HLAVNÍ MECHANISMY TOXICITY CIZORODÝCH LÁTEK

Laboratory of Cytokinetics

VÚVEL

HLAVNÍ MECHANISMY TOXICITY XENOBIOTIK

- „Přímé“ mutageny / genotoxiny; metabolická aktivace promutagenů, adukty s proteiny a DNA, chromosomální aberace; oxidativní stres - oxidativní poškození DNA.

- Modulace intracelulární signální transdukce a změny genové exprese, oxidativní stres, poruchy metabolismu endogenních látek aj.

- AhR-dependentní (dioxinová) aktivita
- Další receptor-dependentní mechanismy endokrinní disrupce (např. estrogenita, antiestrogenita).

- Inhibice mitochondriálních funkcí (respirace, syntéza ATP, ale také apoptóza); efekty v buněčných membránách

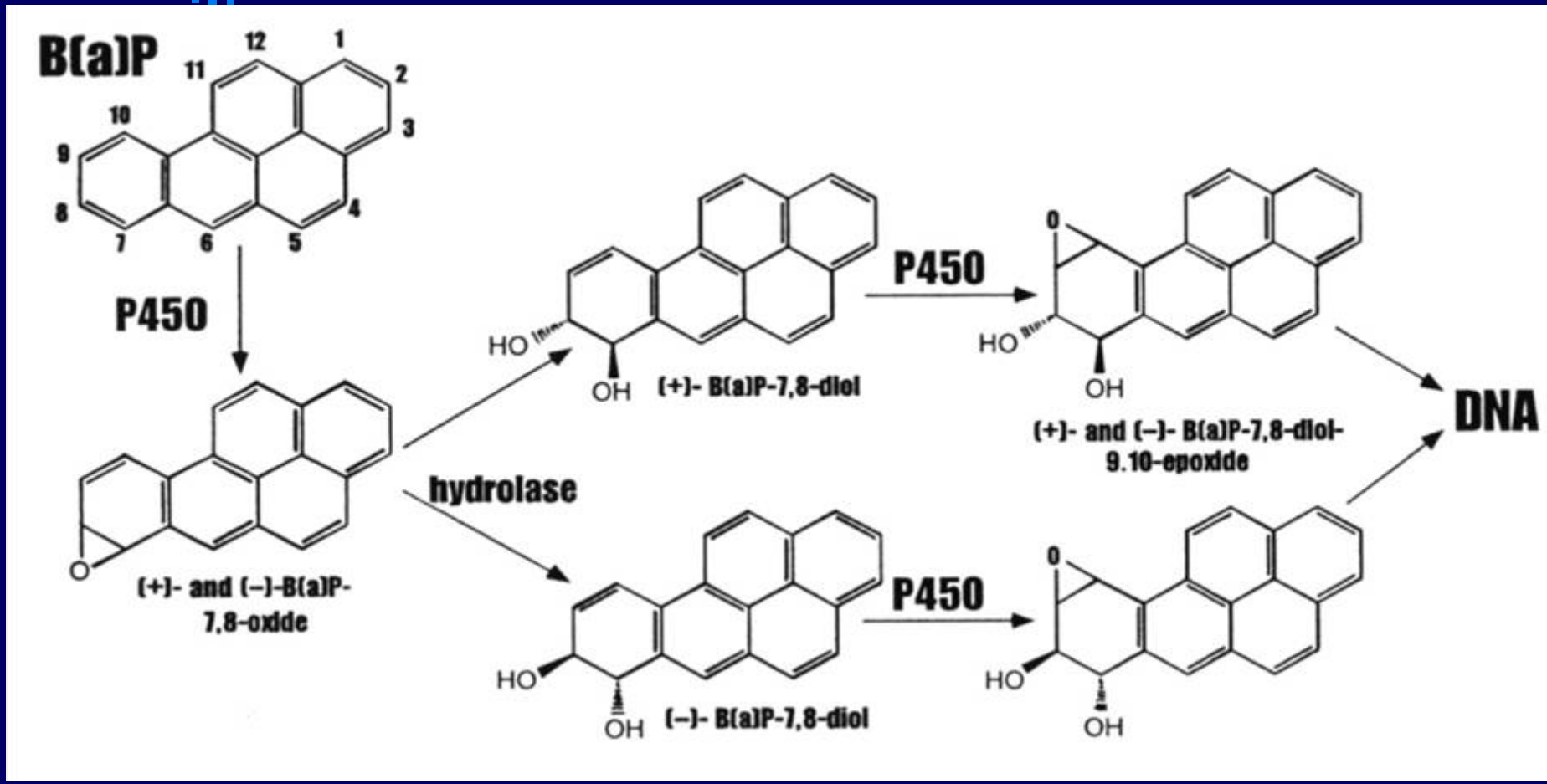
- Reprodukční poruchy, neurotoxicita, imunotoxicita, nádorová promoce, karcinogeneze aj.

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

- Modulace buněčného cyklu, zvýšená proliferace buněk, modulace diferenciace, inhibice apoptózy
- Disrupce mezibuněčných spojení (gap junctions, adherens junctions,...)

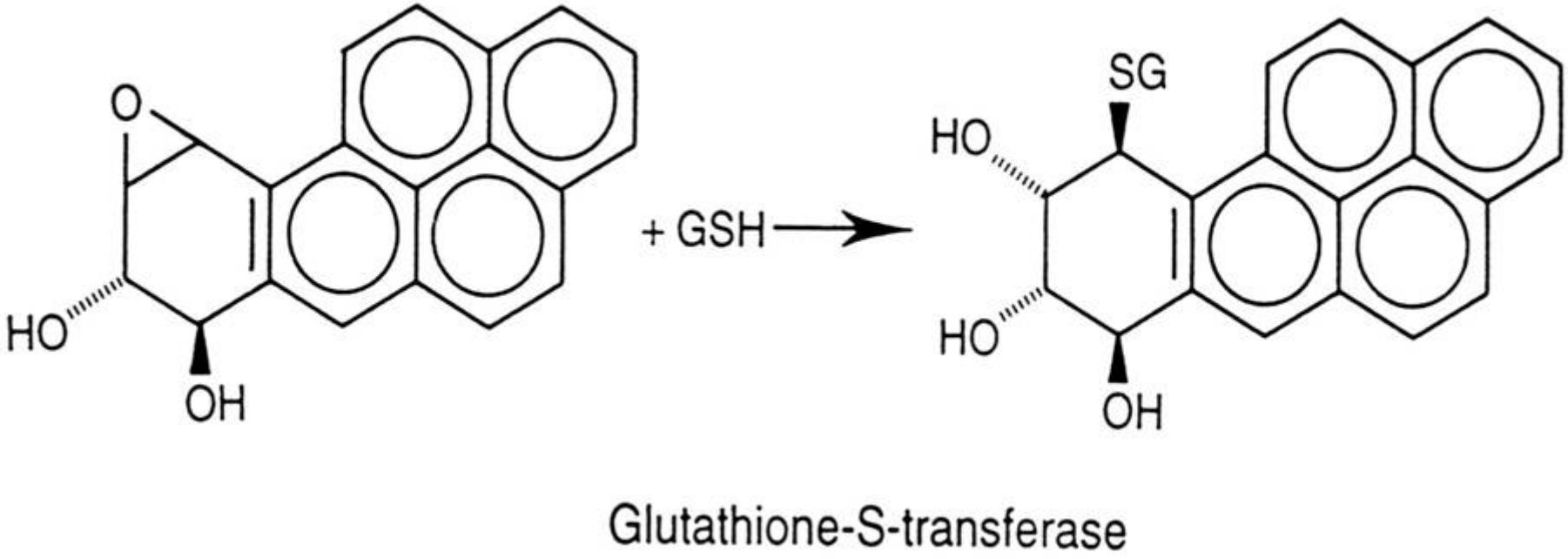
- Cytotoxicita, indukce apoptózy
- Přežívání, transformace buněk (komplexní mnohastupňový proces iniciace, promoční mechanismy – de/diferenciace, angiogeneze, ...)

GENOTOXICITA – METABOLICKÁ AKTIVACE POLYCYKLICKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ



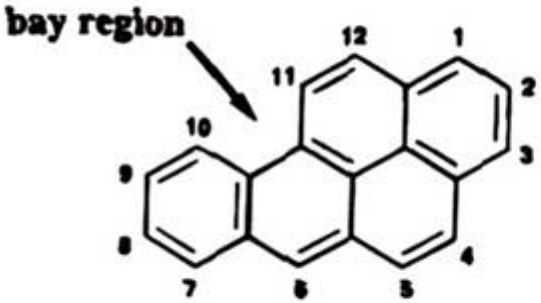
DETOXIKACE POLYCYKLICKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ:

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

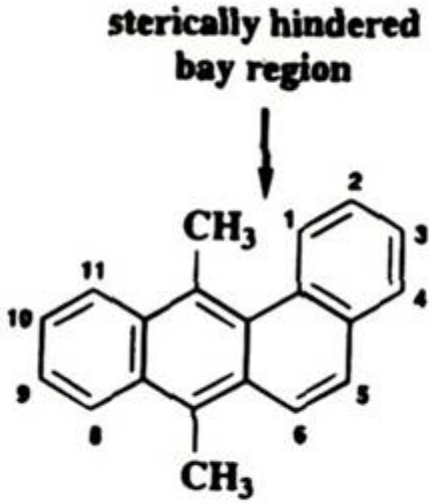


GENOTOXICITA – METABOLICKÁ AKTIVACE POLYCYKLICKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ

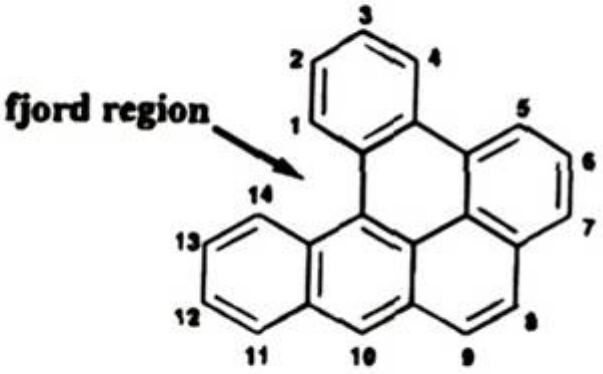
Hlavní enzymy metabolické aktivace PAHs:
CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1



B[*a*]P



DMBA



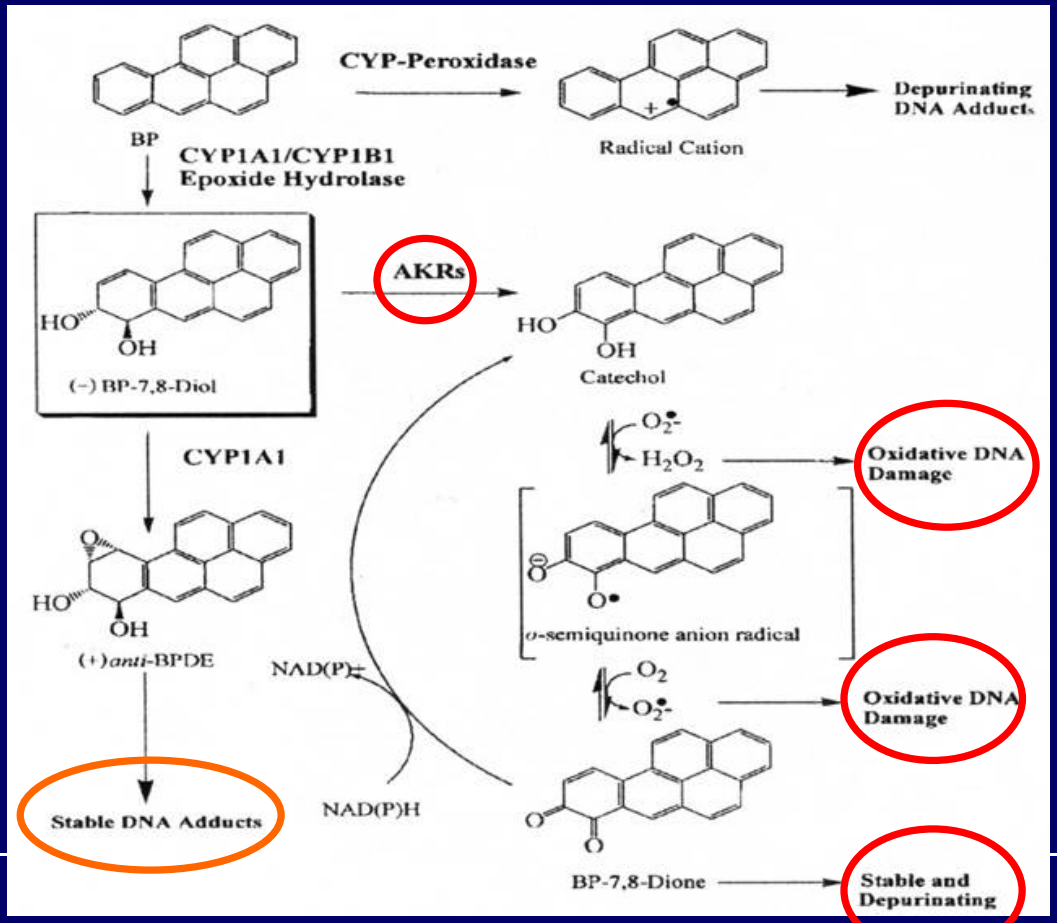
DB[*a*,*l*]P

Laboratory of Cytokinetics

VÚVEL

GENOTOXICKÉ EFEKTY PAHs A POSTGENOTOXICKÉ SIGNÁLY

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



Oxidativní stres

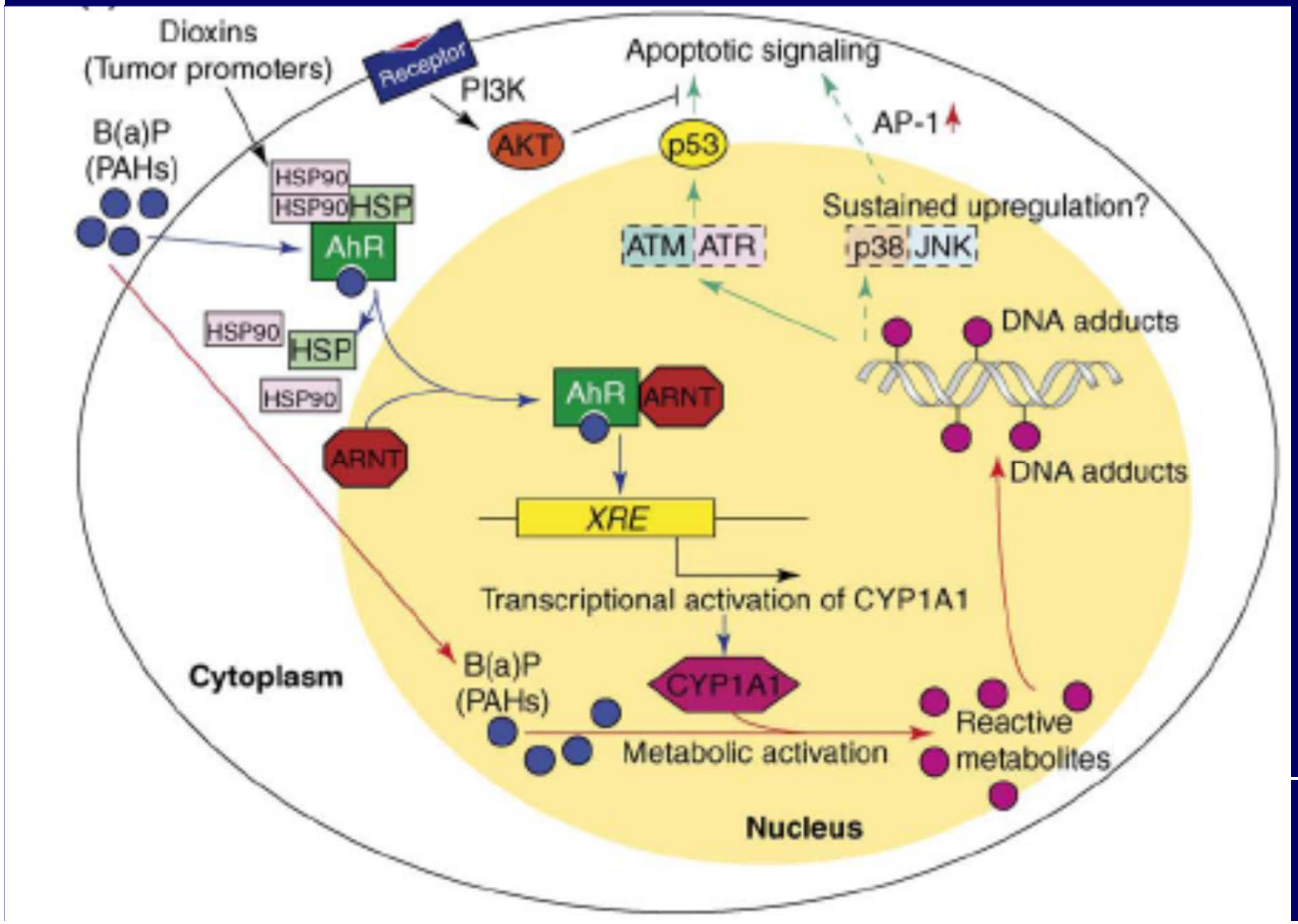
Oxidativní poškození DNA (oxidace bazí, apurinová místa)

