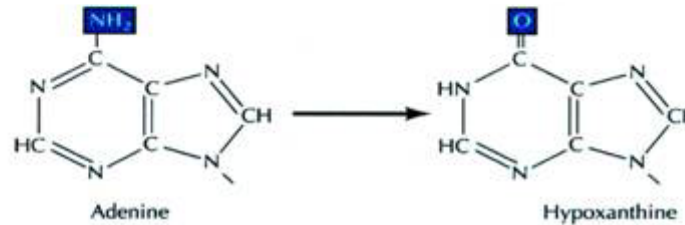
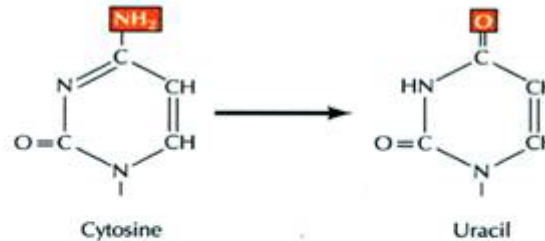
OXIDATIVNÍ POŠKOZENÍ DNA

HLAVNÍ TYPY POŠKOZENÍ DNA („apurinic sites“)

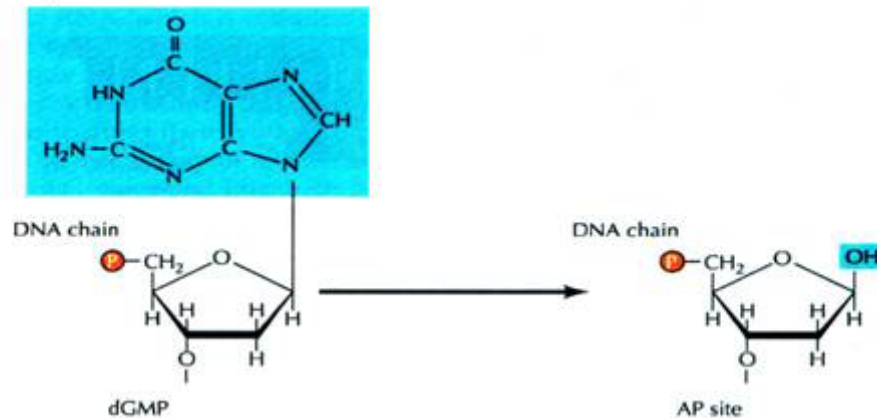
Oxidativní deaminace



(A) Deamination



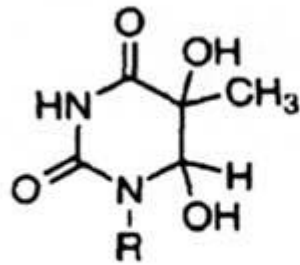
(B) Depurination



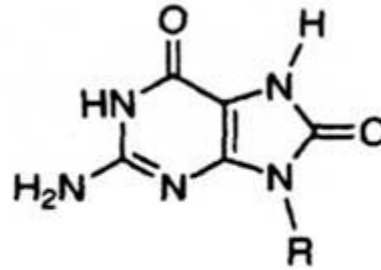
Depurinace
(nestabilní
modifikované
nukleotidy)



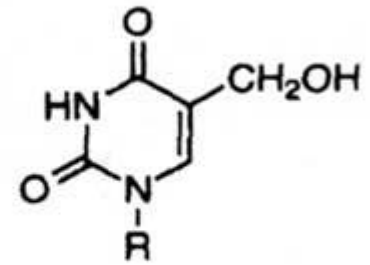
PRODUKTY OXIDATIVNÍHO POŠKOZENÍ DNA



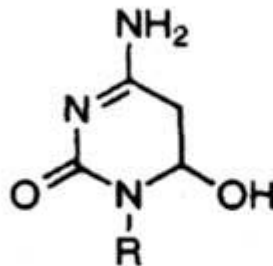
thymine glycol



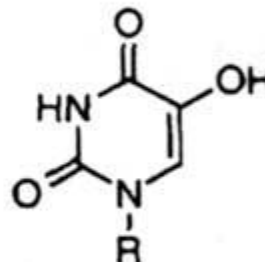
8-oxo-dG



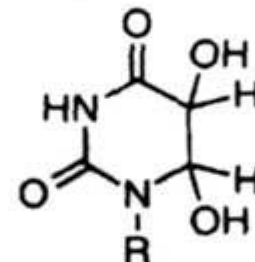
5-hydroxymethyluracil



6-hydroxy-5,6-dihydrocytosine



5-hydroxyuracil



uracil glycol

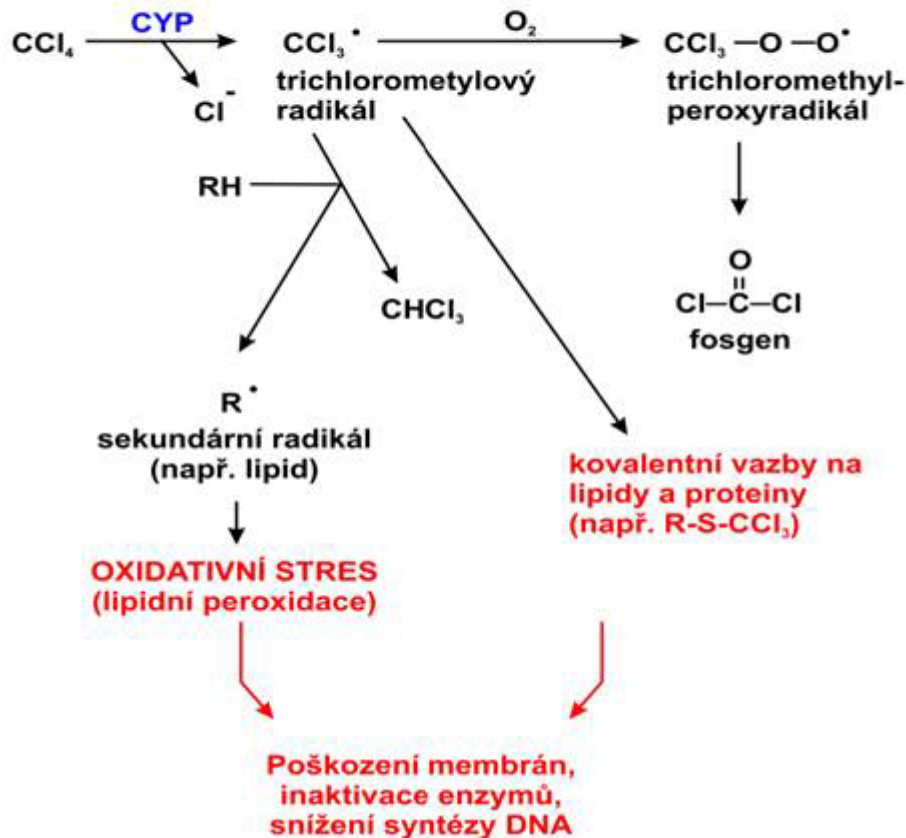
Biomarker
oxidativního
poškození
DNA
(stanovení
HPLC)

METABOLICKÁ AKTIVACE TETRACHLÓRMETANU

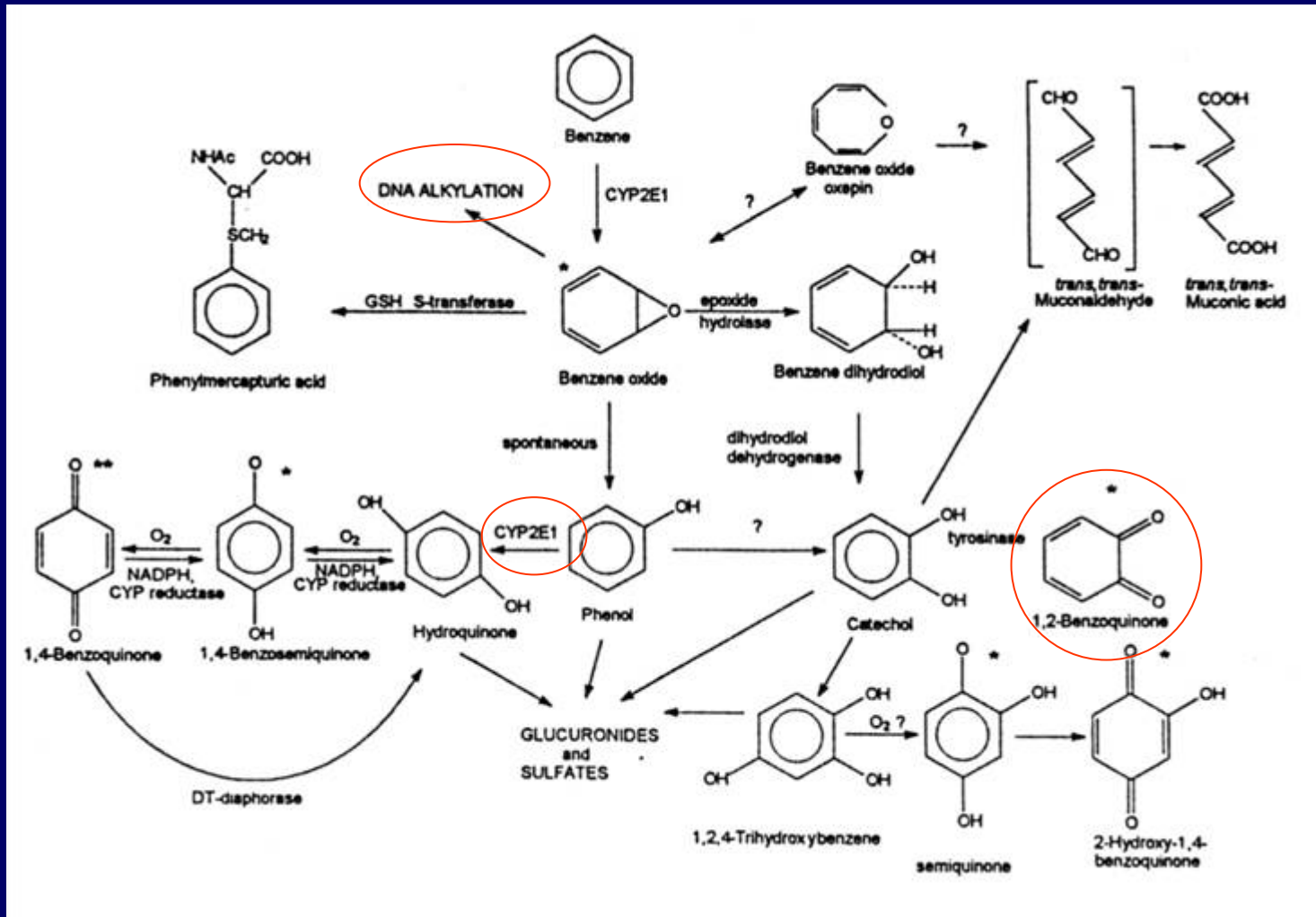
Toxicita CCl_4 :

- alkylace,
- oxidativní poškození,
- toxický metabolit (fosgen)

METABOLICKÁ AKTIVACE CCl_4 JATERNÍMI CYTOCHROMY P450



METABOLICKÁ AKTIVACE A DETOXIKACE BENZENU:





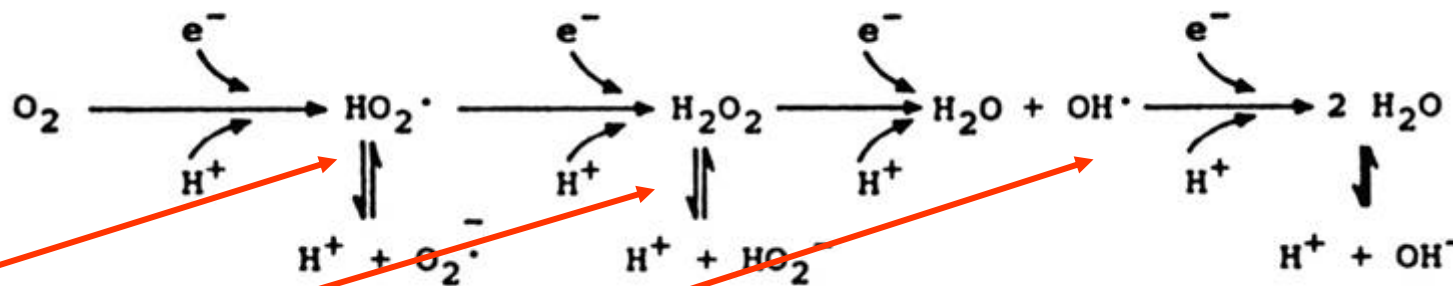
OXIDATIVNÍ STRES

Oxidativní stres je nerovnováha mezi (zvýšenou) produkcí ROS a oxidovaných metabolitů a limitovanou kapacitou antioxidačních mechanismů.

