



Hlavní mechanismy toxicity cizorodých látek

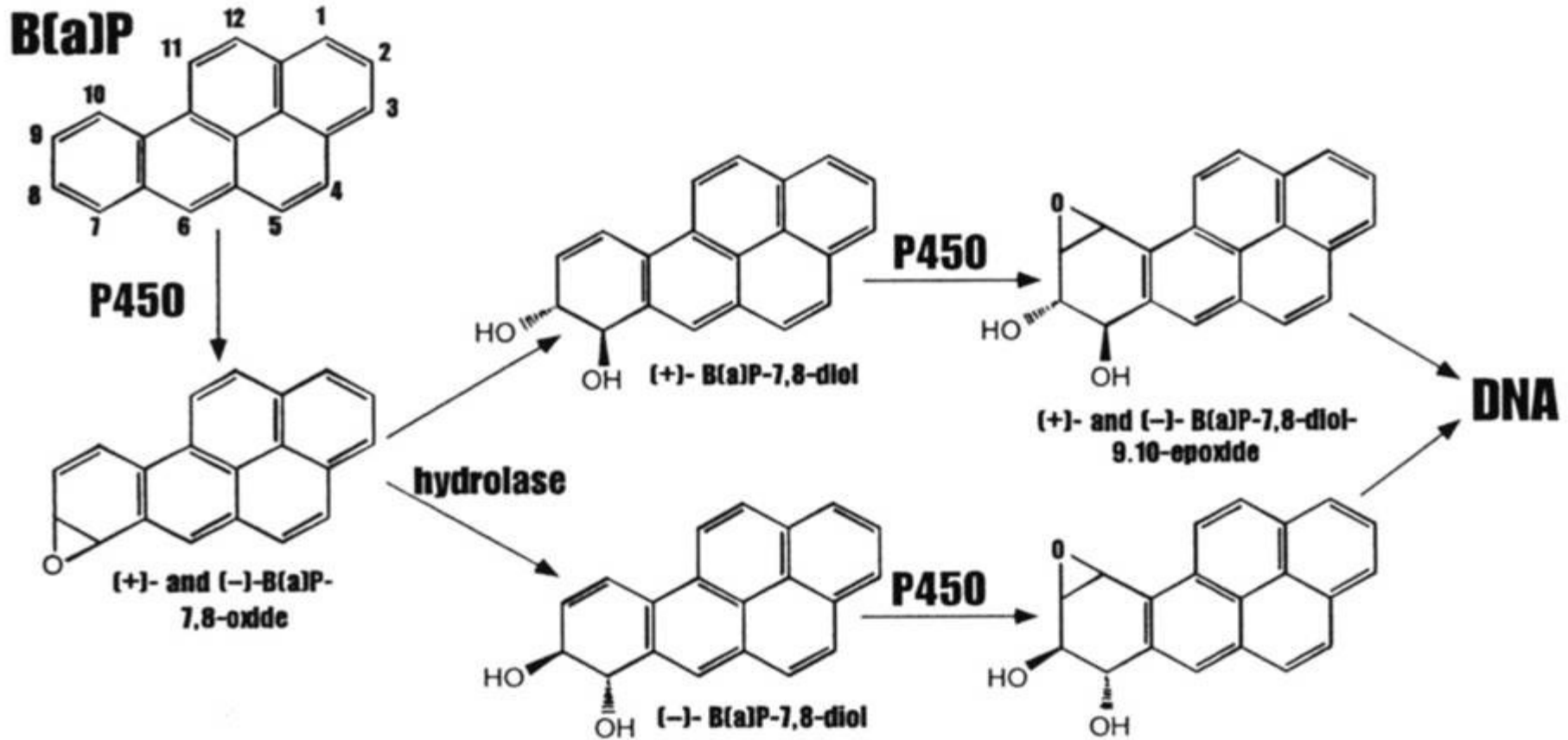
HLAVNÍ MECHANISMY TOXICITY XENOBIOTIK

- „Přímé“ mutageny / genotoxiny; metabolická aktivace promutagenů, adukty s 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. Efekty v plasmatické membráně. Chemicky indukovaná karcinogeneze.
- Další receptor-dependentní mechanismy endokrinní disrupce (např. estrogenita, antiestrogenita)
- Inhibice mitochondriálních funkcí (respirace, syntéza ATP, ale také apoptóza - porušení mitochondriální membrány)
- Neurotoxikita, imunotoxikita, poruchy metabolismu endogenních látek atd.