Stabilní adukty DNA-PAH

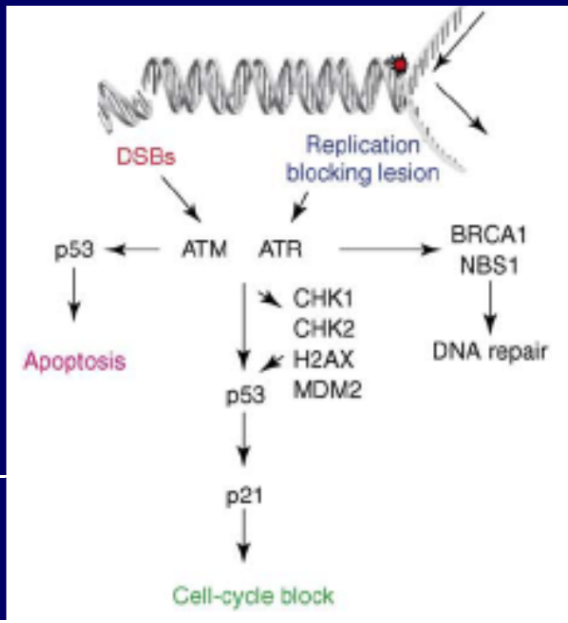
GENOTOXICKÉ EFEKTY PAHs A POSTGENOTOXICKÉ SIGNÁLY

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

Roos, Kaina, 2006



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

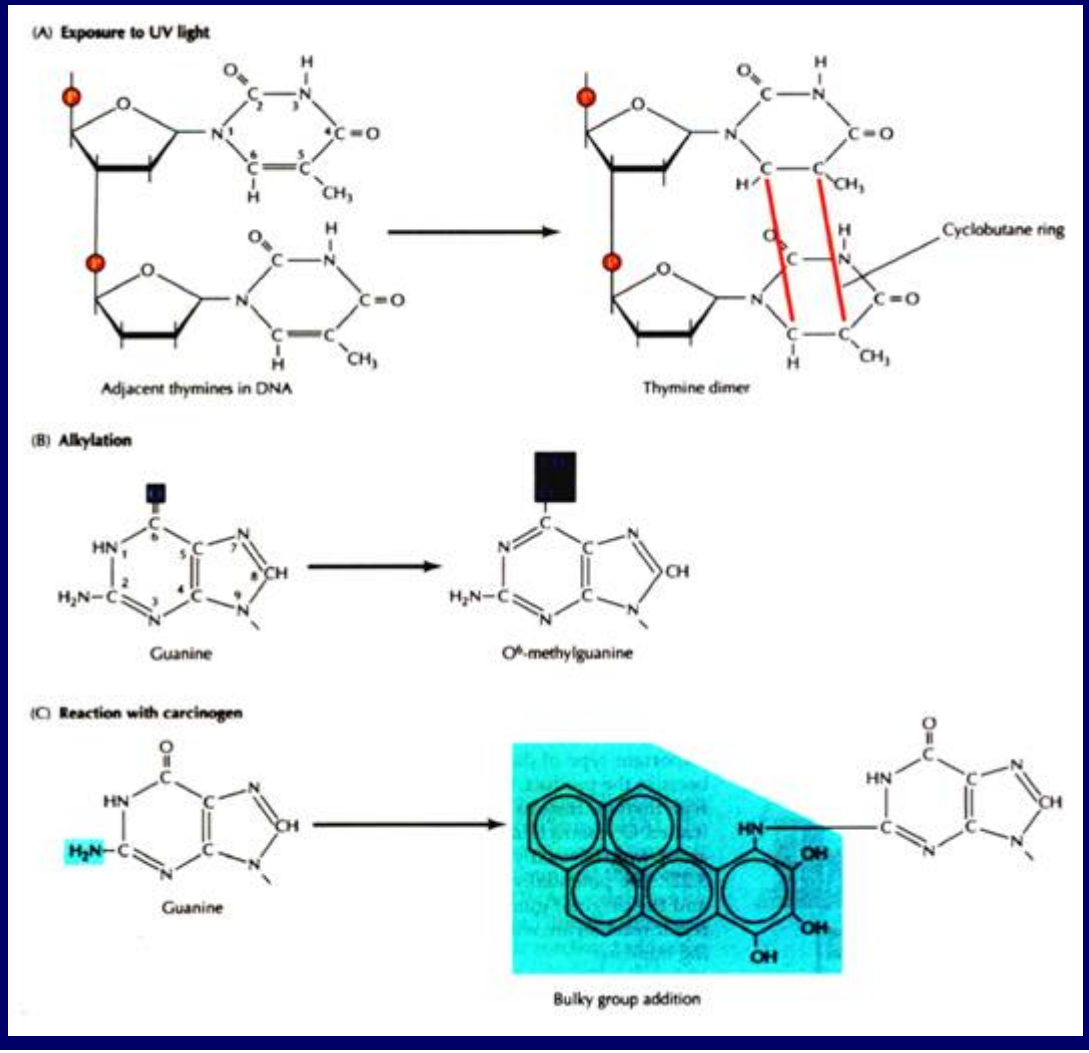


HLAVNÍ TYPY POŠKOZENÍ DNA

UV záření:
dimerizace

Alkylace (methylace)
= O ⟶ -OCH_3

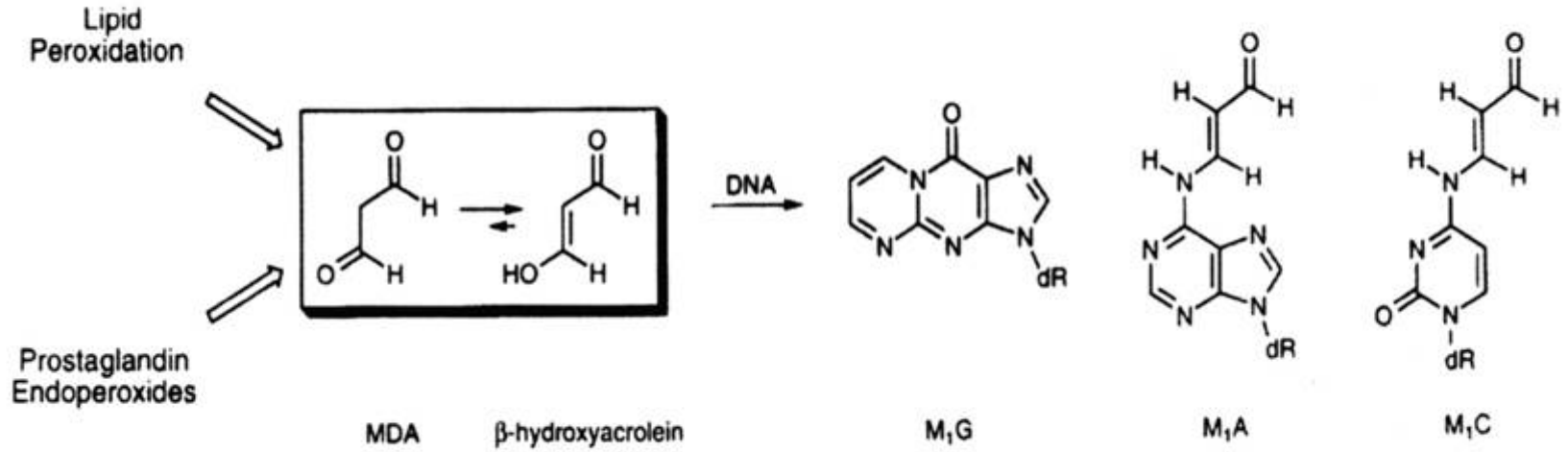
Vznik „bulky adducts“



Laboratory of Cytokinetics

VÚVEL

MALONDIALDEHYD - TYPICKÝ PRODUKT PEROXIDACE LIPIDŮ TVOŘÍ ADUKTY S DNA



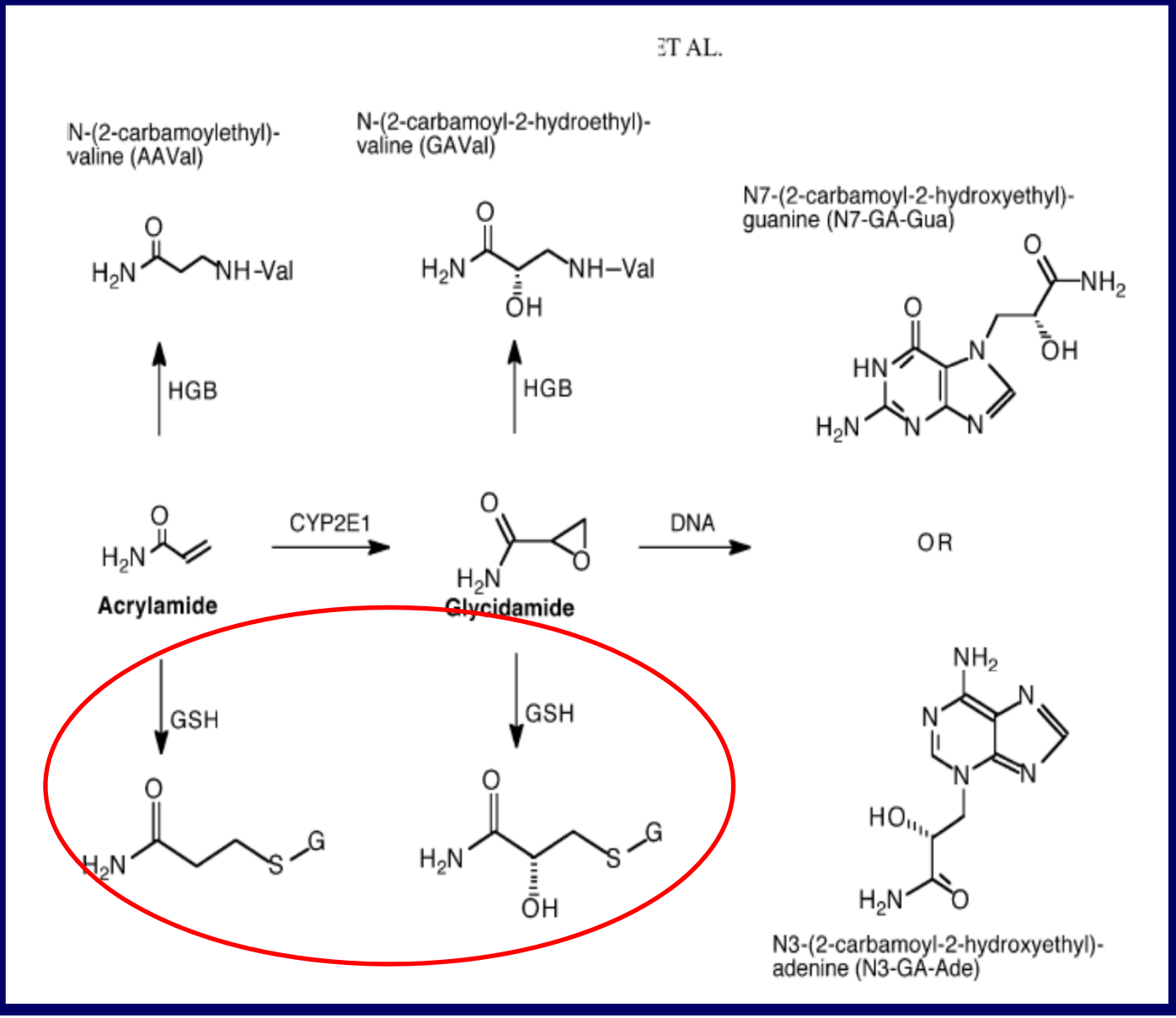
AKRYLAMID:

-detoxikace

-metabolická aktivace

-tvorba aduktů s proteiny

-tvorba aduktů s DNA



OXIDATIVNÍ POŠKODZENÍ DNA

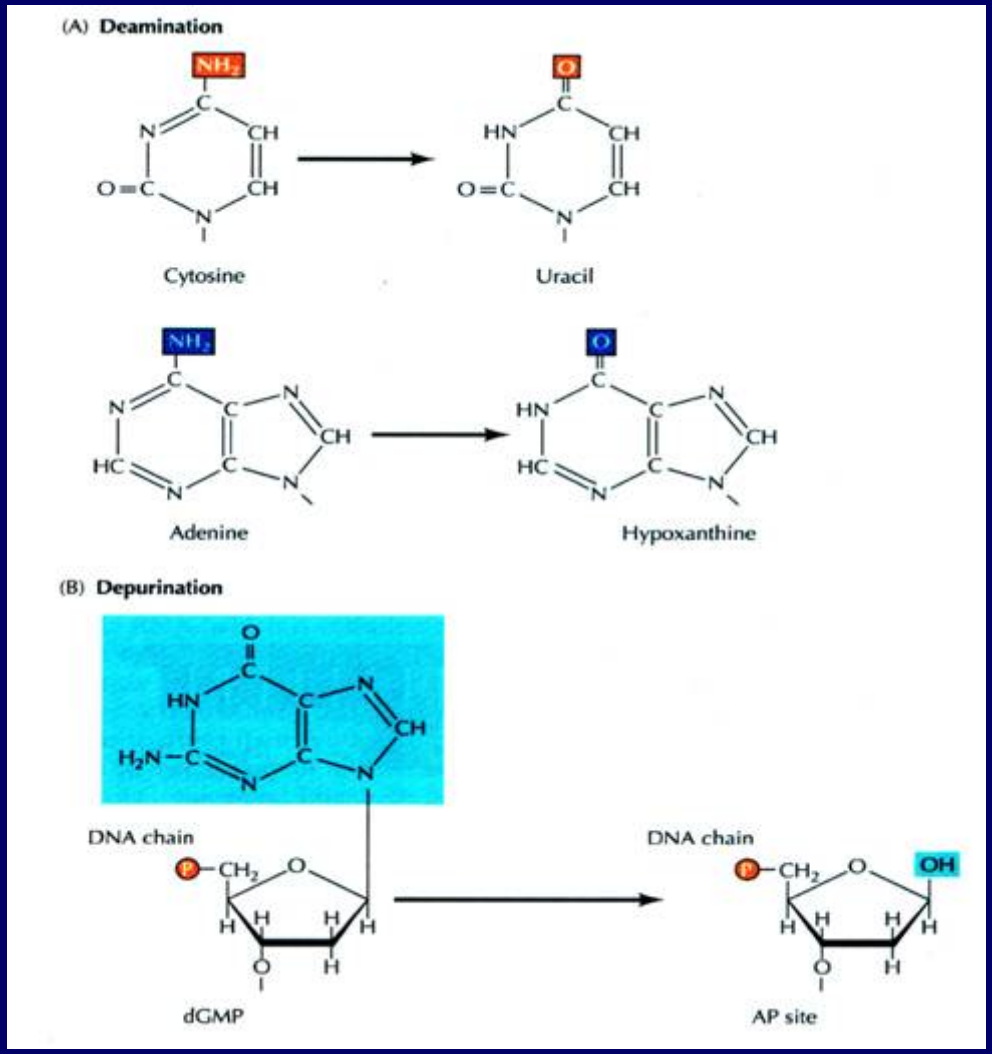
Laboratory of Cytokinetics

VÚVEL

HLAVNÍ TYPY POŠKODZENÍ DNA („apurinic sites“)