Hlavní mechanismy:

- redoxní cyklování (např. naftochinony, adriamycin, paraquat aj.)
- **vedlejší produkty respirace a dalších metabolických procesů (prostaglandin H syntáza, diaminoxidáza, xanthinoxidáza)**
- aktivace O_2 v cyklu P450 (např. pomalu metabolizované substráty CYP2B – fenobarbital, lindan)
- přímá produkce ROS (t-BuHP, cis-DPP)
- snížení hladiny GSH (dietylmaleát)
- **chorobné stavy (reumatoidní choroby, záněty...)**
- radiace

REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU (ROS)

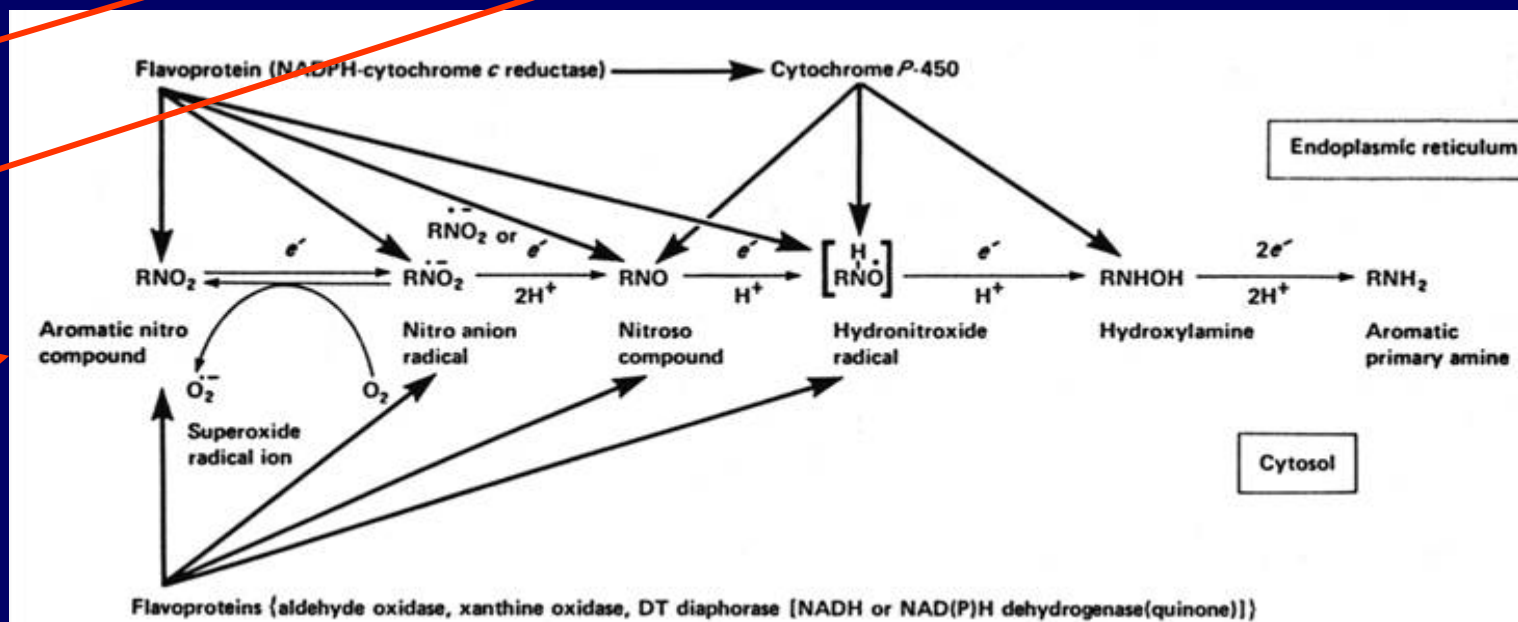


Superoxid

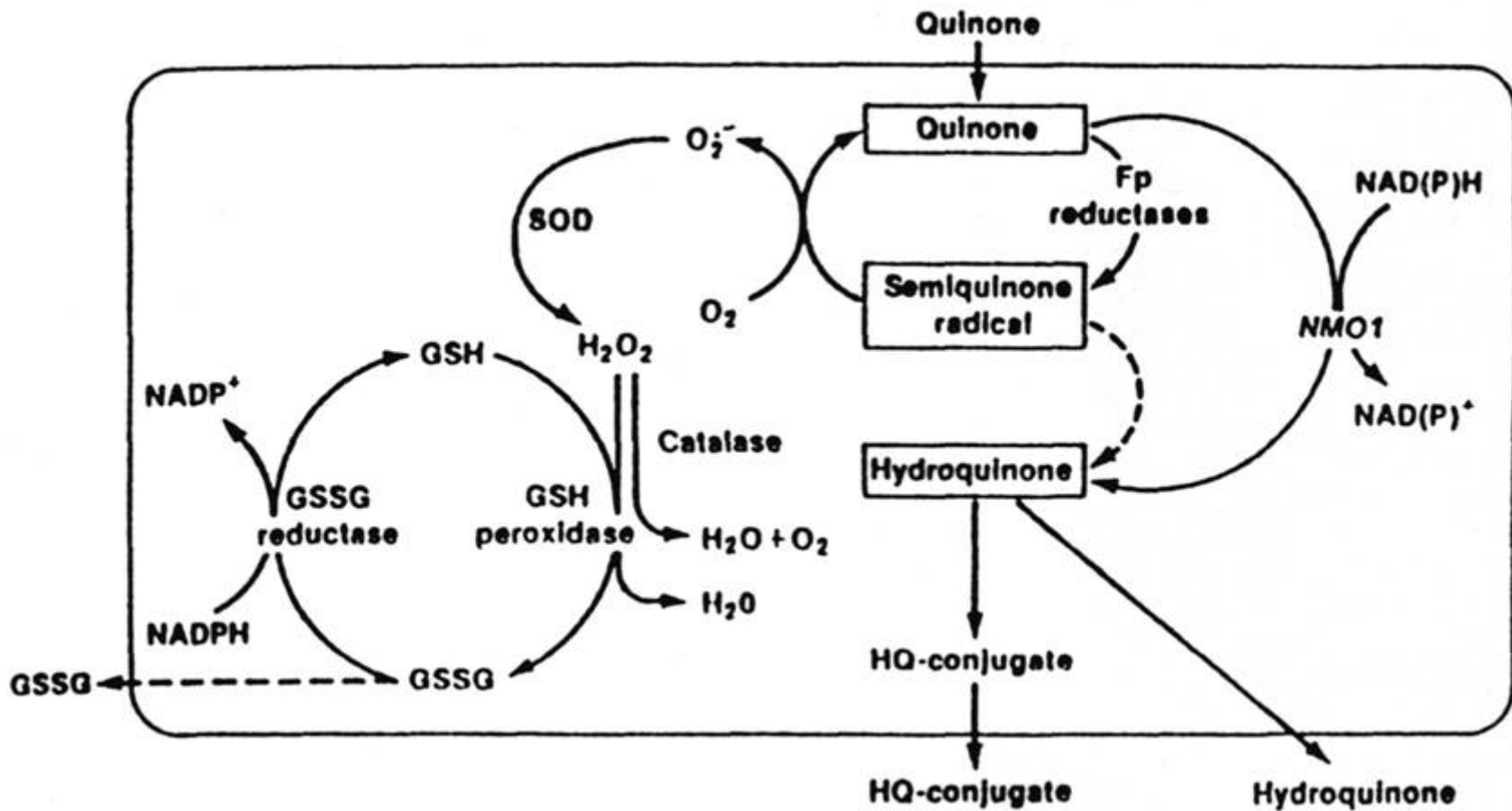
Peroxid

Hydroxylový radikál

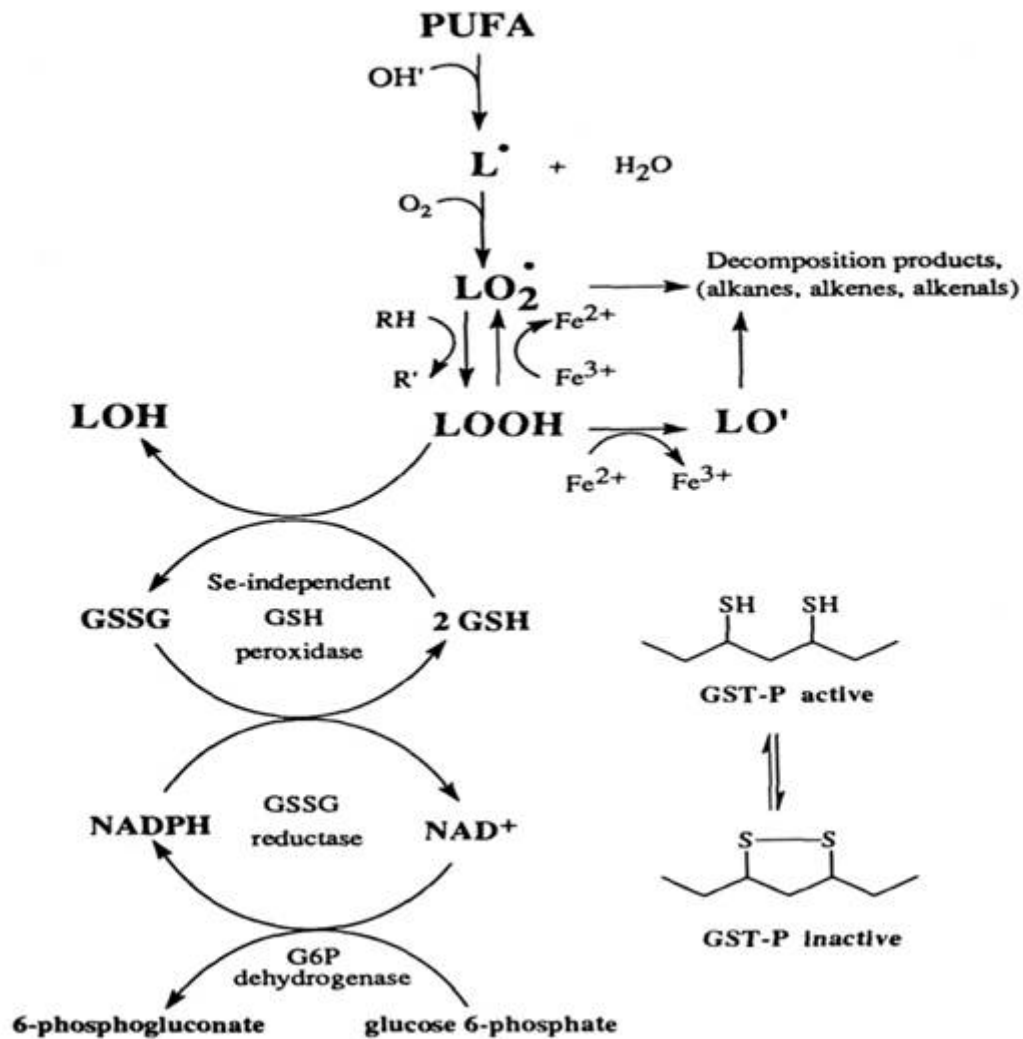
Redukce nitrosloučenin



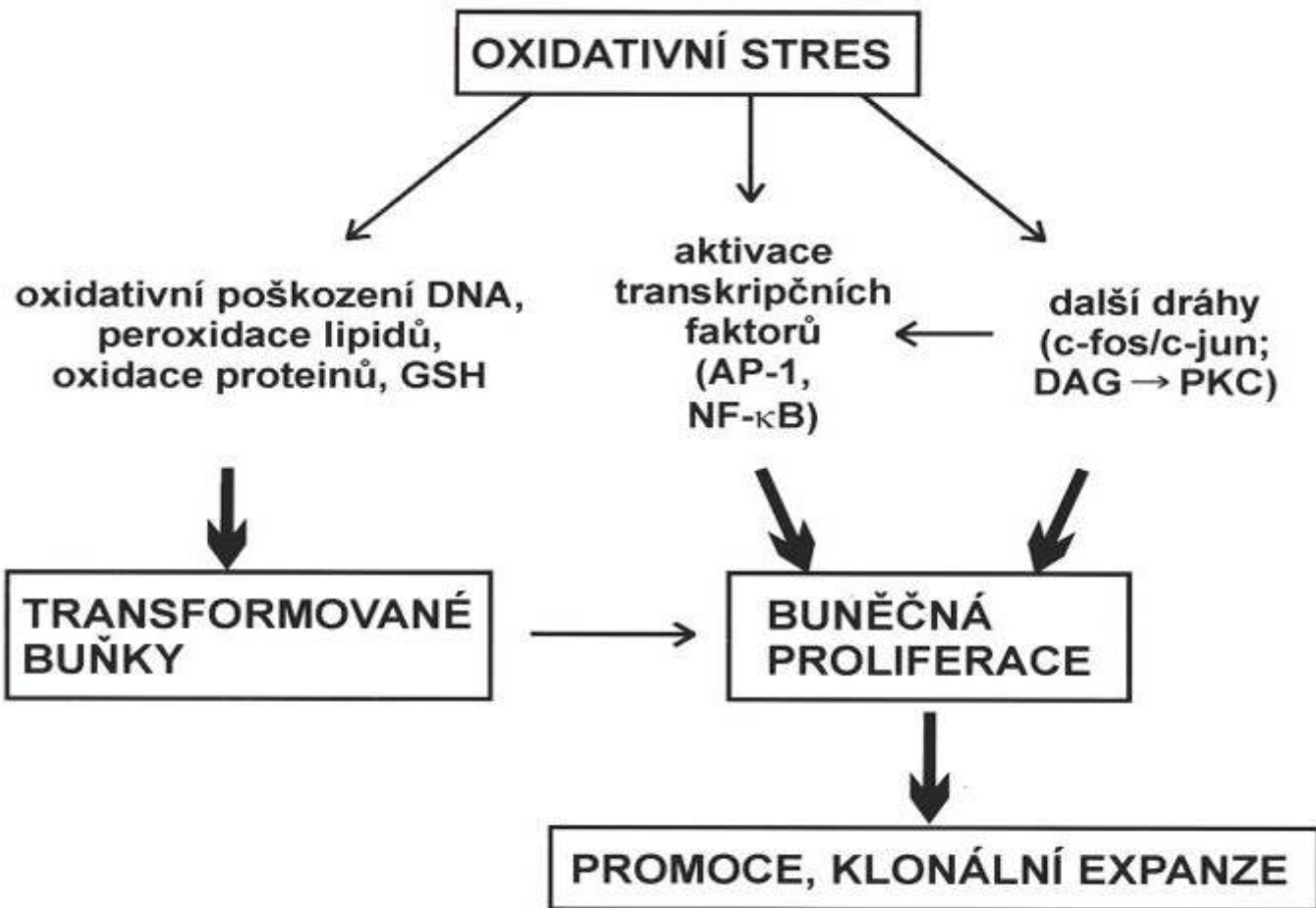
REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU: redoxní cyklování chinonů / antioxidační enzymy

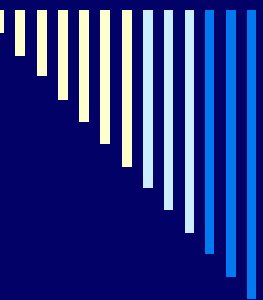


PEROXIDACE LIPIDŮ



DŮSLEDKY OXIDATIVNÍHO STRESU





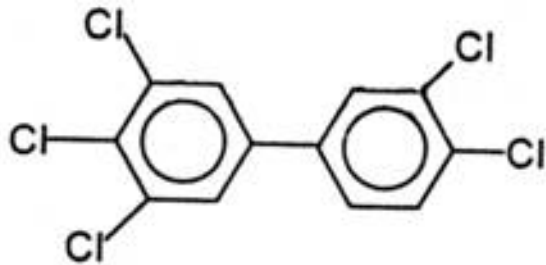
ENDOKRINNÍ DISRUPCE