GENOTOXICITA

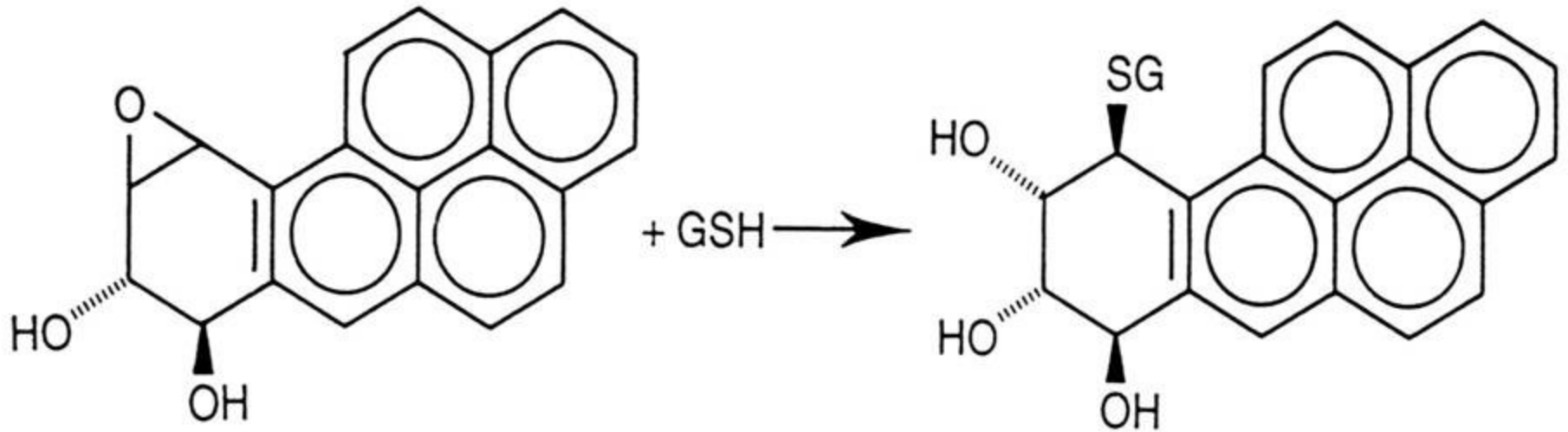
- Genotoxicita = potenciálně škodlivé účinky chemických látek nebo záření na genetický materiál; důsledkem nemusí být smrt buňky, ale trvalé genetické změny (mutace, chromosomální aberace aj.).
- Příklady hlavních genotoxinů: PAHs (benzo[a]apyren), alkyl-PAHs, aromatické a heterocyklické aminy, nitro- a nitrososloučeniny, halogen. deriváty uhlovodíků (CCl_4), aldehydy a epoxidy, azobarviva a akridinová barviva, silná oxidační činidla, některé těžké a transitní kovy (Cd, Cr) aj.
- Typy genotox. poškození: **bodové mutace** (ox. deaminací cytosinu vzniká uracyl, analoga bazí, alkylace bazí); **chromosomální aberace** (delece, inserce, duplikace, inverze úseku chromosomu, translokace úseku chromosomu na nehomologní chromosom); klastogeny = způsobují zlomy chromosomů (UV záření, interkalační látky); **euploidie** = změna počtu chromosomových sad, např. tetraploidie, **aneuploidie** = změna počtu jednotlivých chromosomů.
- Teratogeneze - vznik poškození plodu (vrozené vývojové vady apod.); způsobují to teratogeny (některá org. rozpouštědla, viry aj.; mutagenní látky mohou působit jako teratogeny).