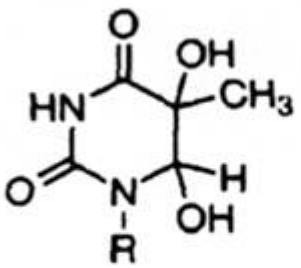
Oxidativní deaminace

Depurinace (nestabilní modifikované nukleotidy)

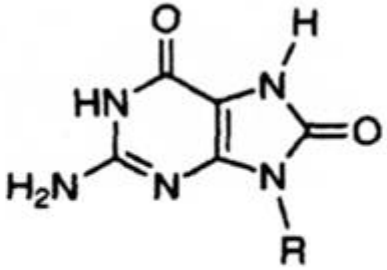


PRODUKTY OXIDATIVNÍHO POŠKODZENÍ DNA

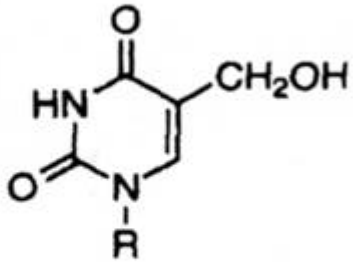
Biomarker oxidativního poškození DNA (stanovení HPLC)



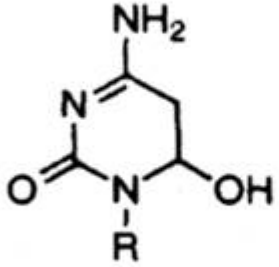
thymine glycol



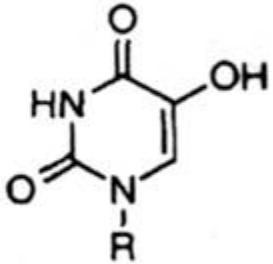
8-oxo-dG



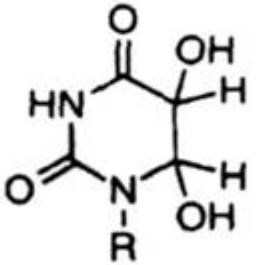
5-hydroxymethyluracil



6-hydroxy-5,6-dihydrocytosine



5-hydroxyuracil

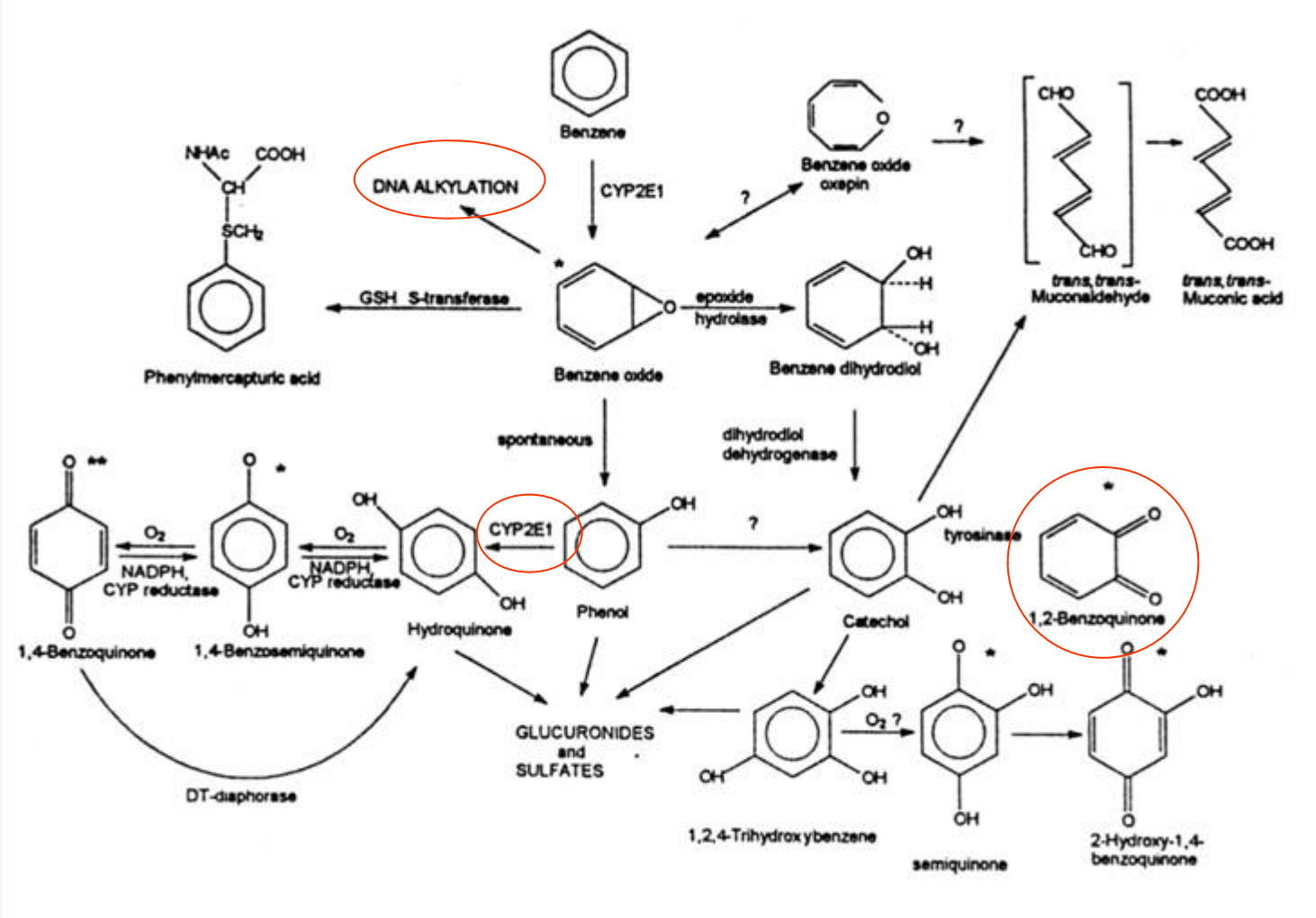


uracil glycol

Laboratory of Cytokinetics

VÚVEL

METABOLICKÁ AKTIVACE A DETOXIKACE BENZENU:



Laboratory of Cytokinetics
VÚVEL

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, diaminooxidáza, xanthinoxidáza)
- aktivace O_2 v cyklu P450 (např. pomalu metabolizované substráty CYP2B – fenobarbital, lindan)
- vyvolání ox. stresu v lab. experimentech: přímá produkce ROS (t-BuHP, cis-DPP), snížení hladiny GSH (+ dietylmaleát)
- chorobné stavy (reumatoidní choroby, záněty...)
- radiace

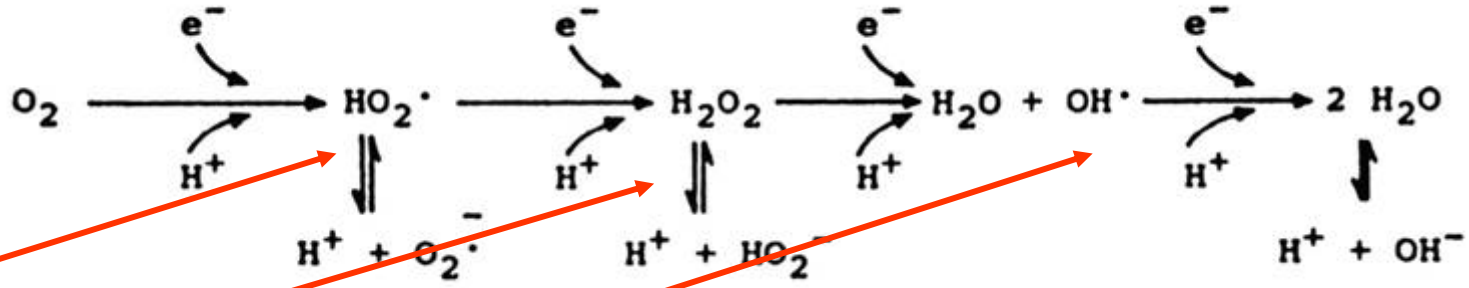
REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU (ROS)