AKTIVACE AhR A NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ

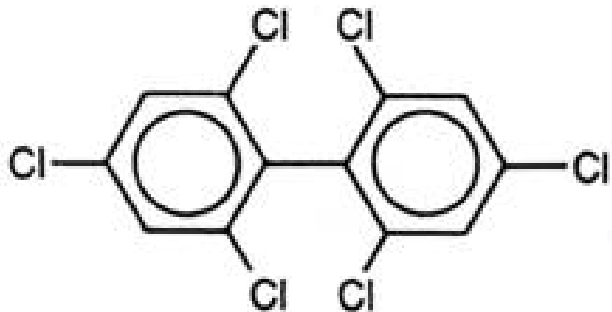
- Aktivace AhR (indukce CYP1A1/1A2/1B1; modulace bun. cyklu, imunosuprese, syndromy dioxinové toxicity).
- Xenobiotika jako estrogeny / antiestrogeny
- Androgeny / antiandrogeny
- Peroxisomální proliferátory
- Xenobiotika modulující thyroidní funkce

PCB - ENDOKRINNÍ DISRUPTORY



3,4,5,3',4'-pentachlorobifenyl
(PCB)

Koplanární PCB: induktory AhR („dioxin-like compounds“); efekty také na thyroidní funkce (kompetitivní vazba na thyroid binding protein); antiestrogenita (efekty na ER-dependentní genovou expresi, indukce hydroxylace estradiolu)



2,2',4,4',6,6'-Hexachlorobiphenyl
(Not coplanar)

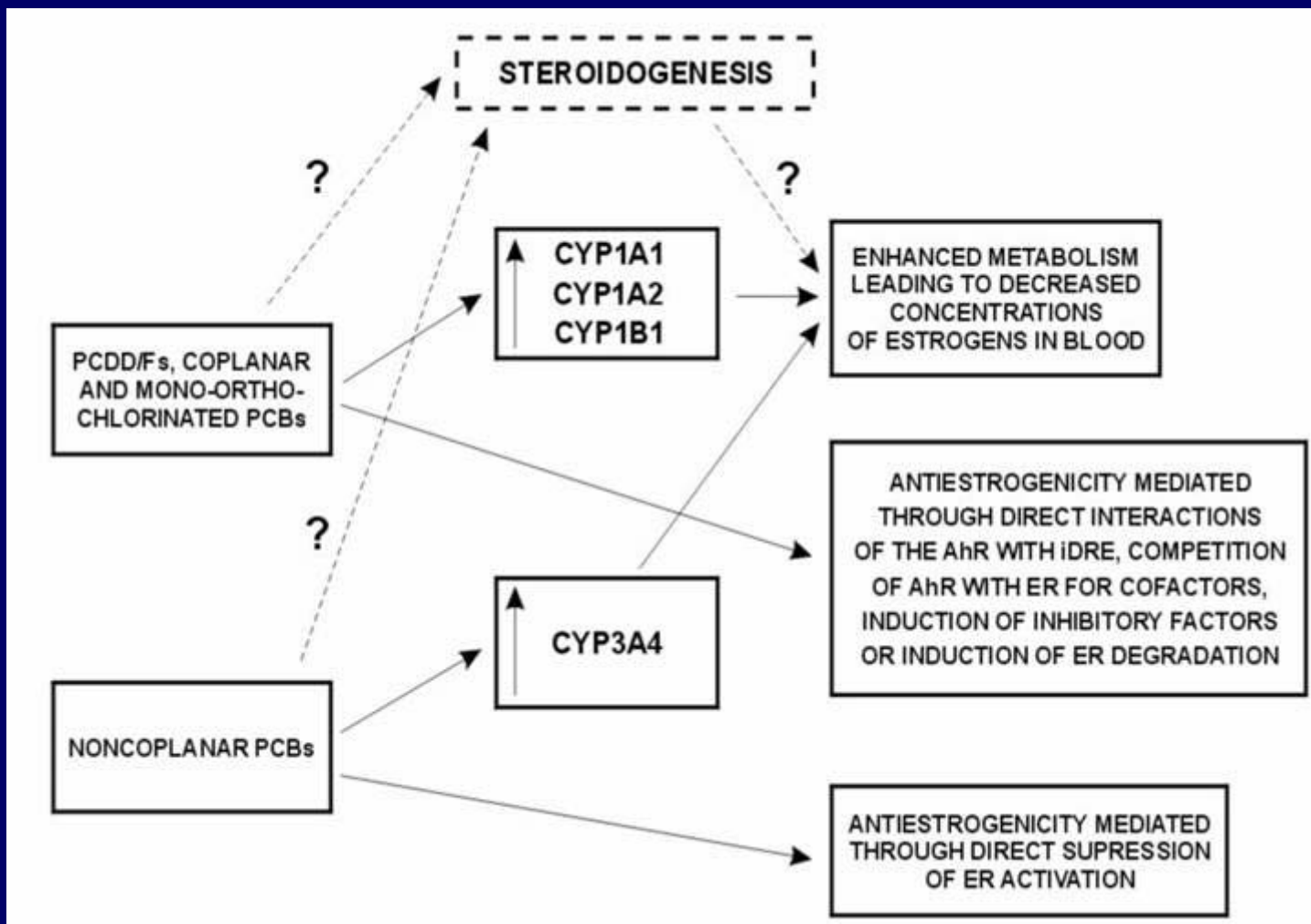
Nekoplanární PCB:
- nízkomolekulární kongenery mají estrogenní aktivitu;
- prevalentní výšechlorované PCB jsou antiestrogenní a antiandrogenní;
- vazba na thyroid binding protein;
- vazba na RyR (neurotoxicita)

PCB – (ANTI)ESTROGENITA

osyntéza?