1) GENOTOXICITA - METABOLICKÁ AKTIVACE POLYCYKLIČKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ



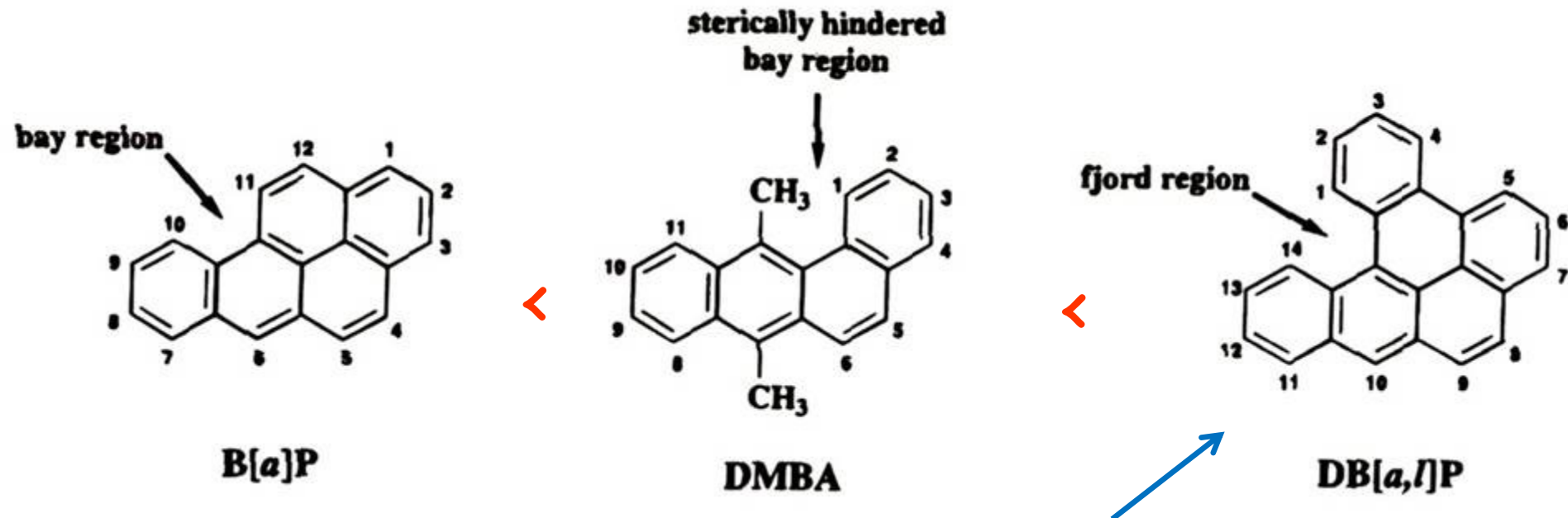
DETOXIKACE POLYCYKLIČKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ:

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



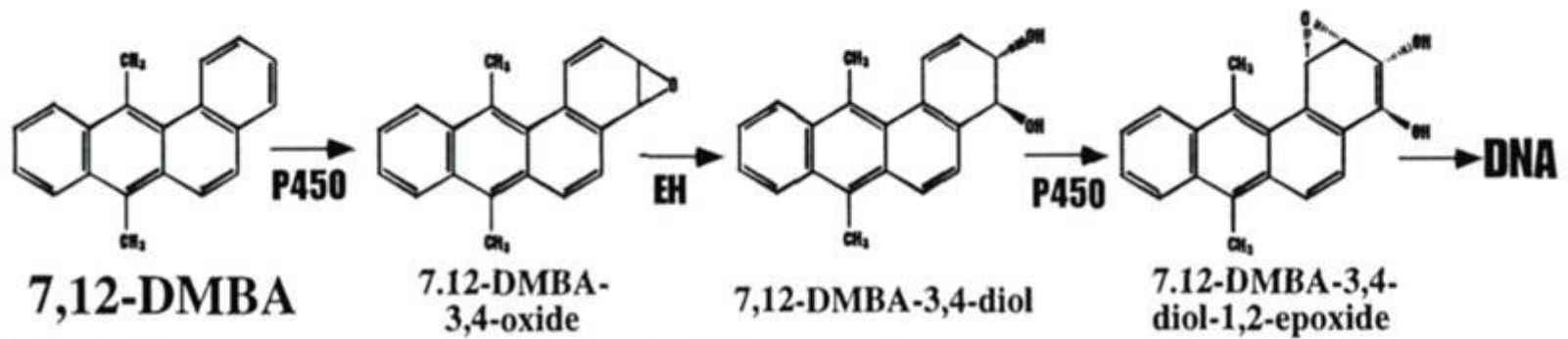
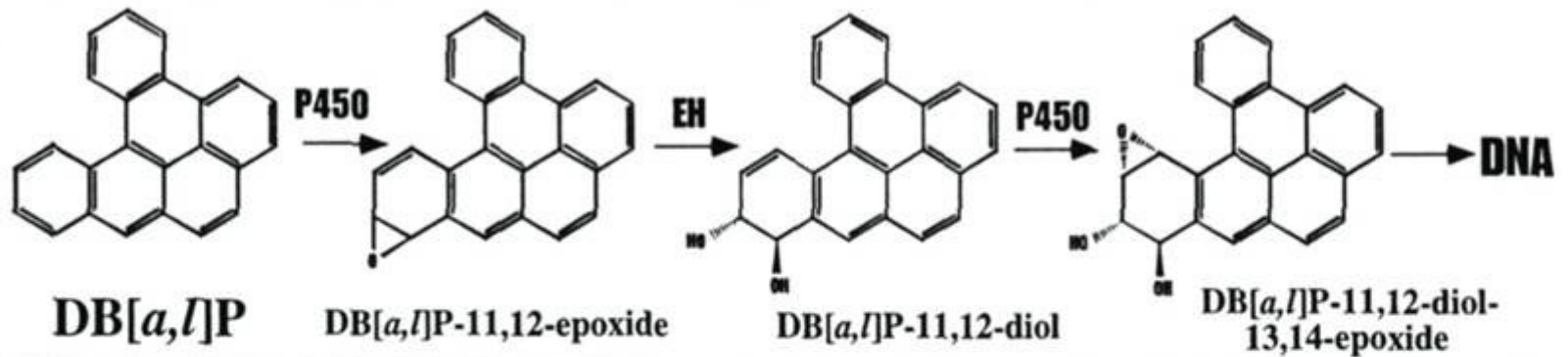
Glutathione-S-transferase