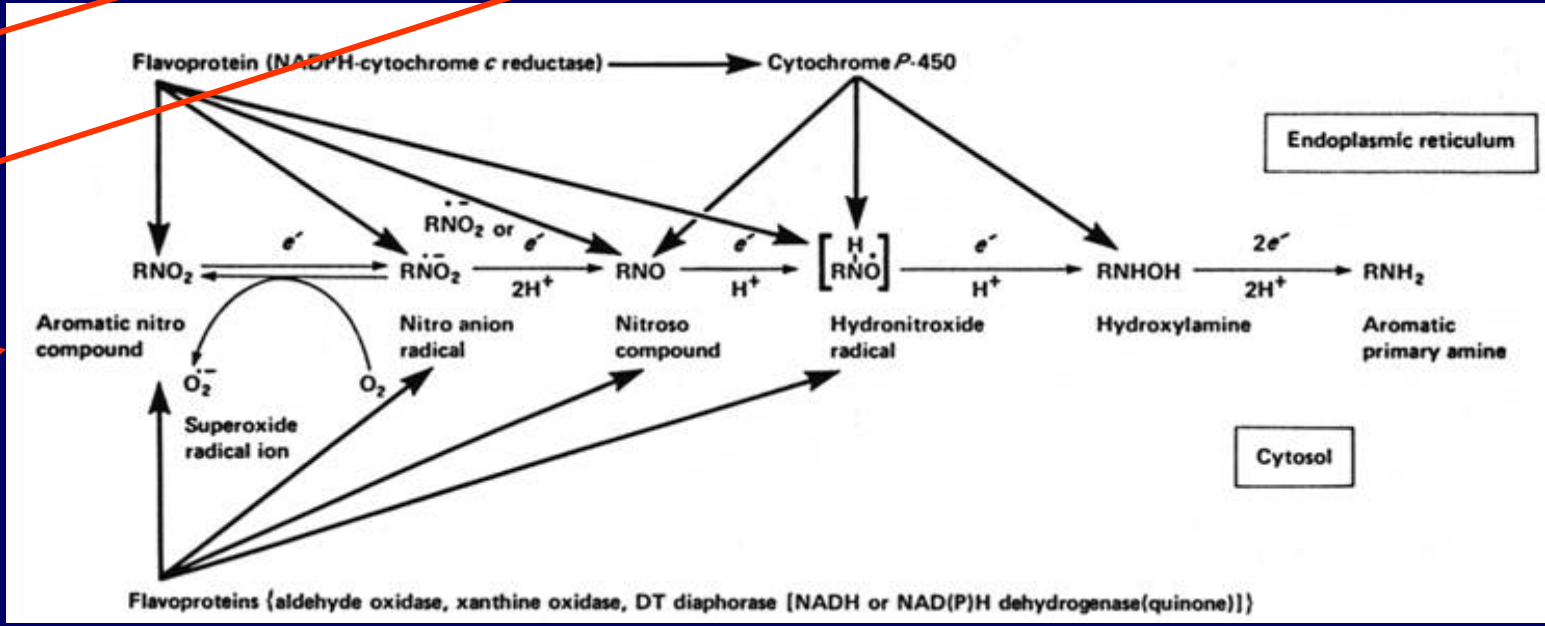
Superoxid

Peroxid

Hydroxylový radikál

Redukce nitrosloučenin

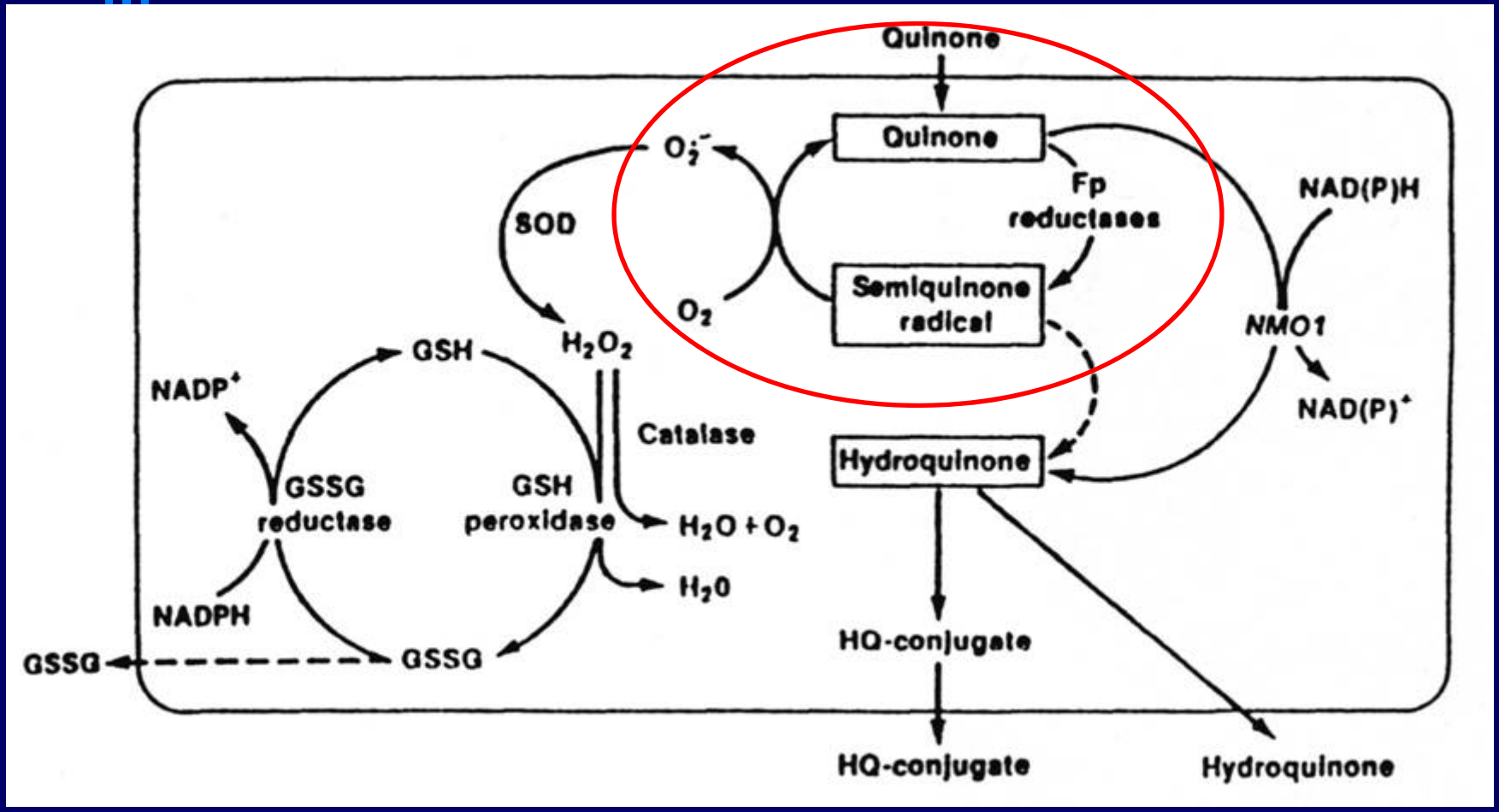




Laboratory of Cytokinetics

VÚVEL

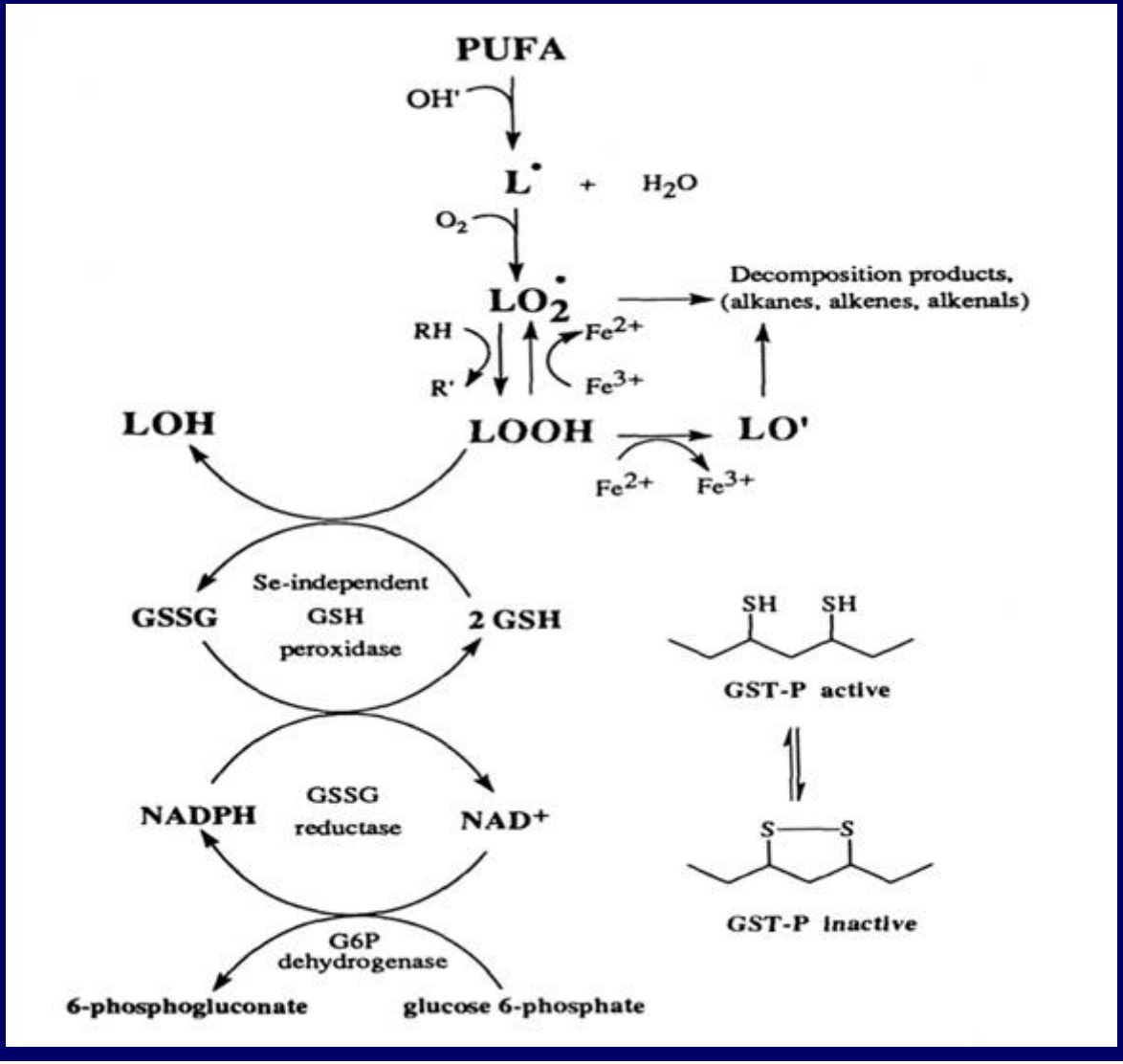
REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU:
redoxní cyklování chinonů / antioxidační enzymy



Laboratory of Cytokinetics

VÚVEL

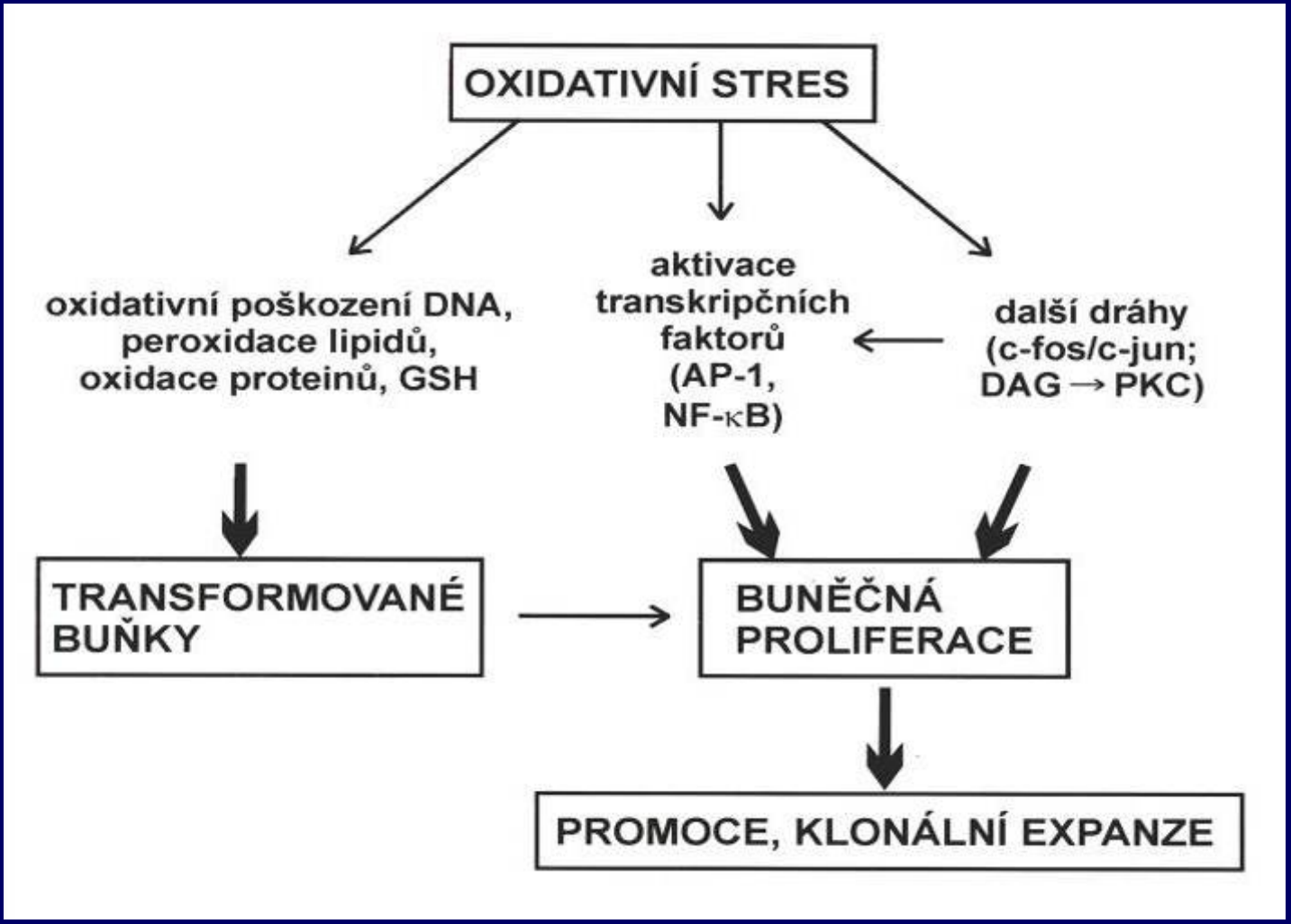
PEROXIDACE LIPIDŮ



Laboratory of Cytokinetics

VÚVEL

DŮSLEDKY OXIDATIVNÍHO STRESU



ENDOKRINNÍ DISRUPCE

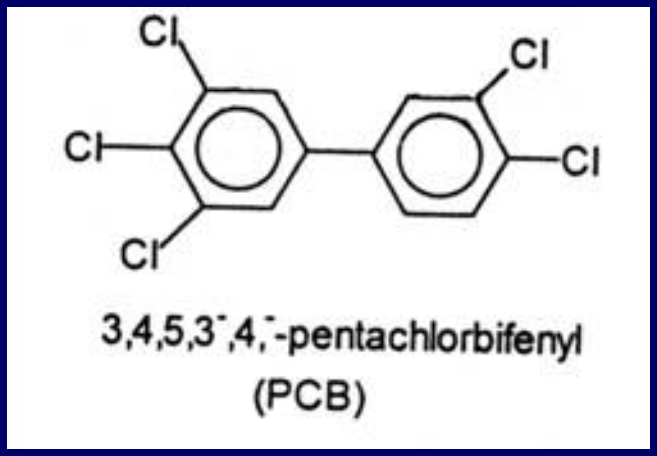
Laboratory of Cytokinetics

VÚVEL

AKTIVACE AhR A NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ

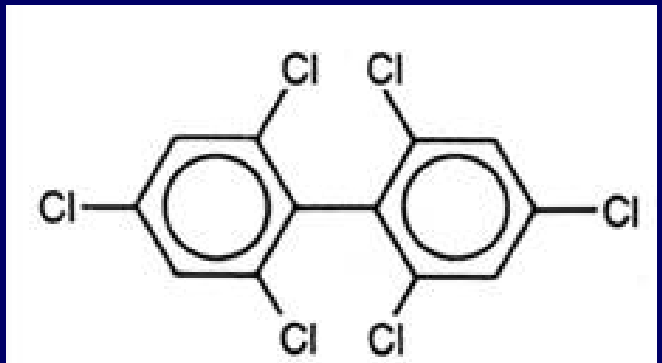
- Aktivace AhR (indukce CYP1A1/1A2/1B1; modulace bun. cyklu, imunosuprese, syndromy dioxinové toxicity).
- Xenobiotika jako estrogeny / antiestrogeny
- Androgeny / antiandrogeny
- Peroxisomální proliferátory
- Xenobiotika modulující thyroidní funkce

PCB - ENDOKRINNÍ DISRUPTORY



3,4,5,3',4'-pentachlorbifenyl
(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)

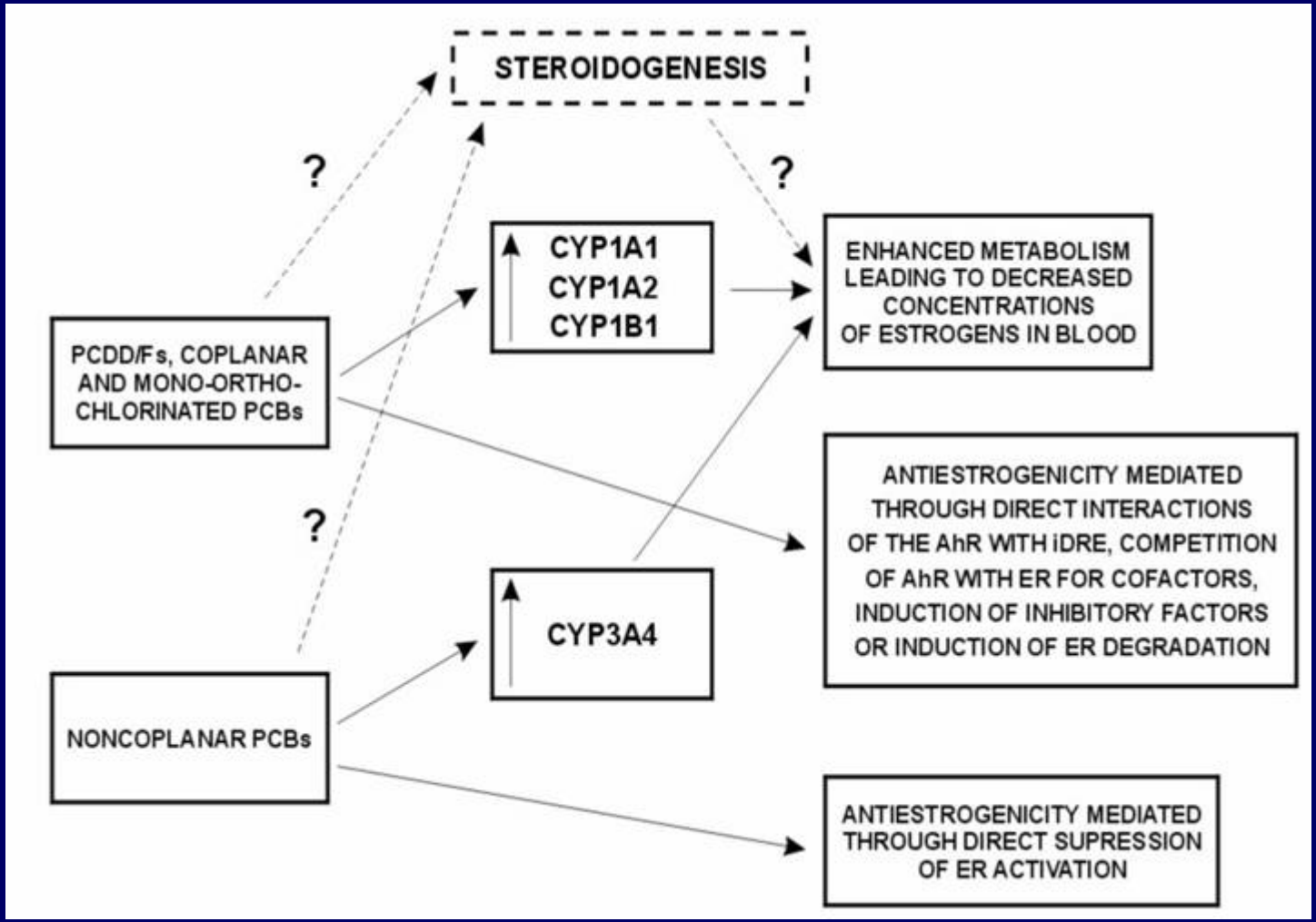
Nekoplanární PCB:
- nízkomolekulární kongenery mají estrogenní aktivitu;
- prevalentní výšechlorované PCB jsou antiestrogenní a antiandrogenní;
- vazba na thyroid binding protein;
- vazba na RyR (neurotoxicita)

PCB – (ANTI)ESTROGENITA

biosyntéza?