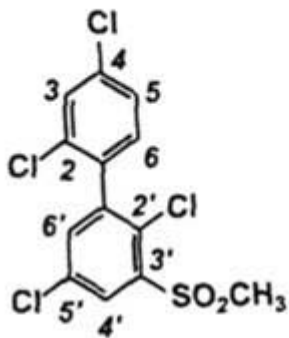
vyšení
metabolismu E2
inaktivace
hormonu

ktivace/
suprese ER

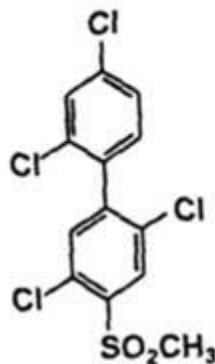


METABOLITY POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ (PCB) – 2. FÁZE

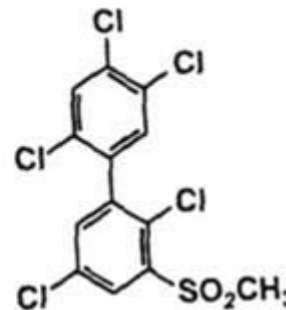
Methylsulfonyl-PCB – také toxicky významné (vazba na GR, modulační 2. fáze metabolismu estradiolu aj. efekty)



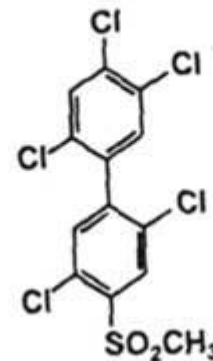
3'-MeSO₂-2,2',4,5'-tetrachlorobiphenyl
(3'-MeSO₂-CB49)



4'-MeSO₂-2,2',4,5'-tetrachlorobiphenyl
(4'-MeSO₂-CB49)



3'-MeSO₂-2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl
(3'-MeSO₂-CB101)



4'-MeSO₂-2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl
(4'-MeSO₂-CB101)

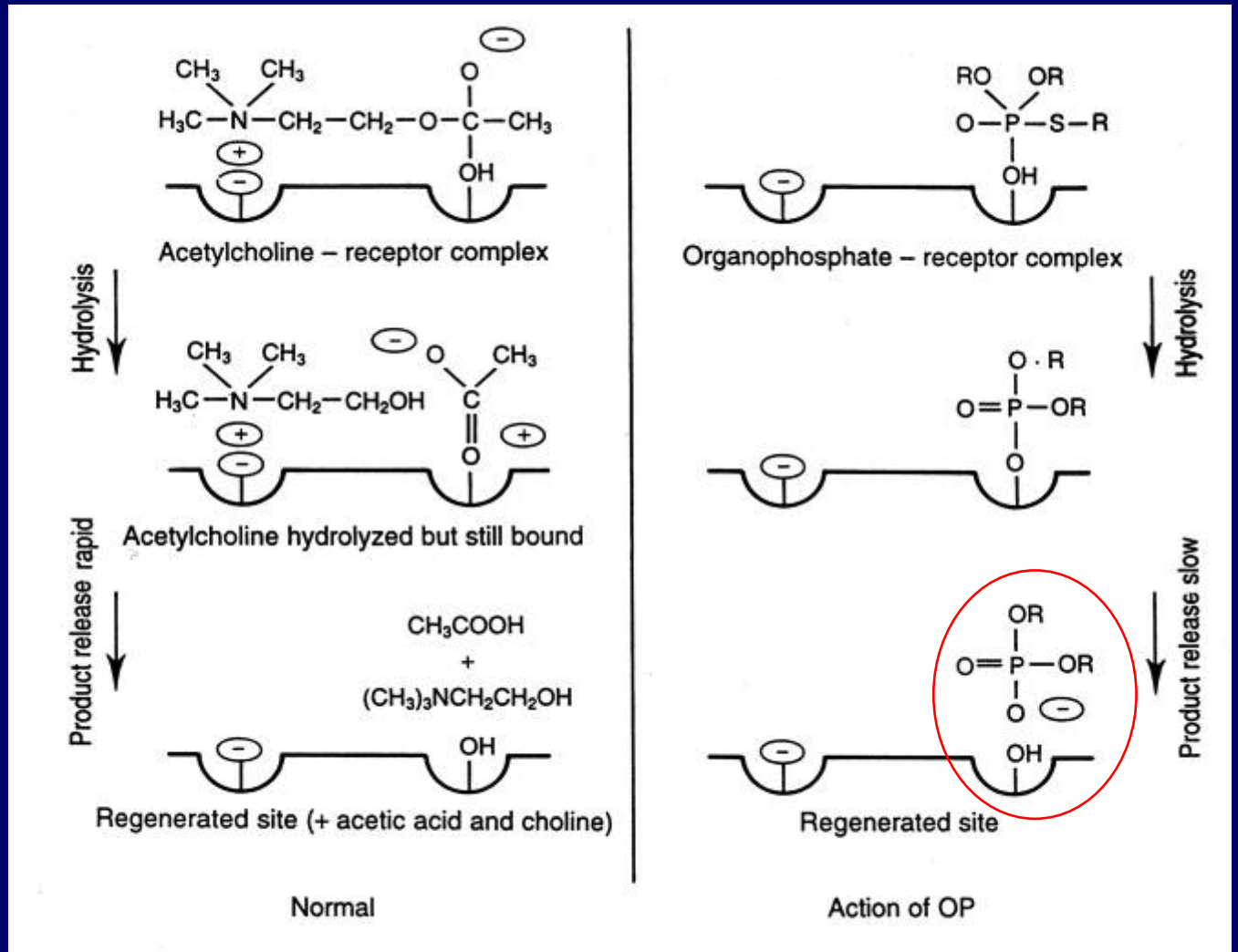


NEUROTOXICITA

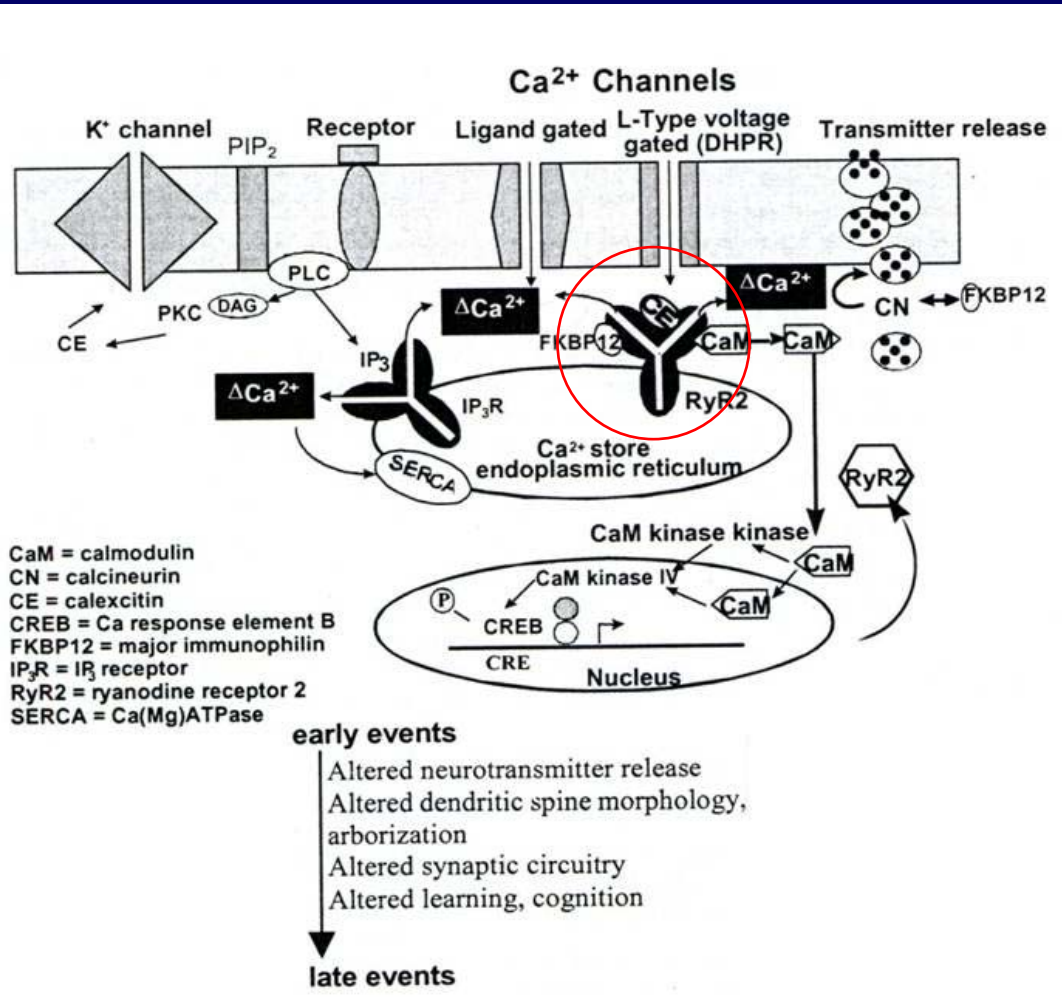
- **Inhibice acetylcholinesteráz (např. karbamáty, organofosfáty, ...)**
- **Interakce s ryanodyne receptorem (RyR)**
- **Modulace uvolňování dopaminu**
- **Poruchy diferenciacie, růstu nervové tkáně, inhibice GJIC další interakce**

NEUROTOXICITA: inhibice AChE

zpomalení
regenerace
vazebného místa
uvolnění produktu
(esterázové reakce)



NEUROTOXICITA: interakce s RyR a modulace Ca²⁺



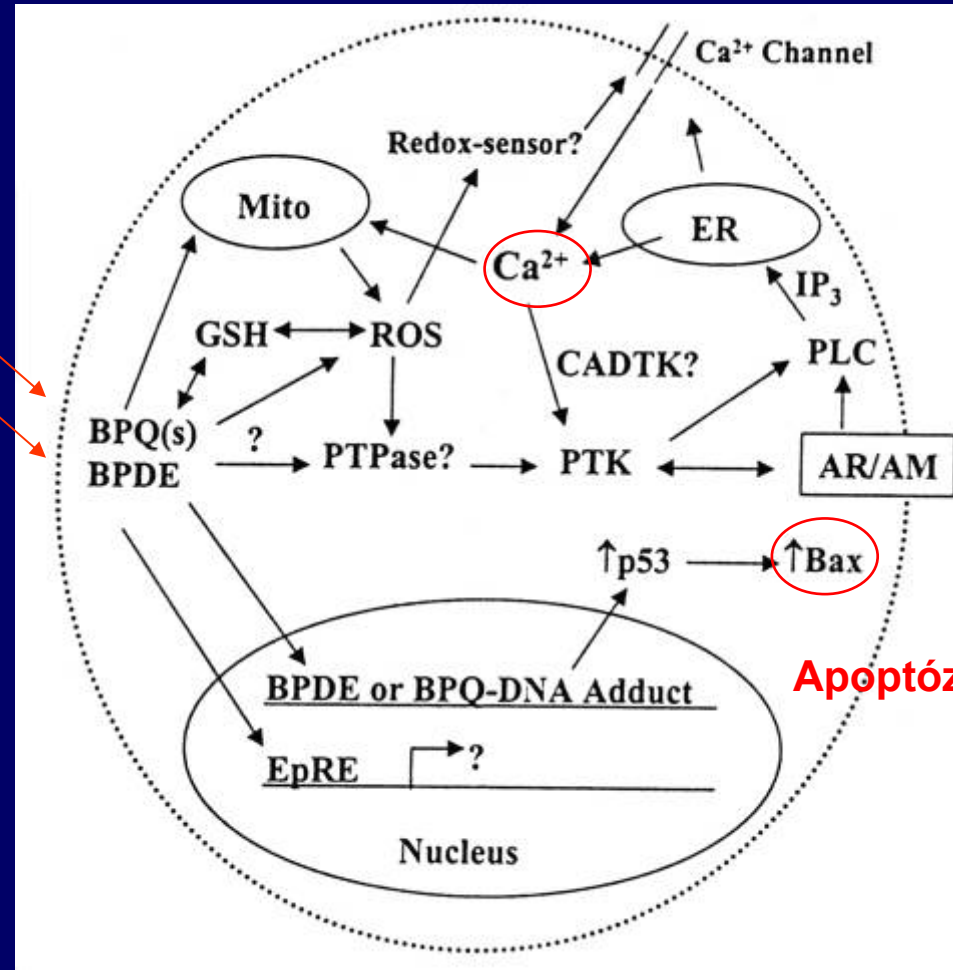
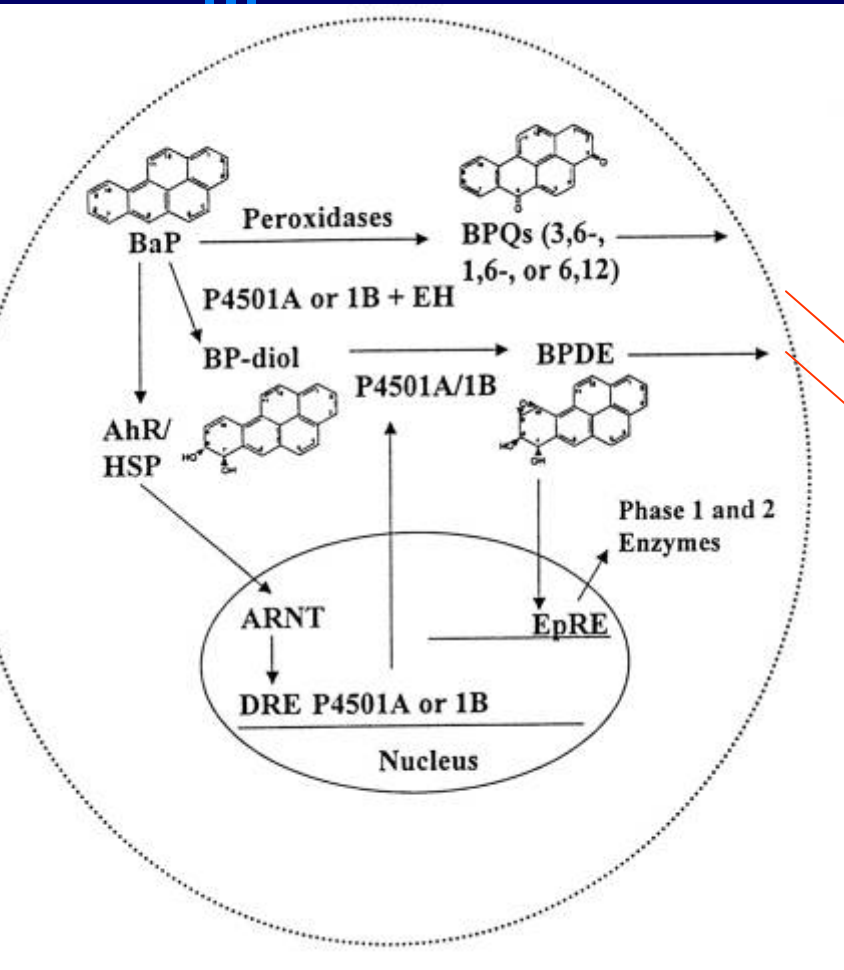