zvýšení metabolismu E2 = inaktivace hormonu

aktivace/ suprese ER

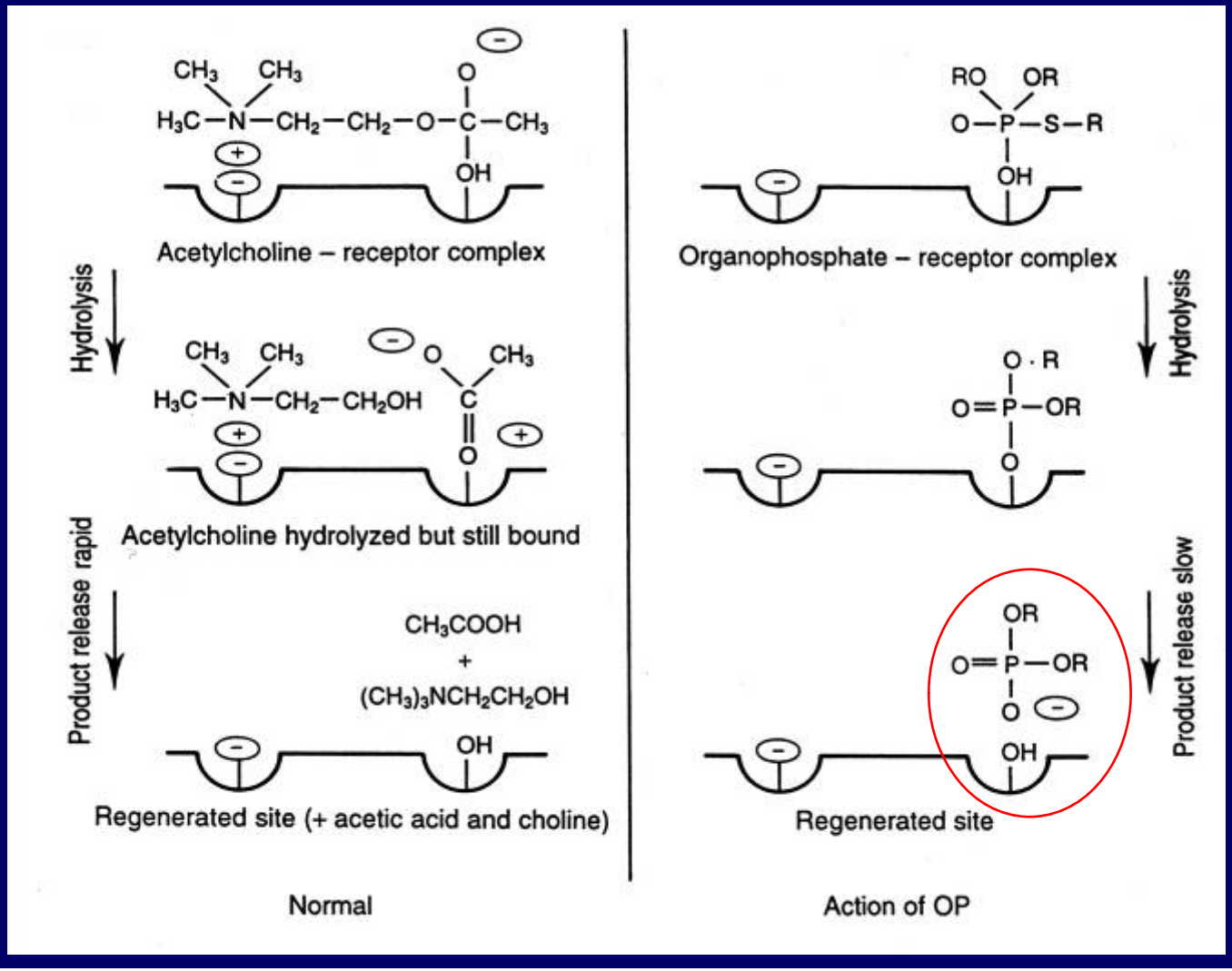


NEUROTOXICITA

- Inhibice acetylcholinesteráz (např. karbamáty, organofosfáty, ...)
- Interakce s ryanodyne receptorem (RyR) – modulace Ca2+
- Muskarinové cholinergní receptory; nerv. nikotinový receptor; nikotinový acetylcholinový receptor (nAChR)
- Modulace uvolňování dopaminu
- Poruchy diferenciace, růstu nervové tkáně, inhibice GJIC, další interakce

NEUROTOXICITA: inhibice AChE

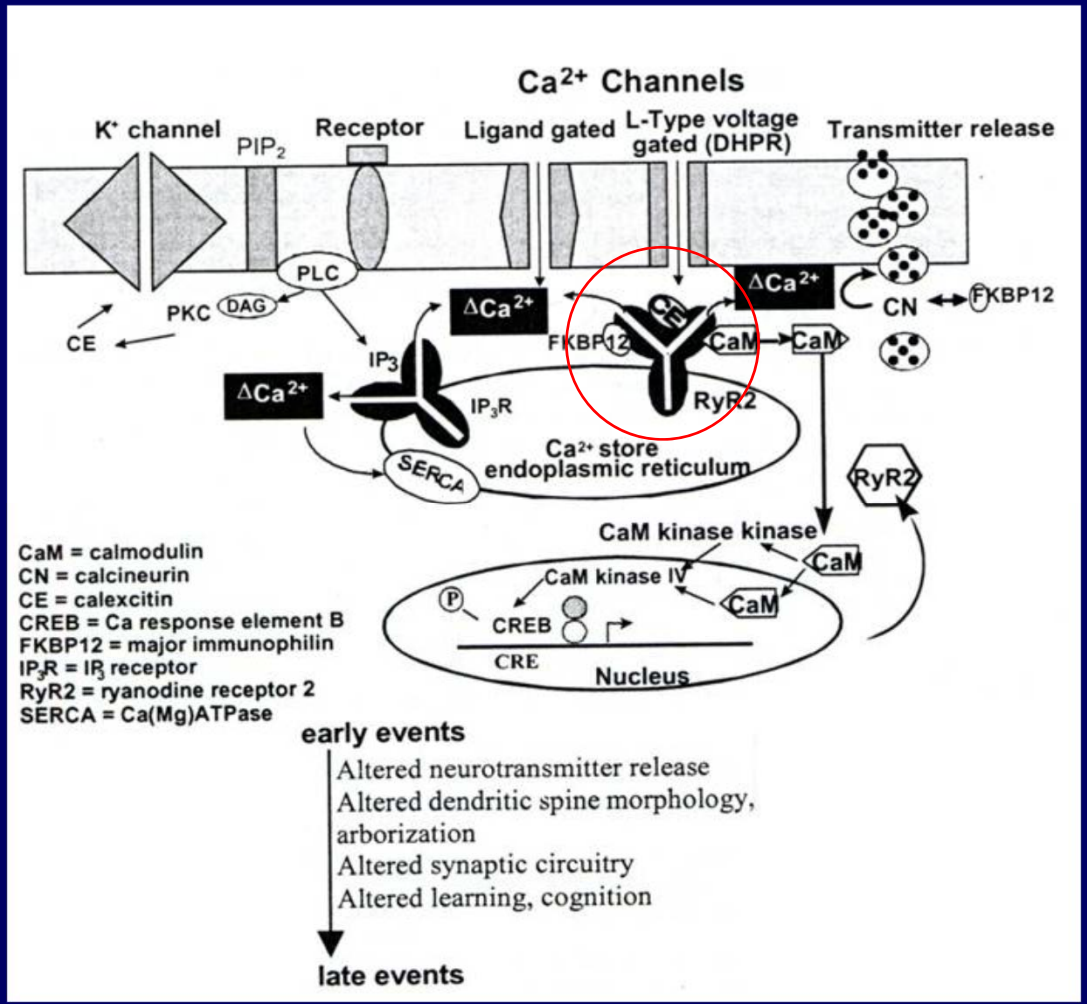
Zpomalení regenerace vazebného místa (uvolnění produktu esterázové reakce)



Laboratory of Cytokinetics

VÚVEL

NEUROTOXICITA: interakce s RyR a modulace Ca2+



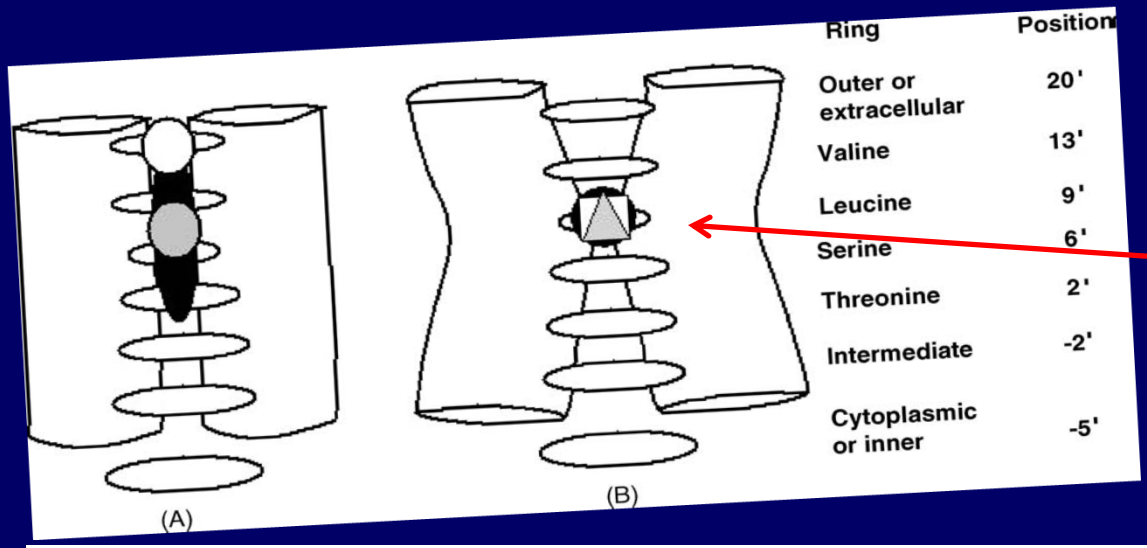
Laboratory of Cytokinetics

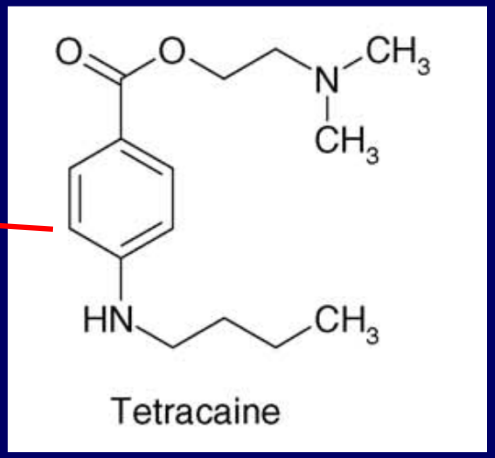
VÚVEL

NEUROTOXICITA

- **Cholinergní systém (neurony, které využívají acetylcholin jako neurotransmiter):**

1) muskarinové receptory patří do rodiny receptorů serotoninu, dopaminu
2) nikotinové receptory („ligand-gated cation channels“)





Laboratory of Cytokinetics

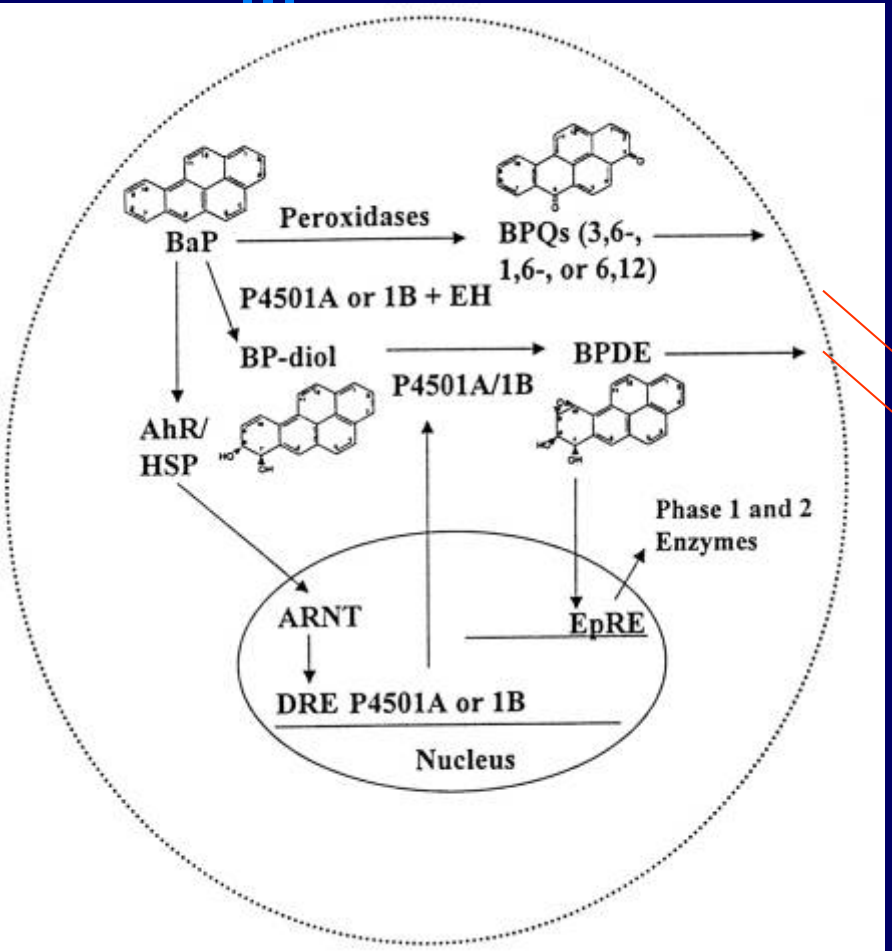
VÚVEL

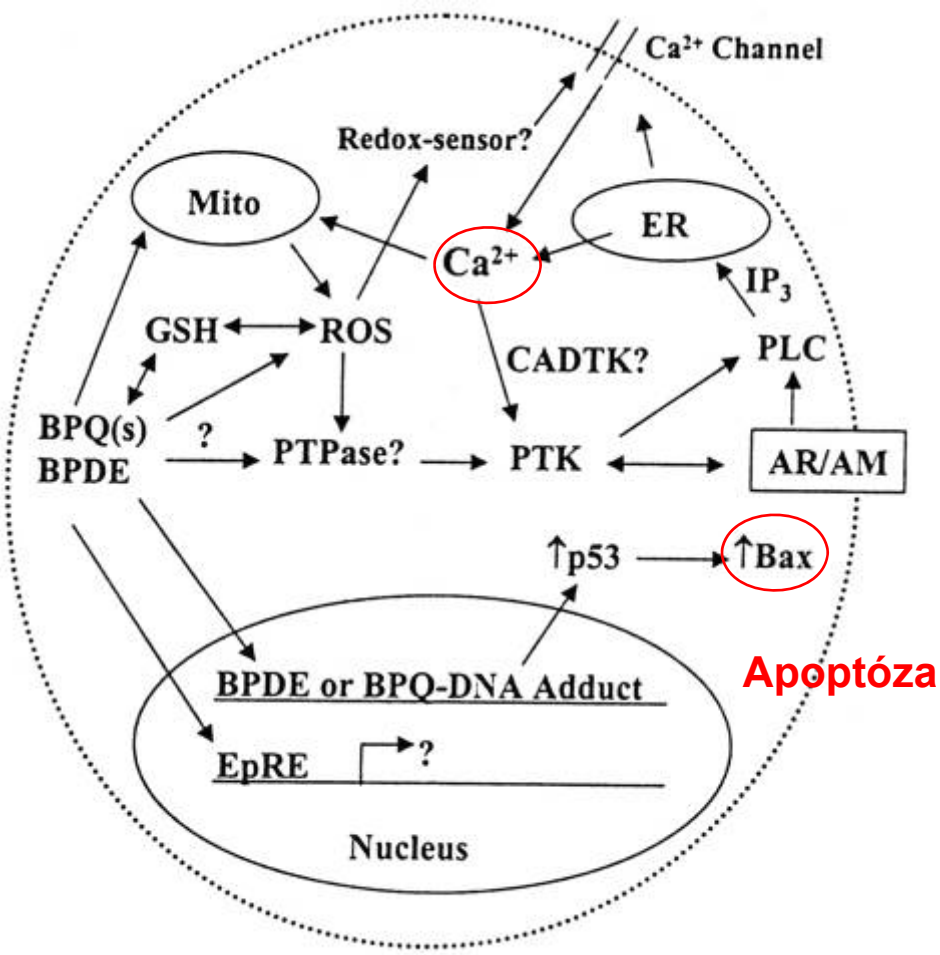
IMUNOTOXICITA

- 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, koplanárními PCB aj. AhR agonisty)
- Poruchy indukce protilátkové odpovědi a další mechanismy

MECHANISMY IMUNOTOXICITY BENZO[A]PYRENU

(metabolity způspbují apoptózu leukocytů)





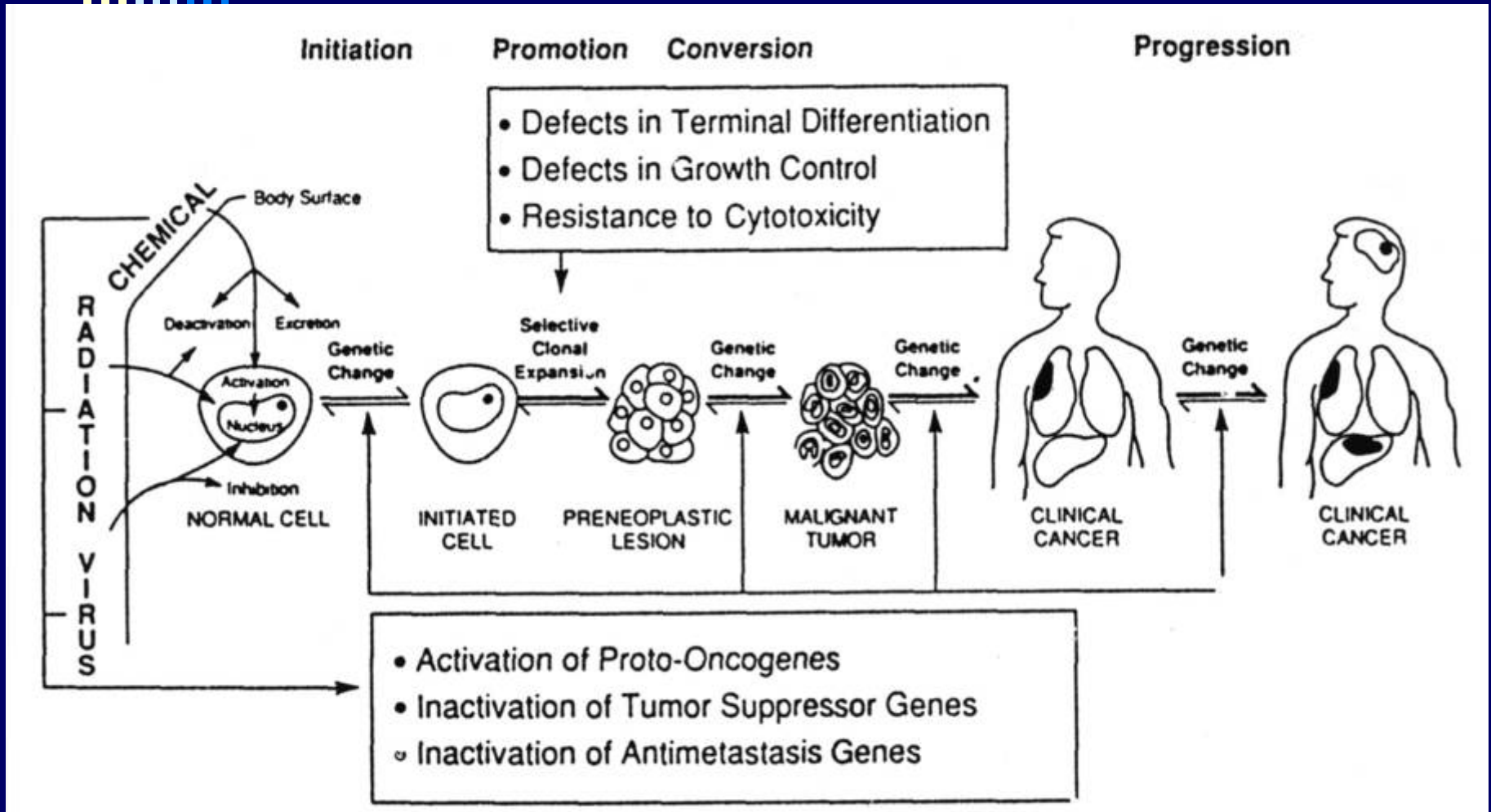
CHEMICKÁ KARCINOGENEZE:

ZÁKLADNÍ KONCEPT

- **Mnohastupňový proces** vývoje rakoviny, komplexní interakce genetických, genotoxických a epigenetických (negenotoxických) faktorů. Základní fáze karcinogeneze:
  1) iniciace;
  2) promoce;
  3) progrese, 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



Laboratory of Cytokinetics

VÚVEL

CHEMICKÁ KARCINOGENEZE

- **GENOTOXICKÉ KARCINOGENY** reagují s DNA a ireversibilně pozměňují genom (bodové mutace, změny v chromosomální struktuře, zlomy, výměny sesterských chomatid, 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 transdukci na postranslační 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

molek. biologické metody, epidemiolog. studie

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.).

stanovení „interní“ dávky (kotinin, PCB, 1-OH-pyren), stanovení „molekulární“ dávky (DNA- a protein. adukty s PAHs, oxidativní poškození)

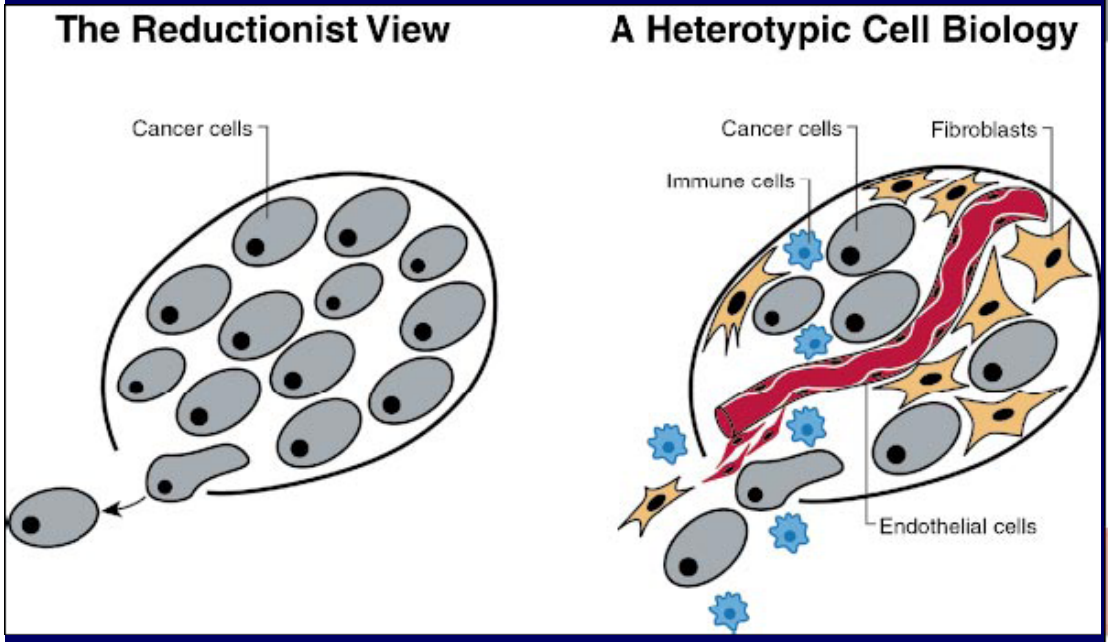
ENVIRONMENTÁLNÍ EXPOZICE

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

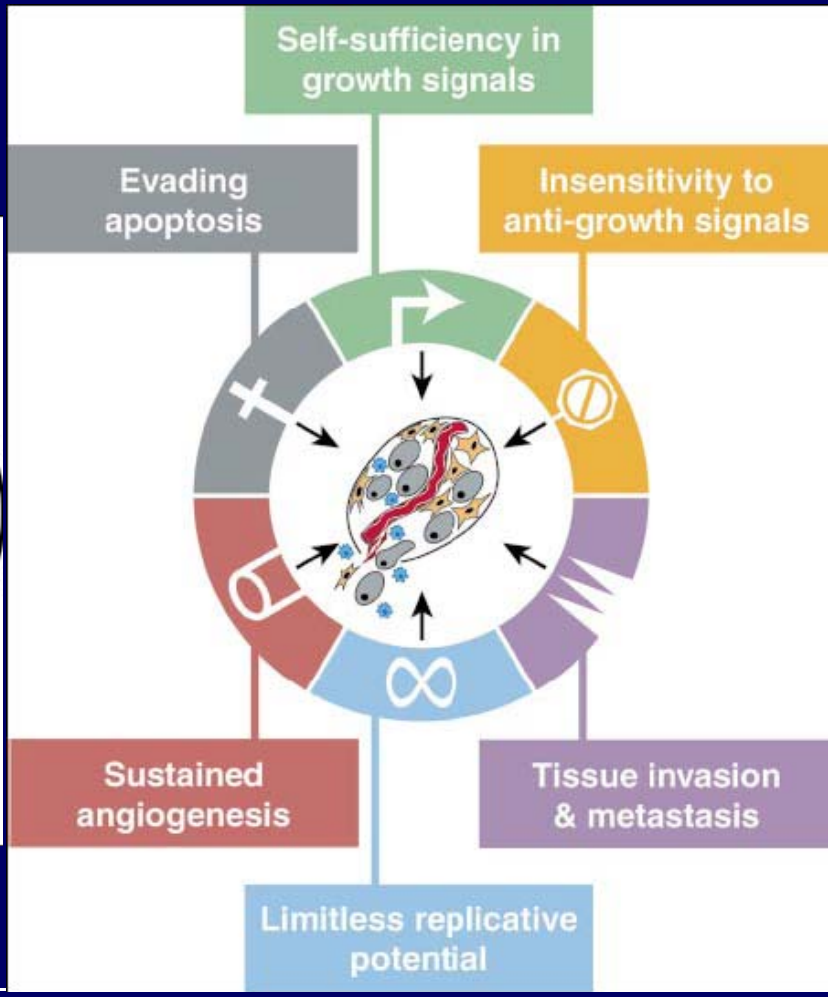
PREKLINICKÉ EFEKTY

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

ZÁKLADNÍ MECHANISMY NÁDOROVÁ PROMOCE



(Hannahan, Weinberg, 2000)



Laboratory of Cytokinetics

VÚVEL

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

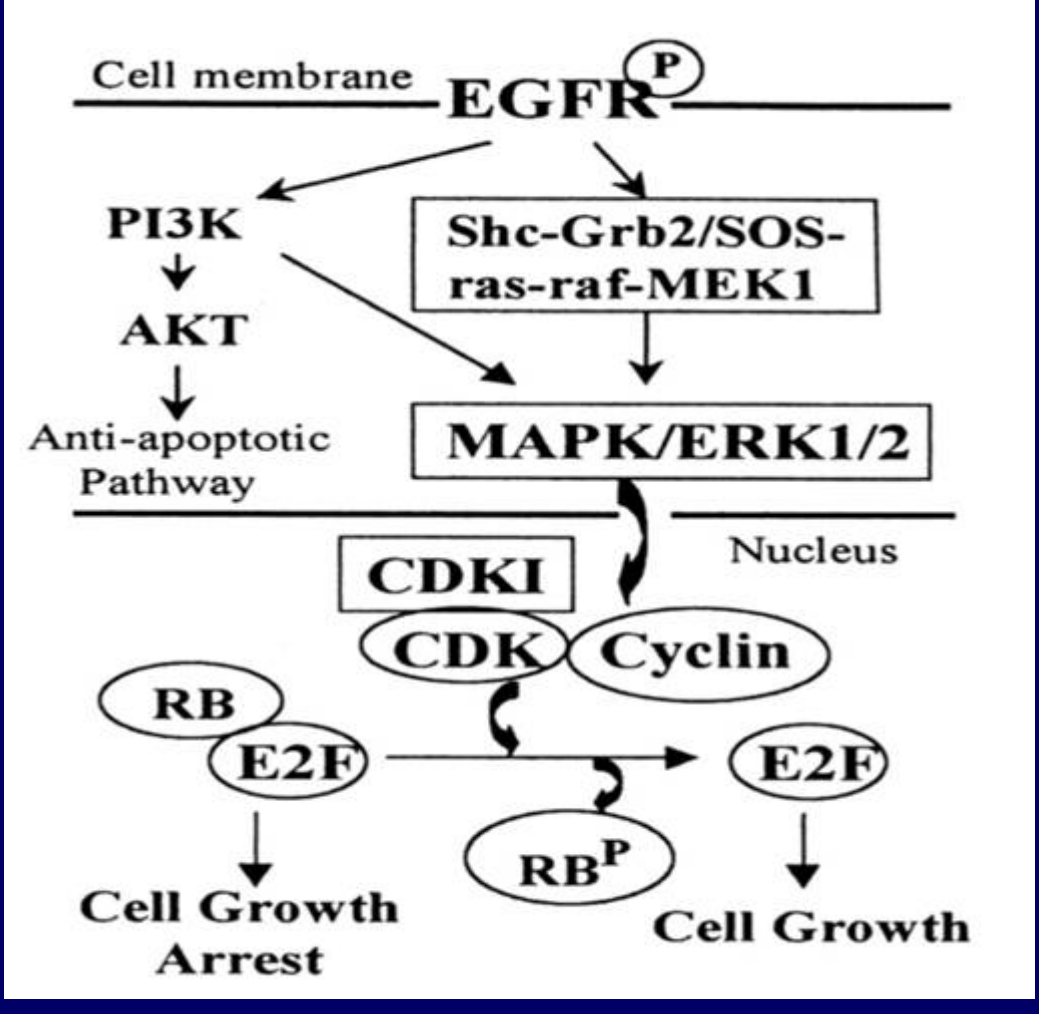
- Inhibice apoptózy (nefunkční tumorové supresory, např. p53) = další mechanismus přežívání buněk

- Inhibice mezibuněčné komunikace (GJIC), disrupce adherence buněk , angiogeneze

MECHANISMY NEGENOTOXICKÝCH PROCESŮ

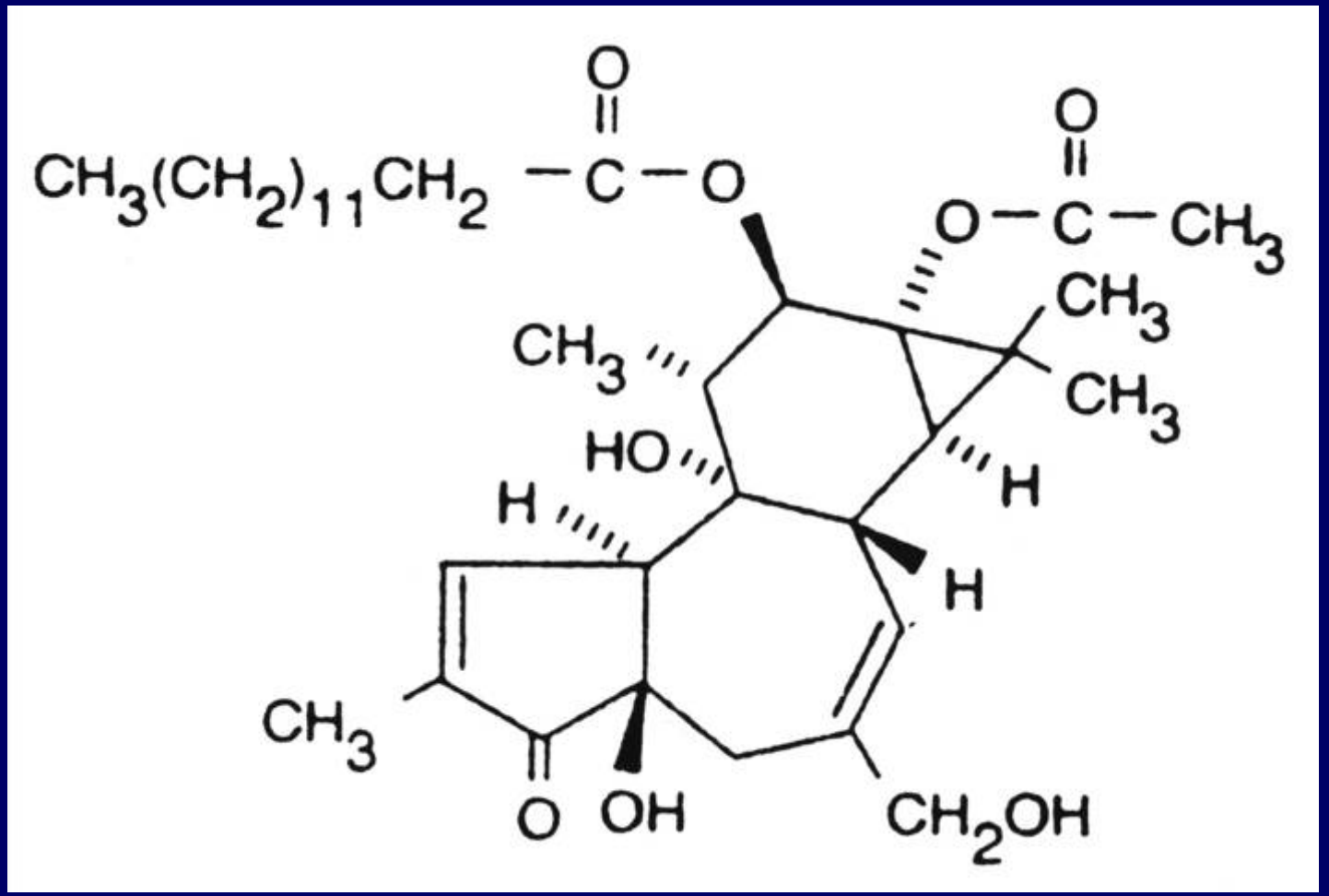
- „klasické“ epigenetické mechanismy (methylace DNA nebo acetylace/deacetylace histonů) – de/diferenciace
- genová instabilita
- strukturní a funkční změny cytoplasmatické membrány, efekty na intercelulární komunikaci (např. inhibice GJIC, disrupce adherence) - vyvázání se z homeostatické kontroly okolních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