IMUNOTOXICITA

- **Obecně mohou být po expozici xenobiotiky porušeny všechny typy humorální a buněčné imunity**
- **Apoptóza vede k supresi krevních buněk (příklad: benzo[a]pyren je cytotoxický v relativně nízkých koncentracích)**
- **Suprese funkce a hmotnosti thymu (dioxiny, koplánárními PCB aj. AhR agonisty)**
- **Poruchy indukce protilátkové odpovědi a další mechanismy**

MECHANISMY IMUNOTOXICITY BENZO[A]PYRENU

(metabolity způsbnují apoptózu leukocytů)



CHEMICKÁ KARCINOGENEZE:

ZÁKLADNÍ KONCEPT

- **Mnohastupňový proces** vývoje rakoviny, komplexní interakce genetických, genotoxických a epigenetických (negenotoxických) faktorů. Základní fáze karcinogeneze:
 - 1) iniciace;
 - 2) promoce;
 - 3) progres, metastáze
- **Faktory ovlivňující mutagenitu/genotoxicitu a karcinogenitu**
 - 1) genetické predispozice („susceptibility“);
 - 2) environmentální faktory (chemické kontaminanty, nutriční vlivy), kombinace 1 + 2;
 - 3) suprese imunologických funkcí;
 - 4) neznámé faktory

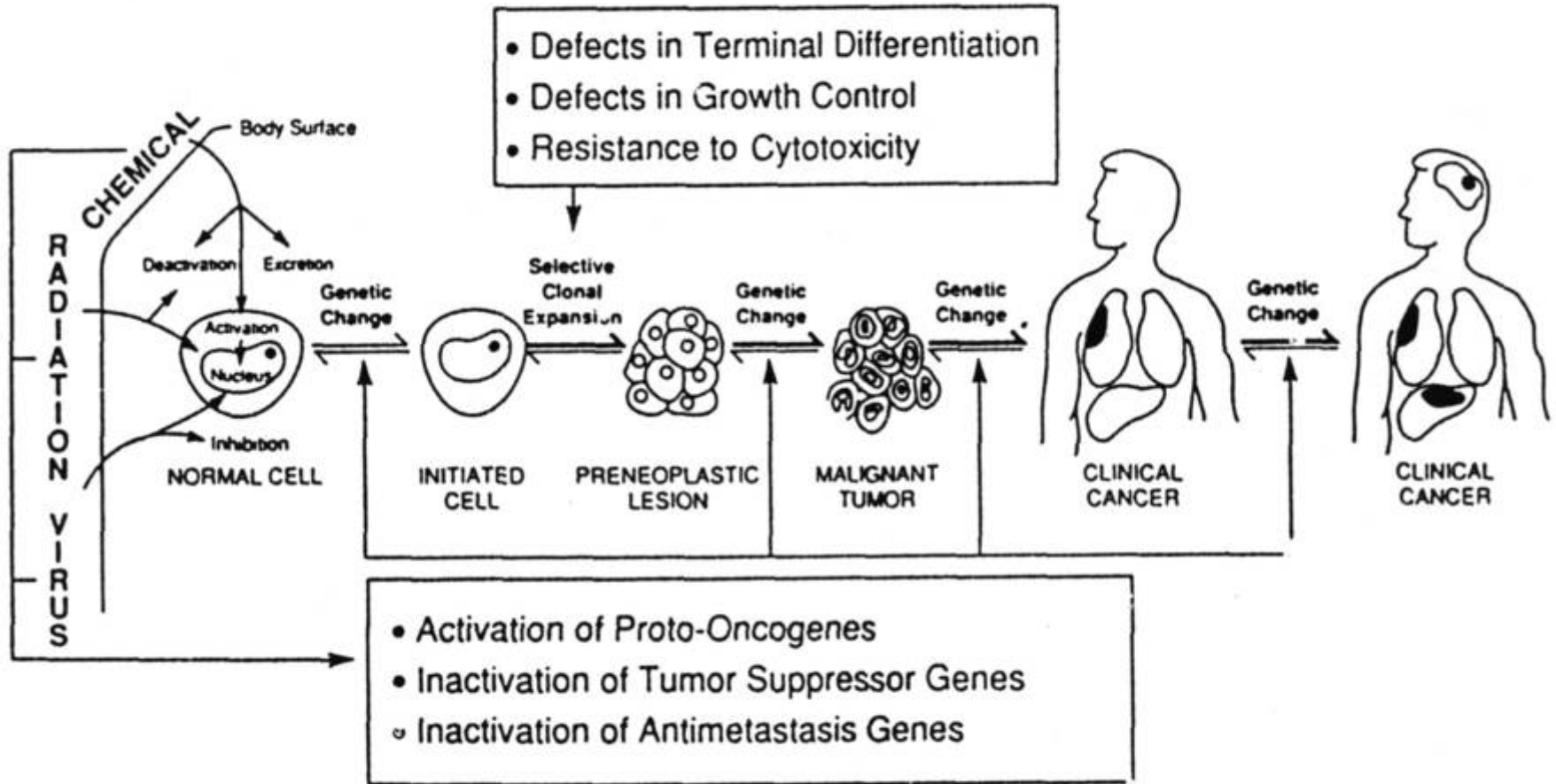
CHEMICKÁ KARCINOGENEZE

Initiation

Promotion

Conversion

Progression



CHEMICKÁ KARCINOGENEZE



GENOTOXICKÉ KARCINOGENY reagují s DNA a ireversibilně pozměňují genom (bodové mutace, změny v chromosomální struktuře, zlomy, výměny sesterských chromatid, klastogeny); interakce chemických látek s DNA:alkylace, oxidativní poškození nukleotidů, interkalace → **INICIACE**; mutace DNA repair, onkogenů (ras, myc aj.) a tumor-supresorových genů (např. p53) - genů kontrolujících buněčný cyklus a proliferaci (PAHs, nitro-PAHs, NNK aj. nitrososlouč.



NEGENOTOXICKÉ KARCINOGENY modulují signální transdukcí na postranlační úrovni - pozměněna proliferace a diferenciace, inhibována apoptóza → především působí ve fázi **PROMOCE** karcinogeneze (dioxiny, PCB, OCP, azbest, křemenný prach, keramická vlákna, kovové ionty, např. Co, Mn, Ni, Cr, Be)



KOKARCINOGENY - samy nejsou nutně karcinogenní, potencují aktivitu karcinogenu

SUSCEPTIBILITA

- polymorfismus CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2E1, GSTM1, NQO1, NAT aj. genů biotransformačních enzymů;
- DNA repair; mutace v tumor-supresorových genech;
- otázka etnik, pohlaví, věku;
- komplexní vlivy spolu s nutričními návyky (včetně mikronutrientů vitamínu, PUFA aj.).

ENVIRONMENTÁLNÍ EXPOZICE

- kouření;
- chemické zatížení vzduchu (prach, PAHs, volatilní karcinogeny);
- kontaminovaná potrava (pesticidy, persistetní látky, napůř. PCB, dioxiny);
- pracovní prostředí (PAHs, chemické výroby, cytostatika aj.)

PREKLINICKÉ EFEKTY

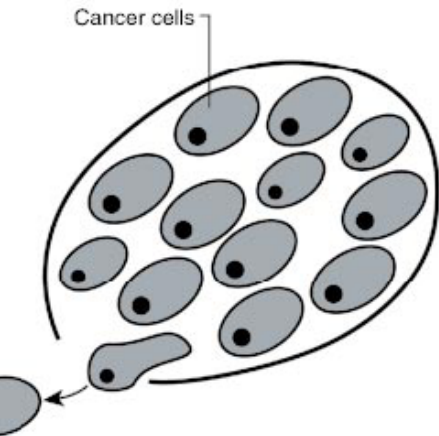
- chromos. aberace, genové mutace, aktivace onkogenů, inaktivace tumor. supresor. genů, komponenty bun. cyklu

olek.
ologické
etody,
idemiolog.
udie

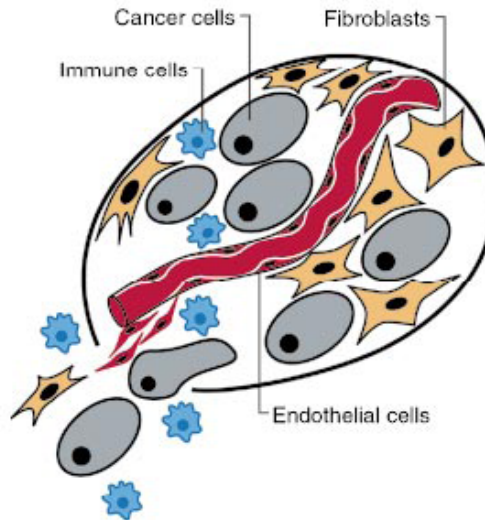
anovení
nterní“
ávky
otinin, PCB,
OH-pyren),
anovení
nolekulární“
ávky (DNA- a protein.
lukty s PAHs,
xidativní
oškození)