PŘÍKLAD AKTIVACE BUN. PROLIFERACE
(aktivací signální transdukce)



MECHANISMY NEGENOTOXICKÝCH PROCESŮ

Forbol-myristátacetát = PMA, TPA (modelový tumor. promoter)

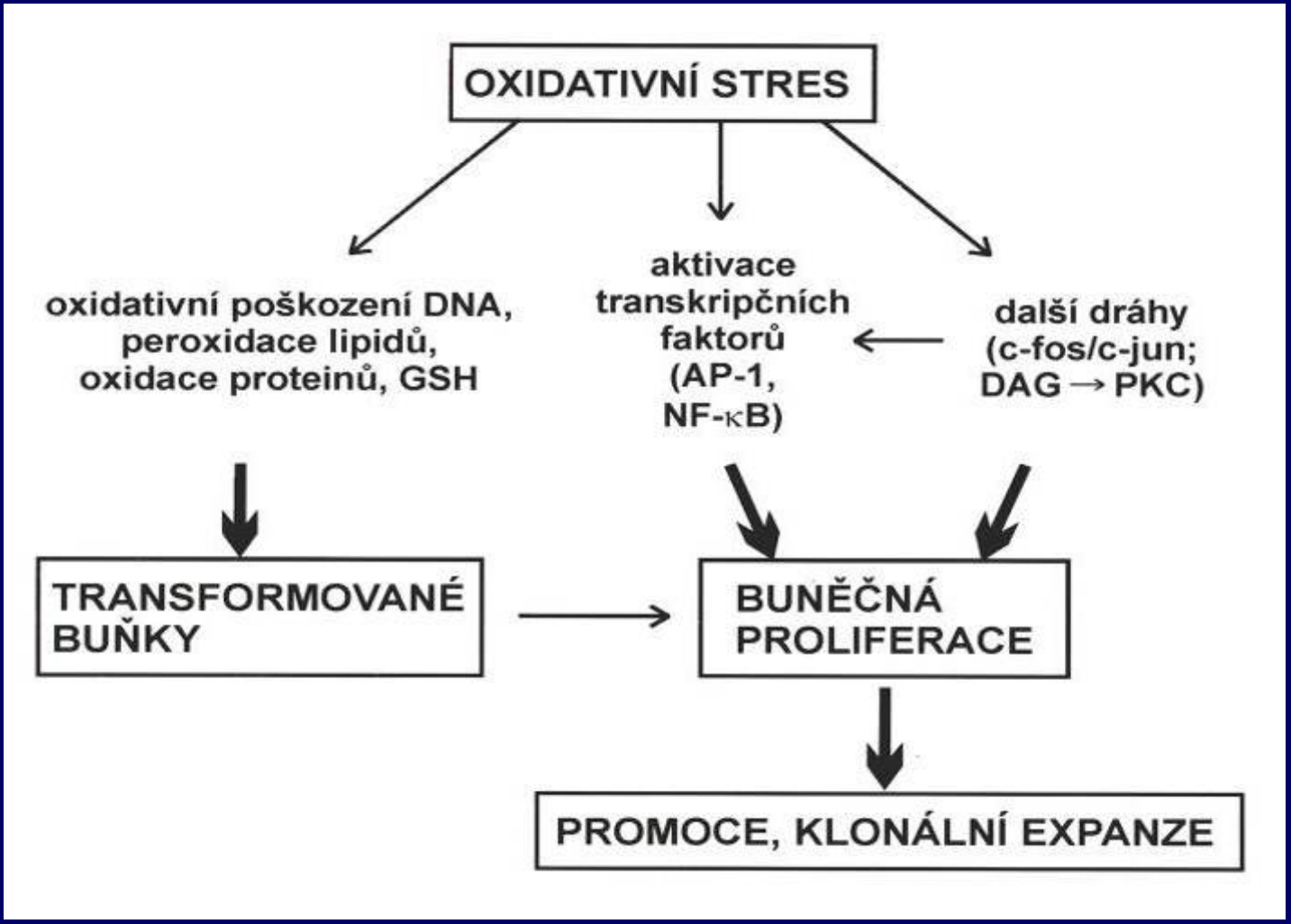


aktivace PKC-ERK:
- hyperfosforylace Cx, inhibice GJIC
- mitogenní efekty

Laboratory of Cytokinetics

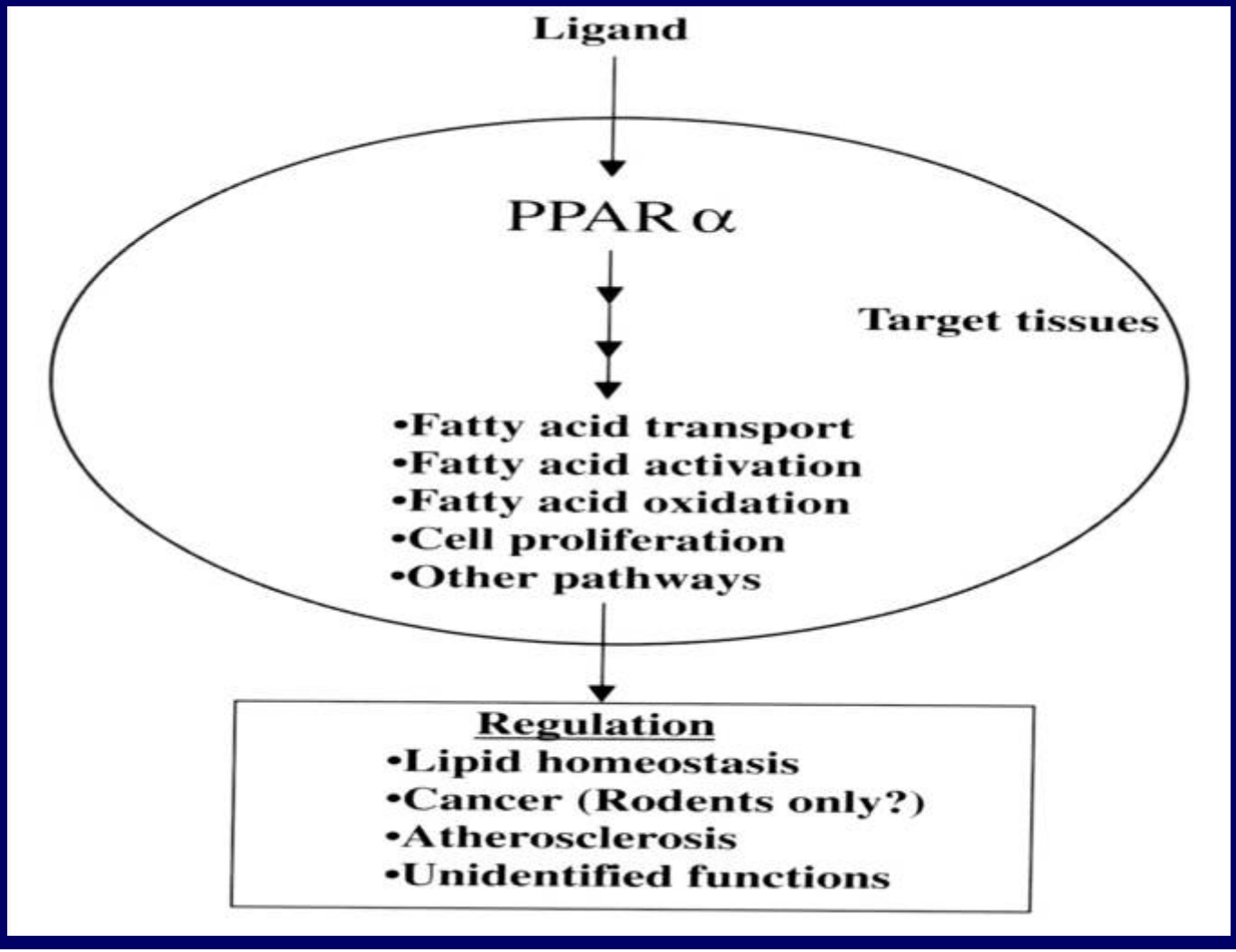
VÚVEL

DŮSLEDKY OXIDATIVNÍHO STRESU

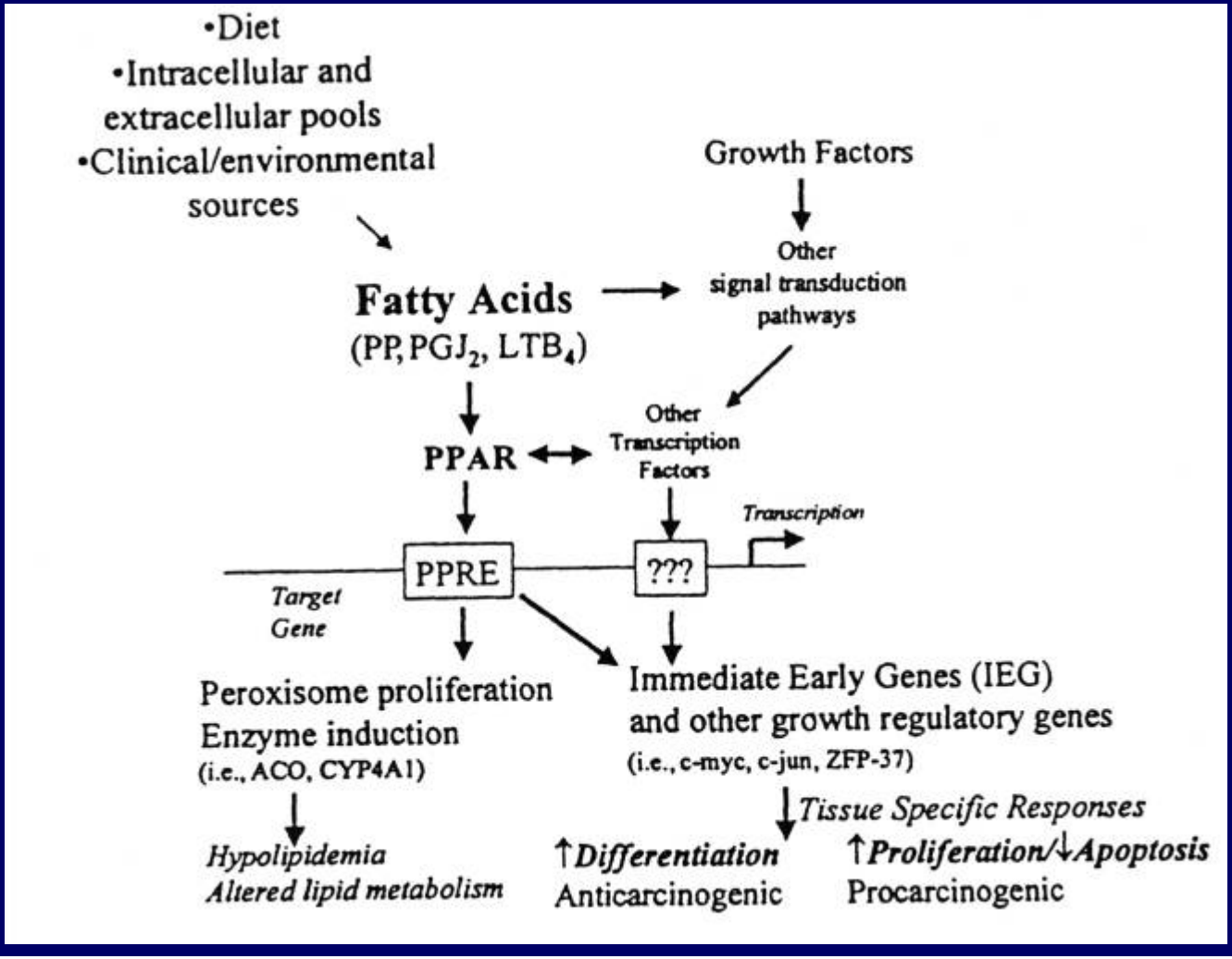


DŮSLEDKY AKTIVACE PPARα

Nerovnoměrná indukce CYP4A (vedl. produkt: H_2O_2) a dalších enzymů (např. CAT) dependentních na PPARalfa



DŮSLEDKY AKTIVACE PPARα



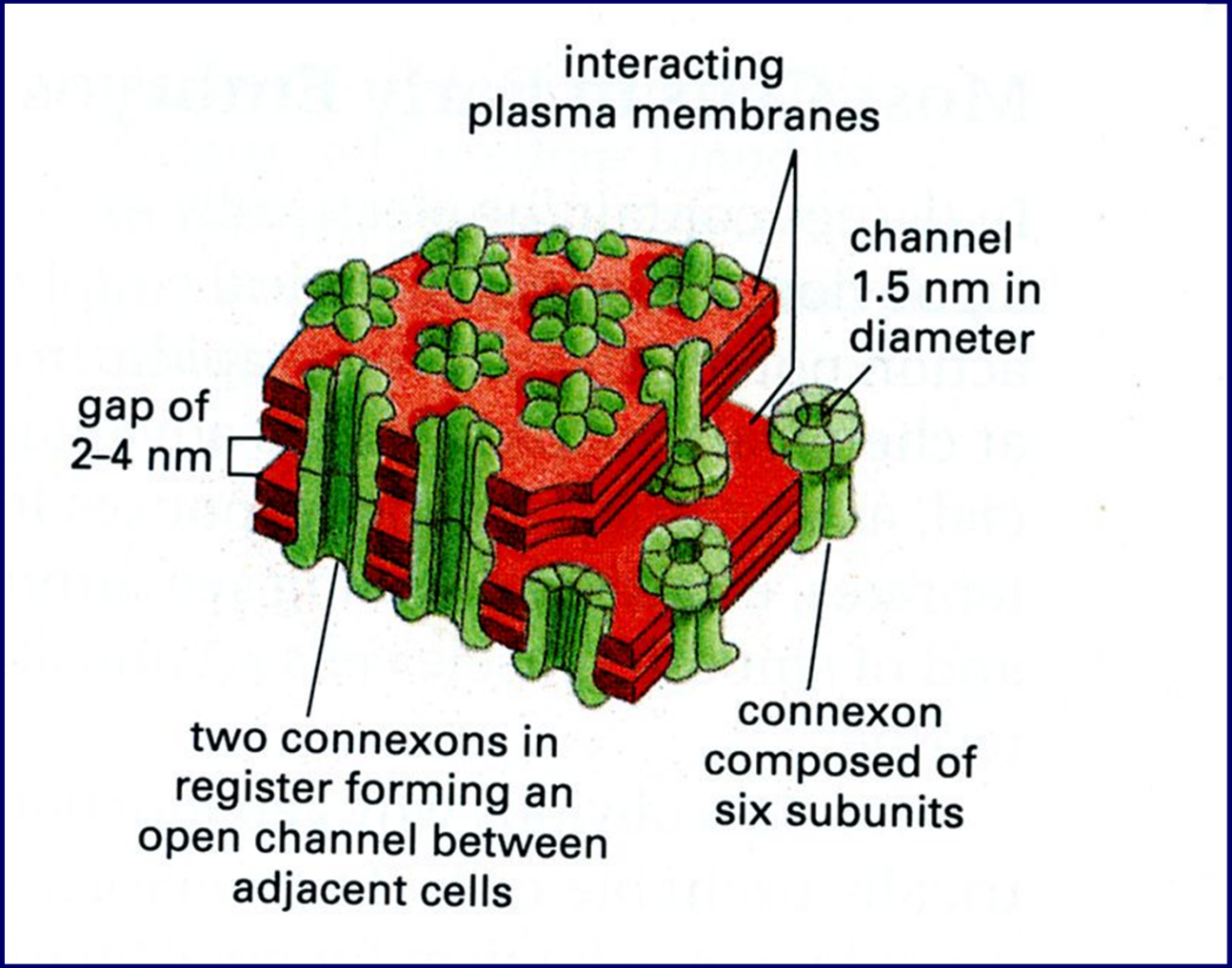
DISRUPCE MEZIBUNĚČNÝCH SPOJENÍ – VEDE K NÁDOROVÉ PROMOCI, INVAZIVITĚ A METASTÁZÍM

Laboratory of Cytokinetics

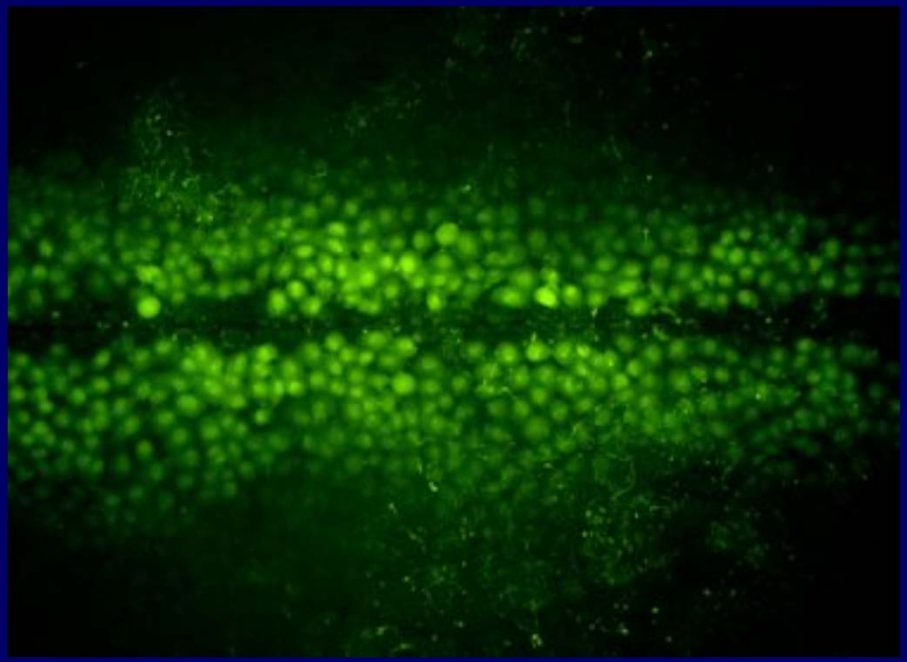
VÚVEL

INTERCELULÁRNÍ SPOJENÍ GJIC

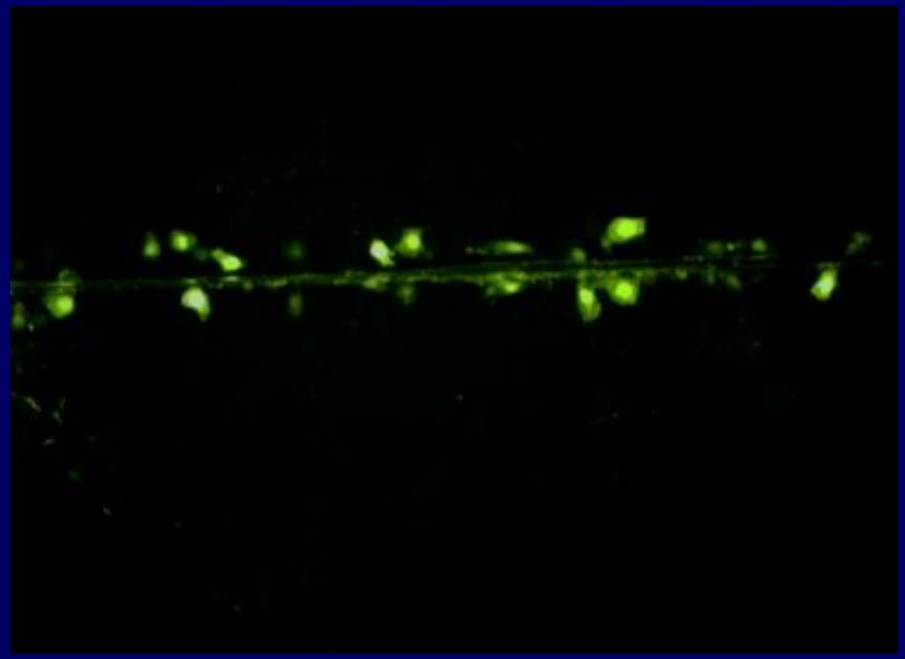
Základní stavební jednotkou jsou proteiny konexiny (connexin 32, 43 atd.), které tvoří hexamery (konexony); konexony sousedních buněk mohou tvořit společný kanál, kterým procházejí signální molekuly (cAMP, Ca^{2+} atd.)



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



kontrola

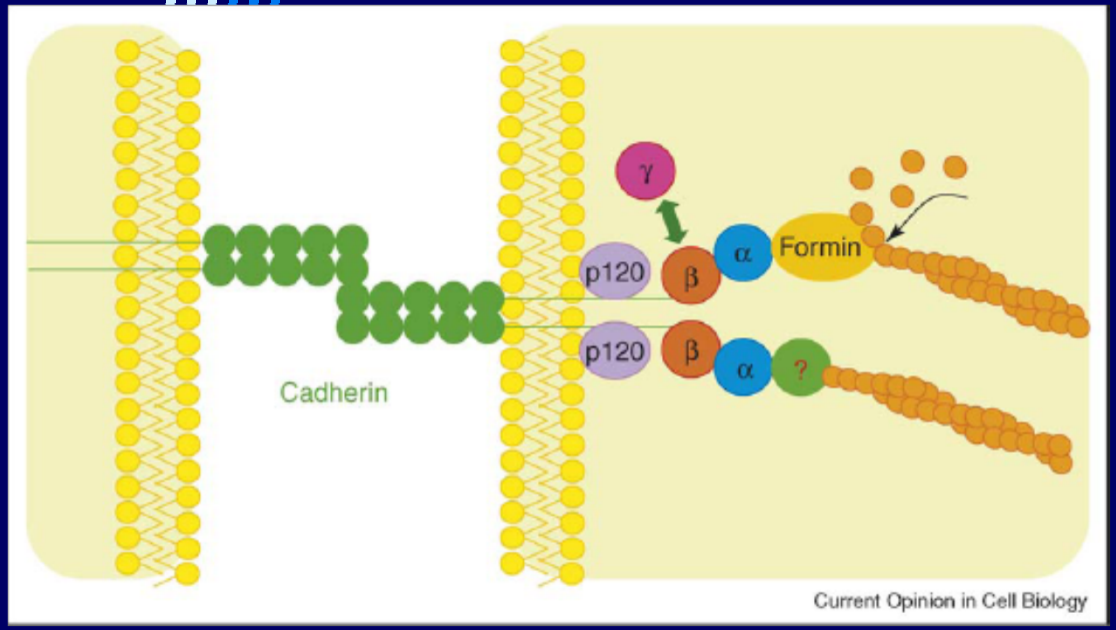


expozice TPA (produkce DAG, aktivace PKC a ERK1/2, hyperfosforylace konexinu)

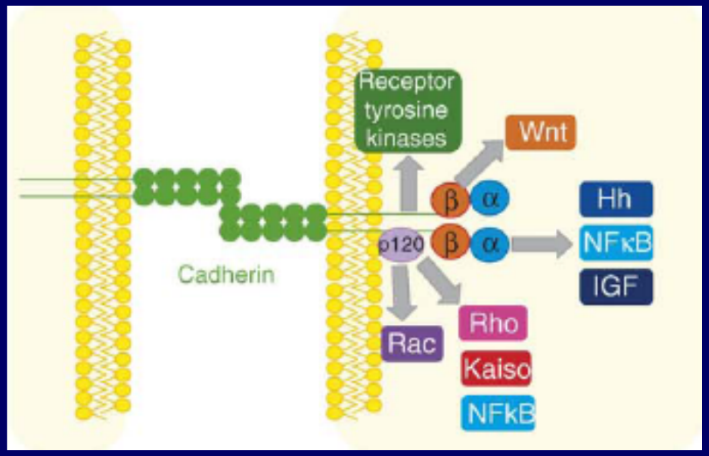
Laboratory of Cytokinetics

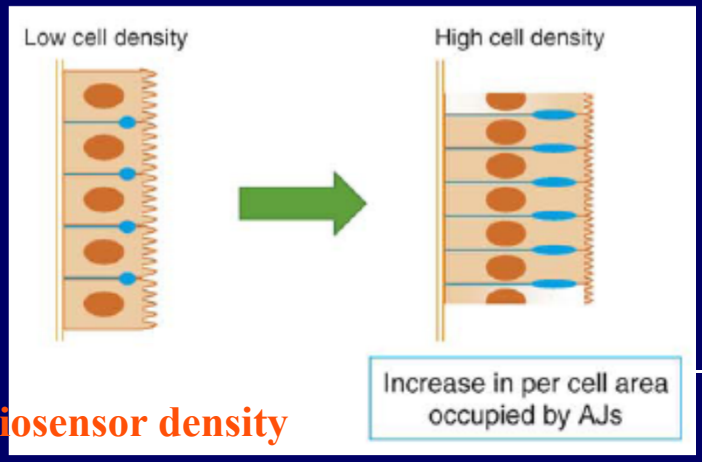
VÚVEL

DISRUPCE ADHERENTNÍCH SPOJENÍ (ADHERENS JUNCTIONS)

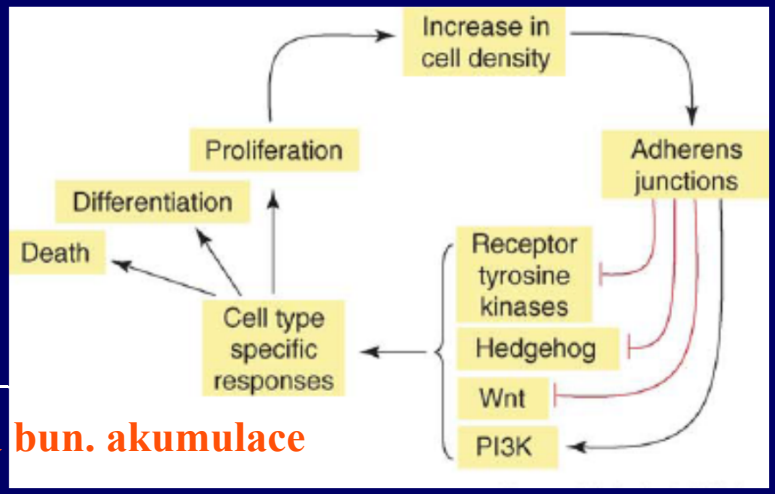


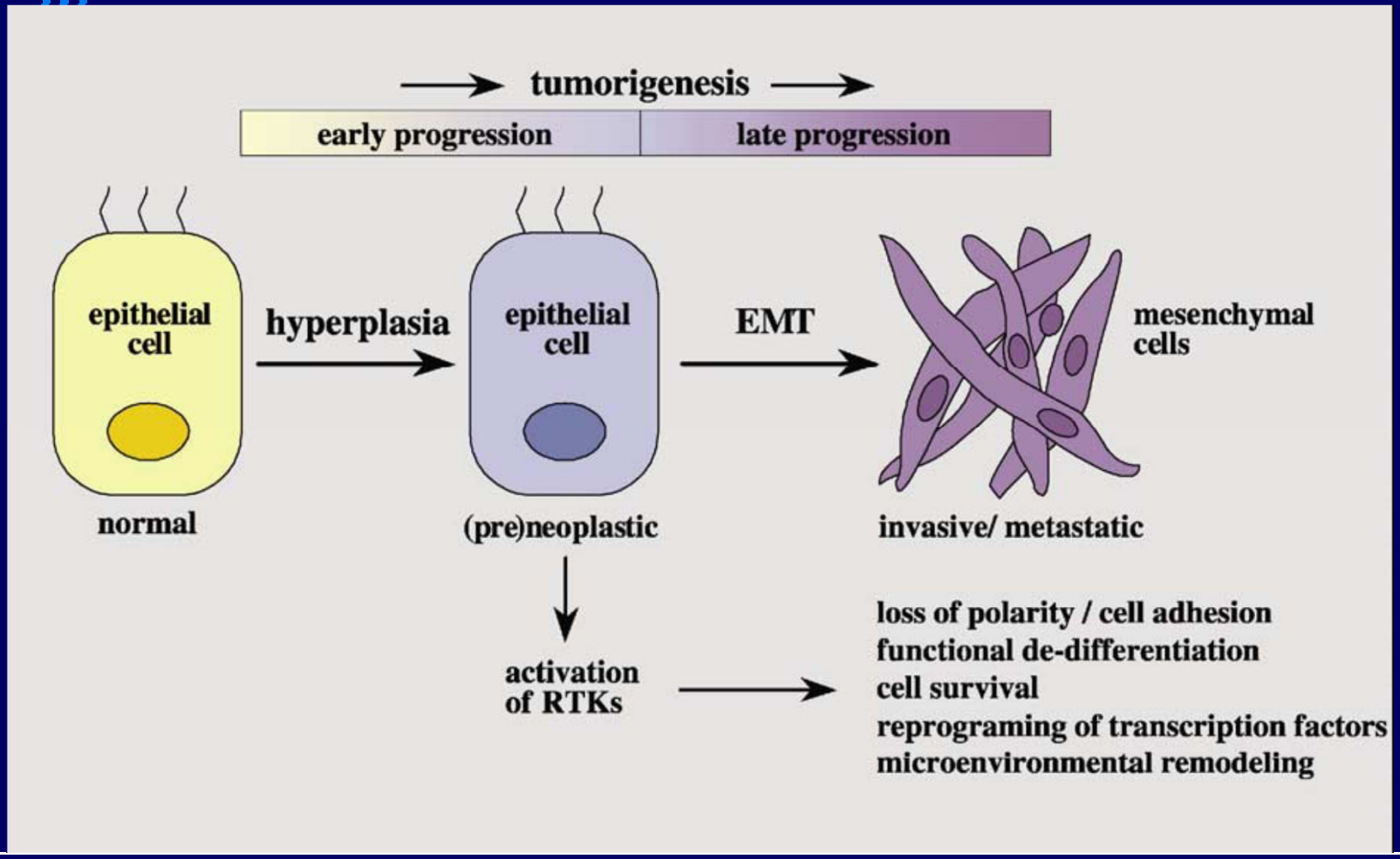
signálování kateninu/cadherinu





biosensor density



kontrola bun. akumulace

DISRUPCE ADHERENTNÍCH SPOJENÍ (ADHERENS JUNCTIONS)