ZÁKLADNÍ MECHANISMY NÁDOROVÁ PROMOCCE

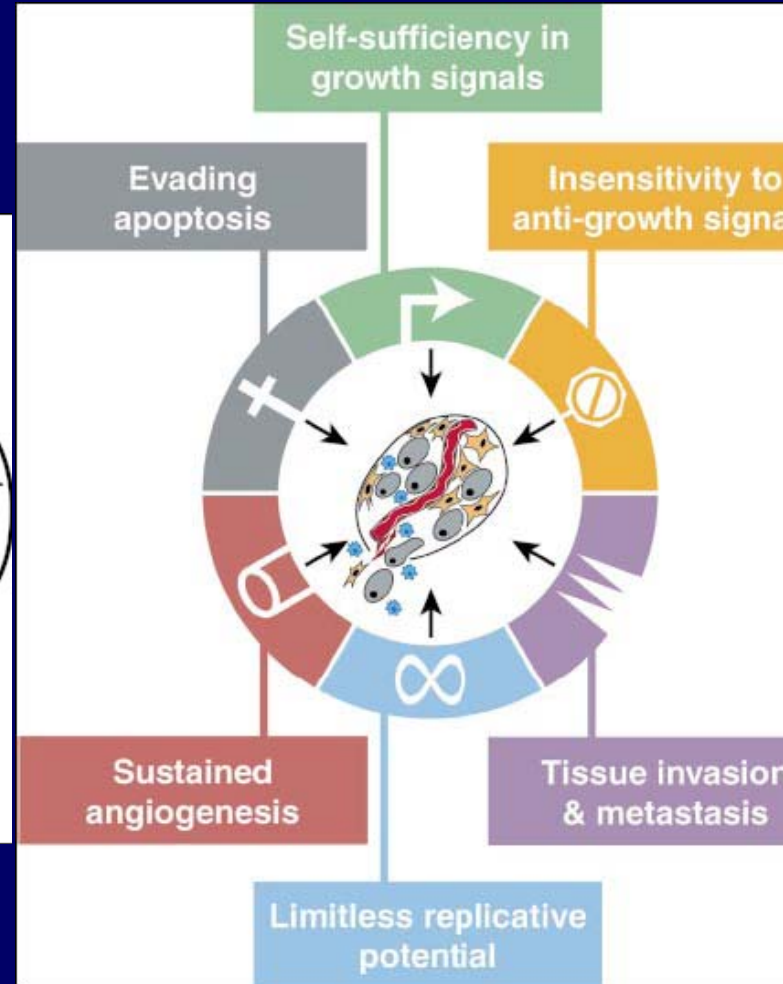
The Reductionist View



A Heterotypic Cell Biology



(Hannahan, Weinberg, 2000)



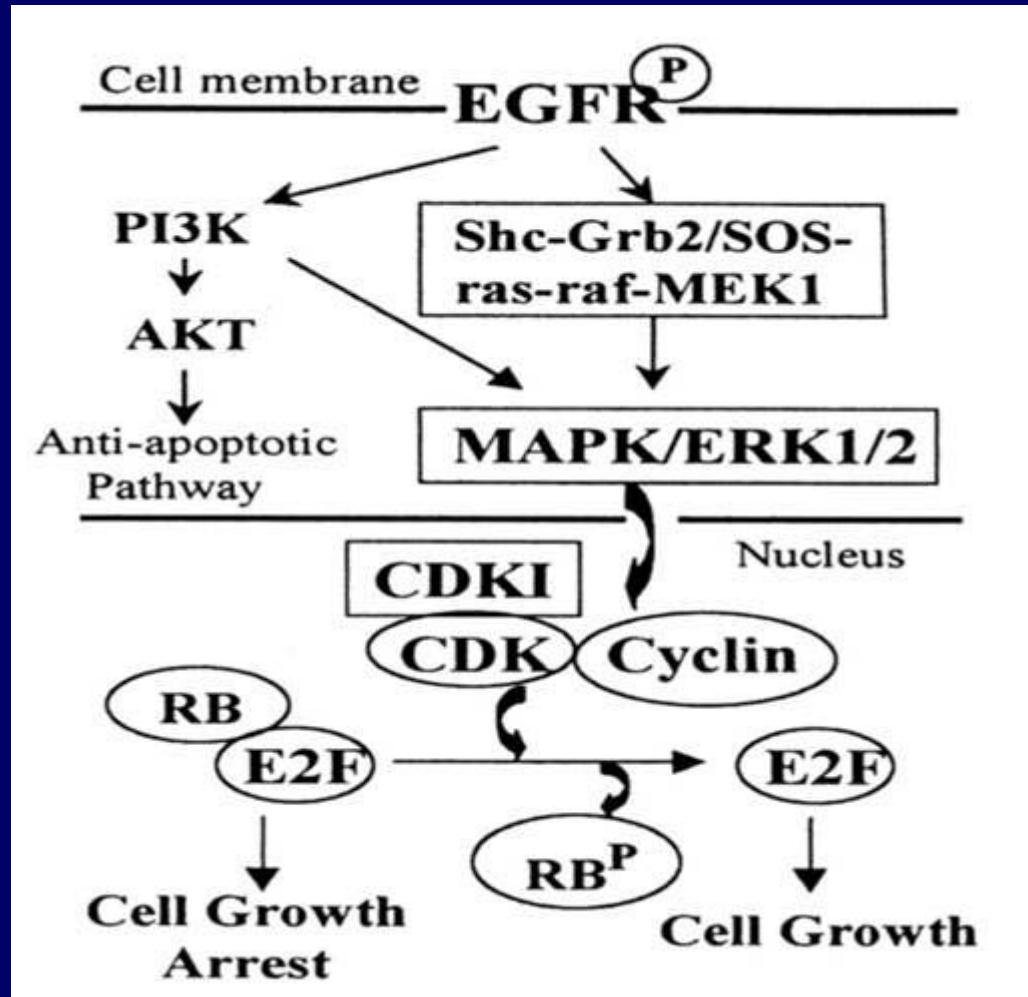
ZÁKLADNÍ MECHANISMY NÁDOROVÉ PROMOCE

- **Mitogenní efekt, zvýšení buněčné proliferace, vyvázání z kontaktní inhibice růstu, role onkogenů (mutanty ras, myc, β -cat,..) a inaktivace tumorových supresorů**
 - interference s transdukčními signály, které kontrolují normální buněčný růst a diferenciaci (aktivace EGFR/ErbB2-ras-ERK, aktivace proteinkinázy C např. produkcí DAG po expozici forbolestery), produkce ROS, aberantní produkce růstových faktorů atd.
 - aktivace ER- nebo AR-dependentní buněčné proliferace
- **Inhibice apoptózy (nefunkční tumorové supresory, např. p53) = další mechanismus přežívání buněk**
- **Inhibice mezibuněčné komunikace (GJIC), disrupce adherence buněk , angiogeneze**

MECHANISMY NEGENOTOXICKÝCH PROCESŮ

- „klasické“ epigenetické mechanismy (methylace DNA nebo acetylace/deacetylace histonů) – de/diferenciace
- genová instabilita
- strukturní a funkční změny cytoplasmatické membrány, efekty na intercelulární komunikaci (např. inhibice GJIC, disrupce adherence) - vyvázání se z homeostatické kontroly okolních buněk, angiogeneze, procesy související s progresí a metastázem

PŘÍKLAD AKTIVACE BUN. PROLIFERACE (aktivací signální transdukce)

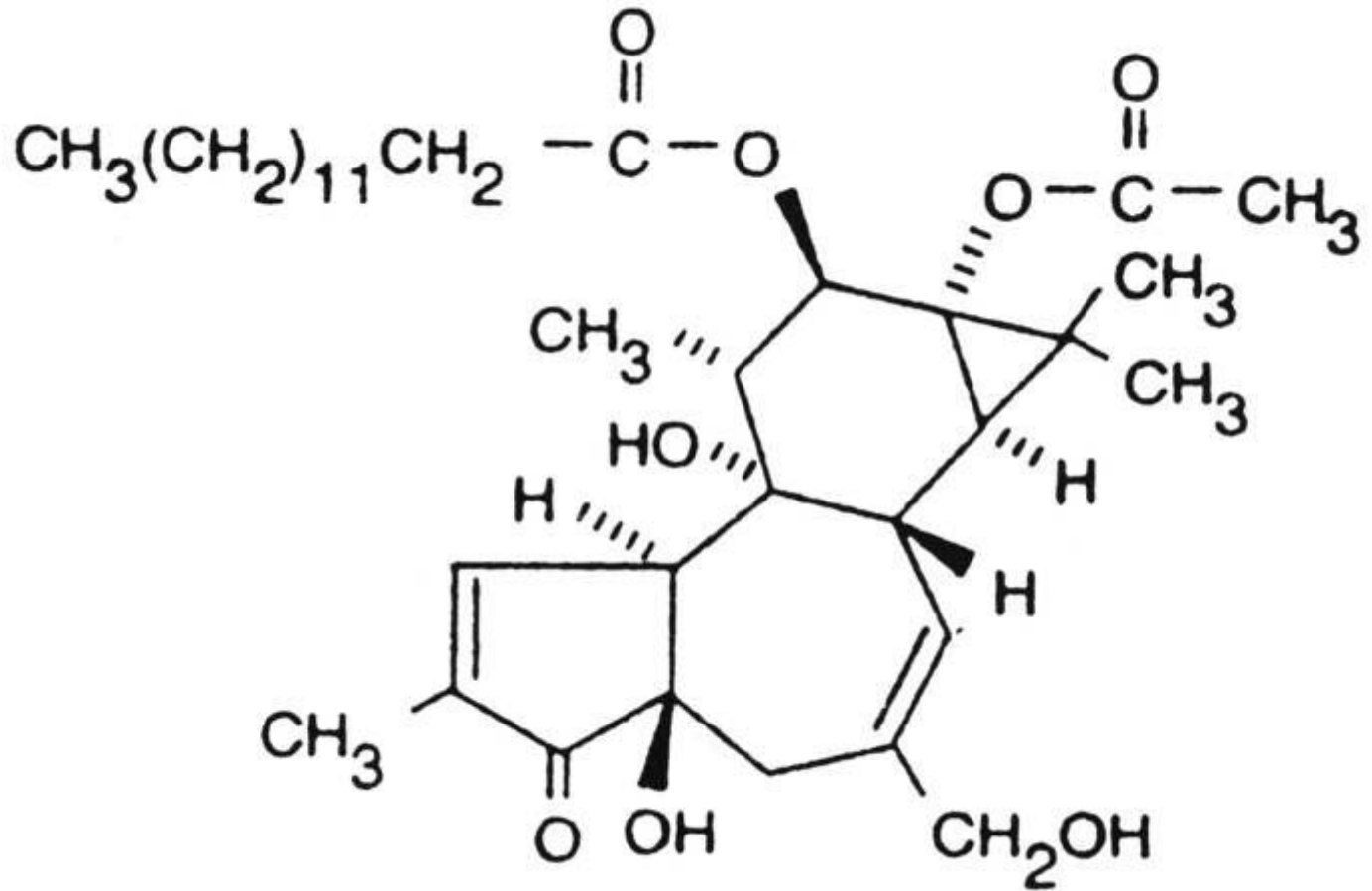


MECHANISMY NEGENOTOXICKÝCH PROCESŮ

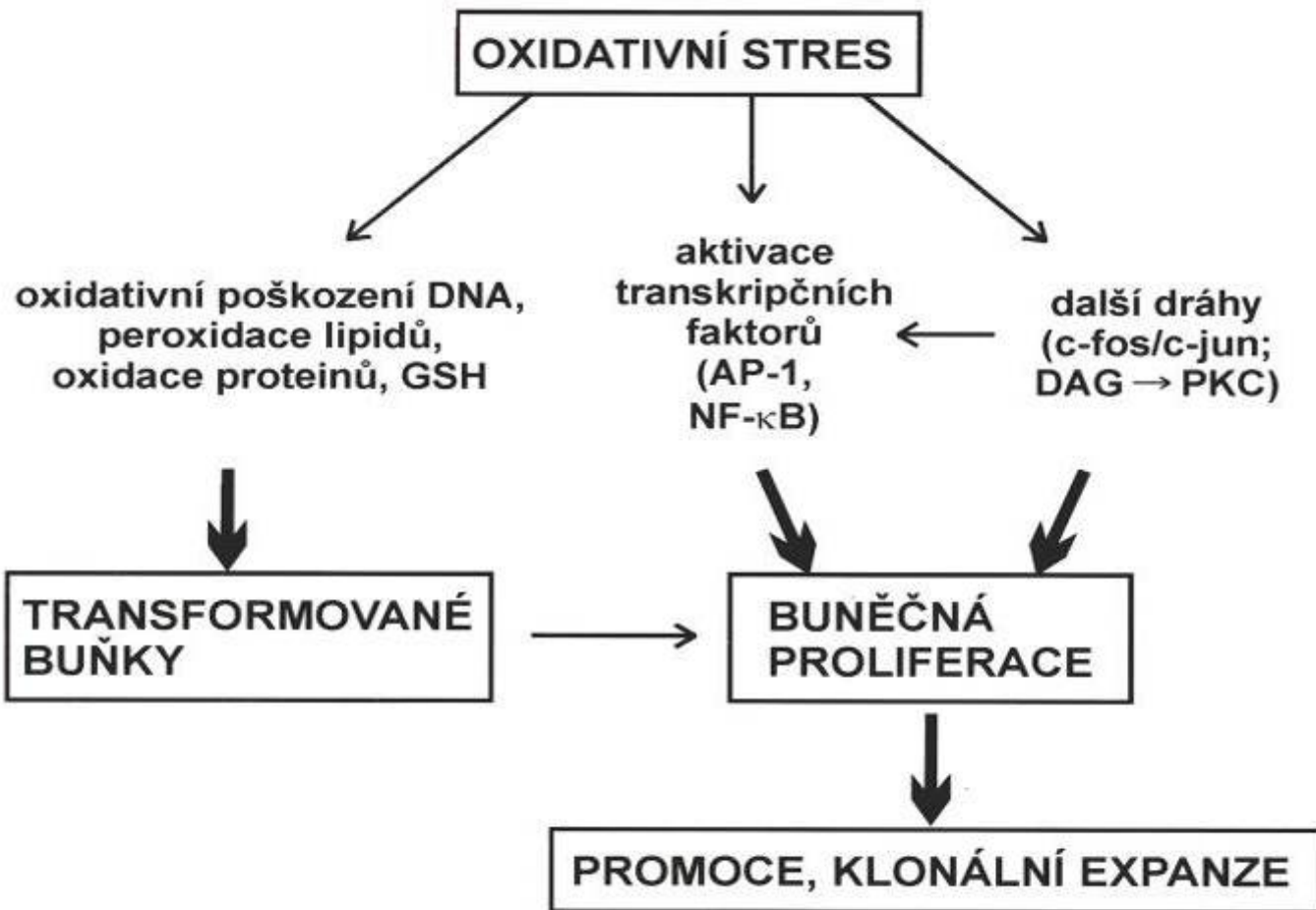
orbol-
yristátacetát
PMA, TPA
modelový
(umor. promoter)



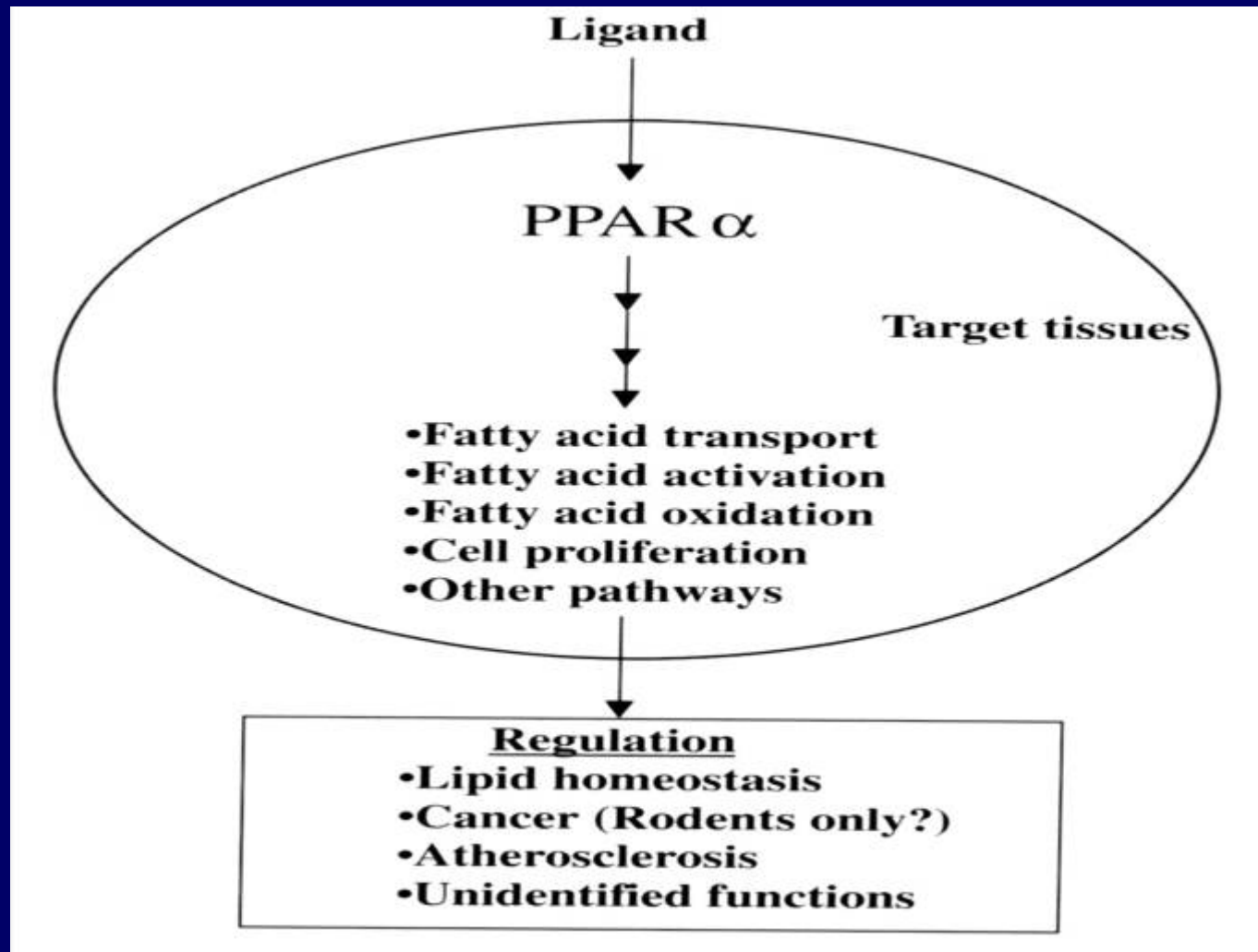
aktivace PKC-
RK:
hyperfosforylace
x, inhibice GJIC
mitogenní efekty



DŮSLEDKY OXIDATIVNÍHO STRESU



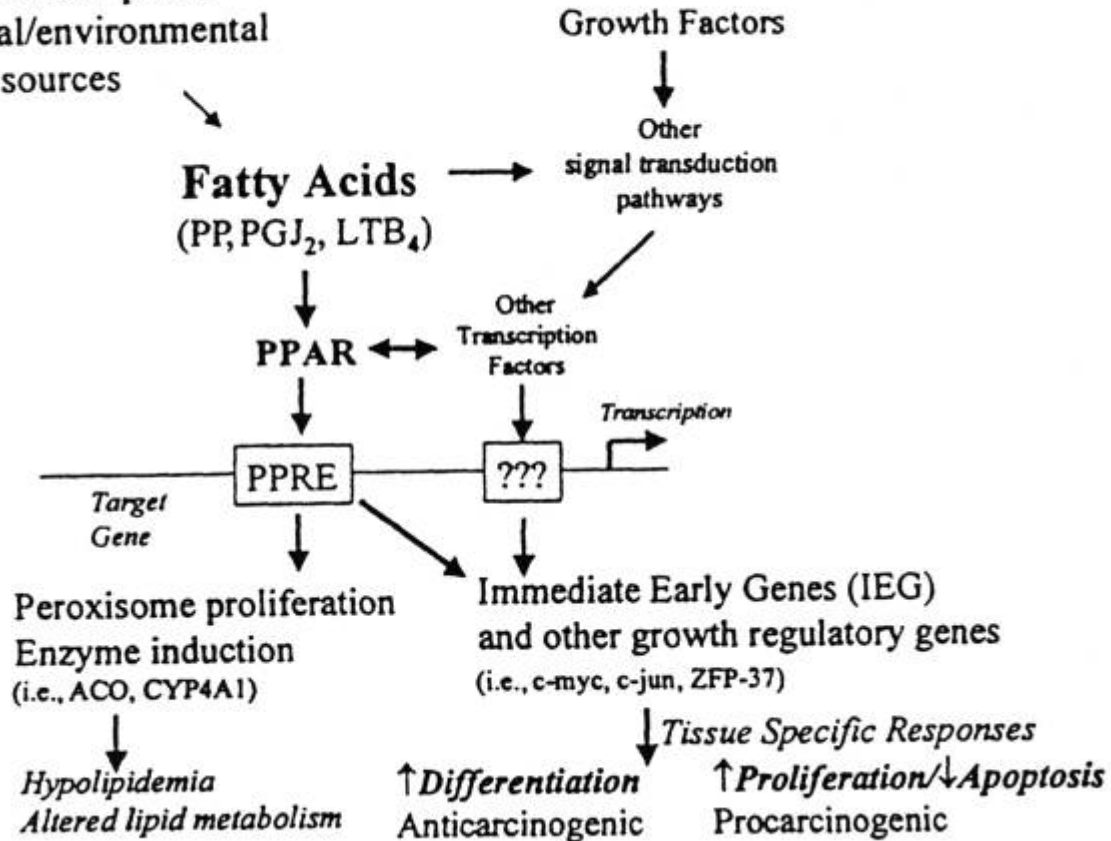
DŮSLEDKY AKTIVACE PPAR α



erovnoměrná
dukce CYP4A
(redl. produkt: H₂O₂)
dalších enzymů
(apř. CAT)
ependentních
a PPARalfa

DÜSLEDKY AKTIVACE PPAR α

- Diet
- Intracellular and extracellular pools
- Clinical/environmental sources

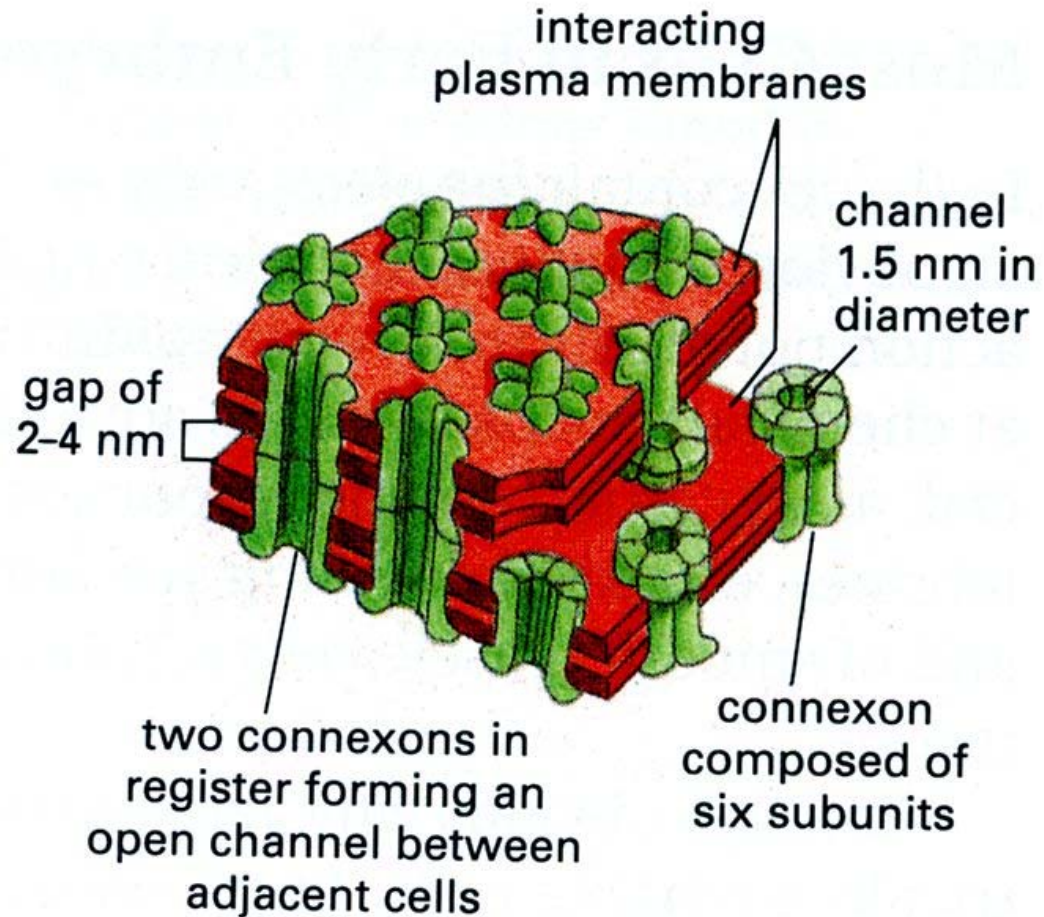


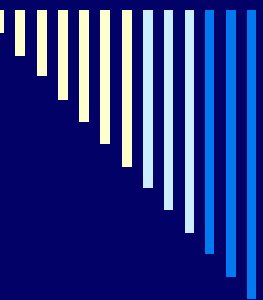


**DISRUPCE MEZIBUNĚČNÝCH SPOJENÍ –
VEDE K NÁDOROVÉ PROMOCI, INVAZITĚ A
METASTÁZÍM**

INTERCELULÁRNÍ SPOJENÍ GJIC

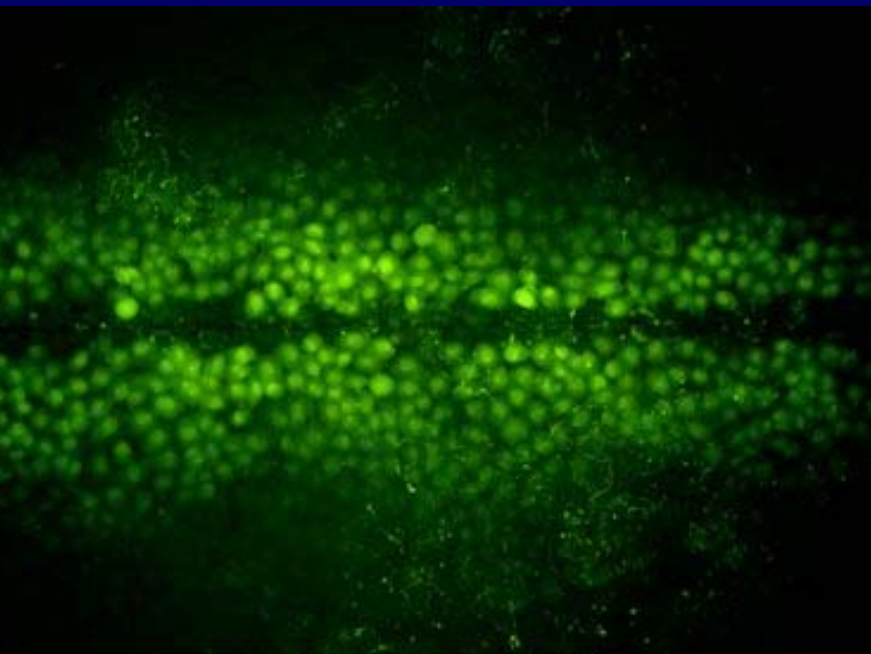
Základní stavební jednotkou jsou proteiny konexiny (connexin 32, 43 atd.), které tvoří hexamery (konexony); konexony sousedních buněk mohou tvořit společný kanál, kterým procházejí signální molekuly (cAMP, Ca^{2+} atd.)



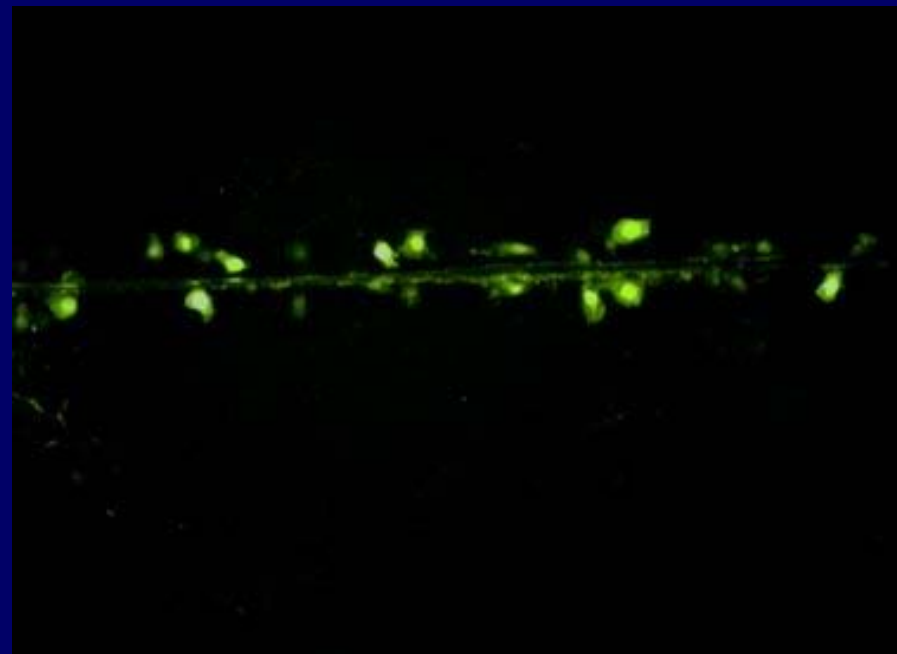


INHIBICE GJIC

(scrape-loading / dye transfer assay; prostup fluoreskující luciferové žluti monovrstvou buněk)

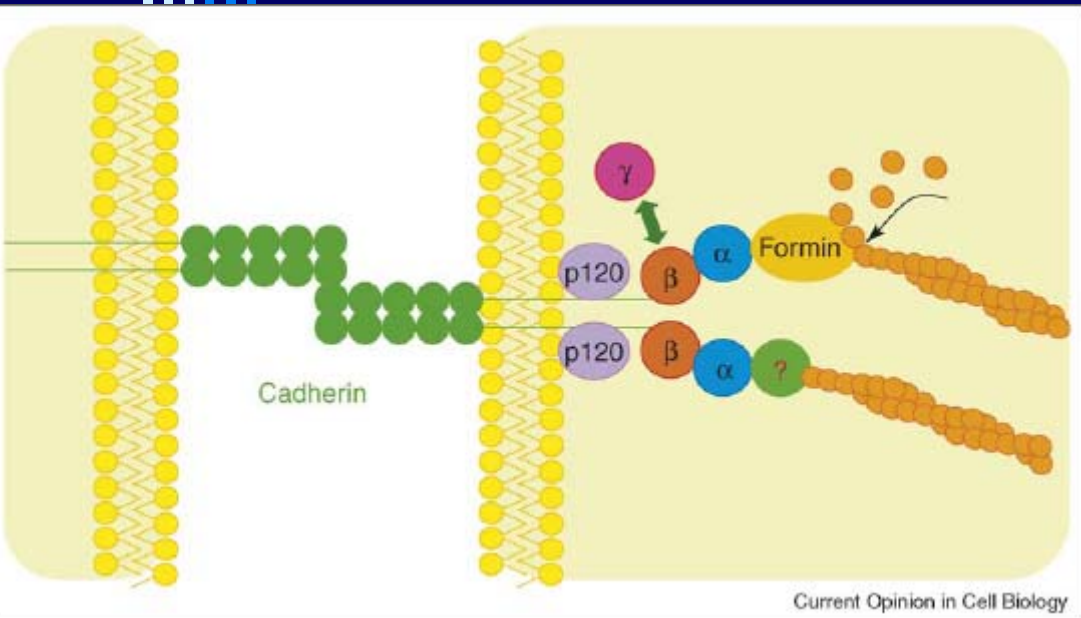


kontrola

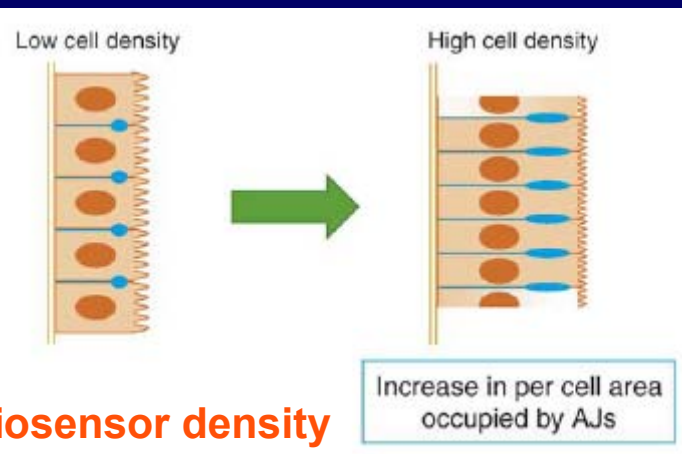
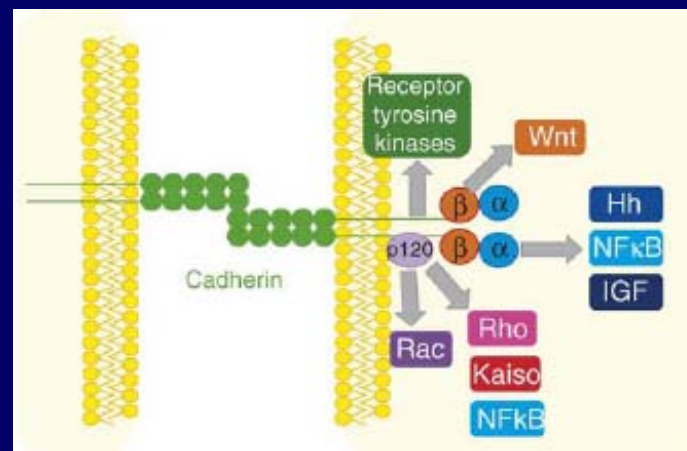


expozice TPA (produkce DAG, aktivace PKC a ERK1/2, hyperfosforylace konexinu)

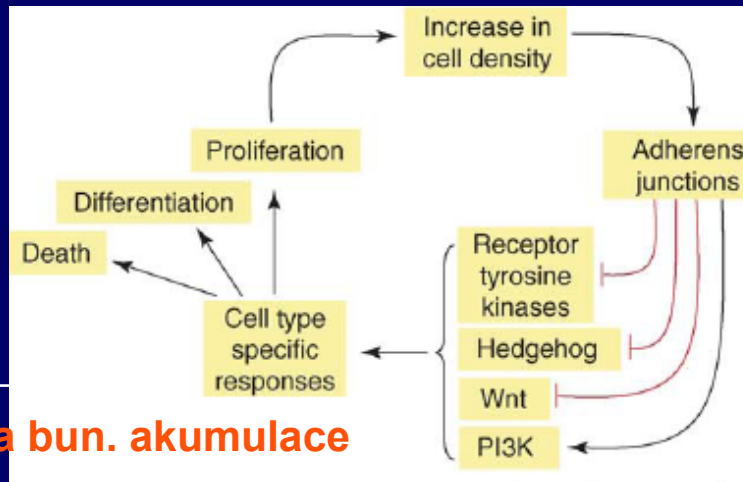
DISRUPCE ADHERENTNÍCH SPOJENÍ (ADHERENS JUNCTIONS)



signálování kateninu/cadherinu



osensor density



kontrola bun. akumulace

DISRUPCE ADHERENTNÍCH SPOJENÍ (ADHERENS JUNCTIONS)