GENOTOXICITA - METABOLICKÁ AKTIVACE POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ



nejsilnější genotoxin ze skupiny PAHs je dibenzo[a,l]pyren (DB[a,l]P)
- stérická dostupnost metabolitů (dihydrodiolepidů) pro GST event.
další enzymy 2. fáze biotransformace

GENOTOXICITA - METABOLICKÁ AKTIVACE POLYCYKLIČKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ



Akrylamid: detoxikace vs. tvorba aduktů

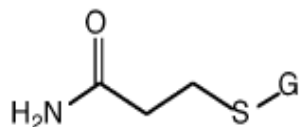
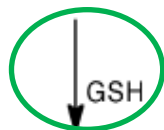
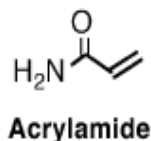
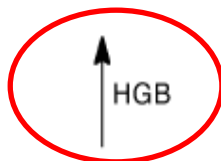
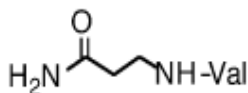
detoxikace

metabolická aktivace

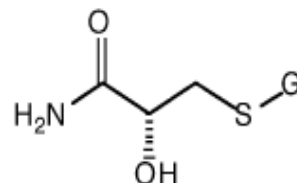
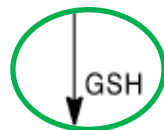
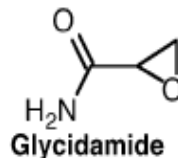
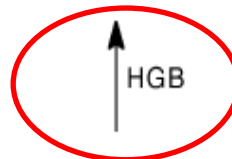
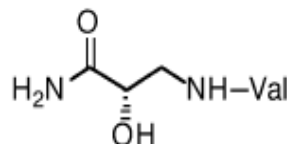
-tvorba aduktů s proteiny

-tvorba aduktů s DNA

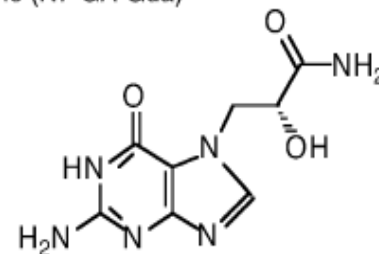
N-(2-carbamoyl-ethyl)-valine (AAVal)



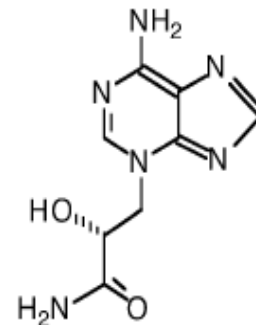
N-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-valine (GAVal)



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

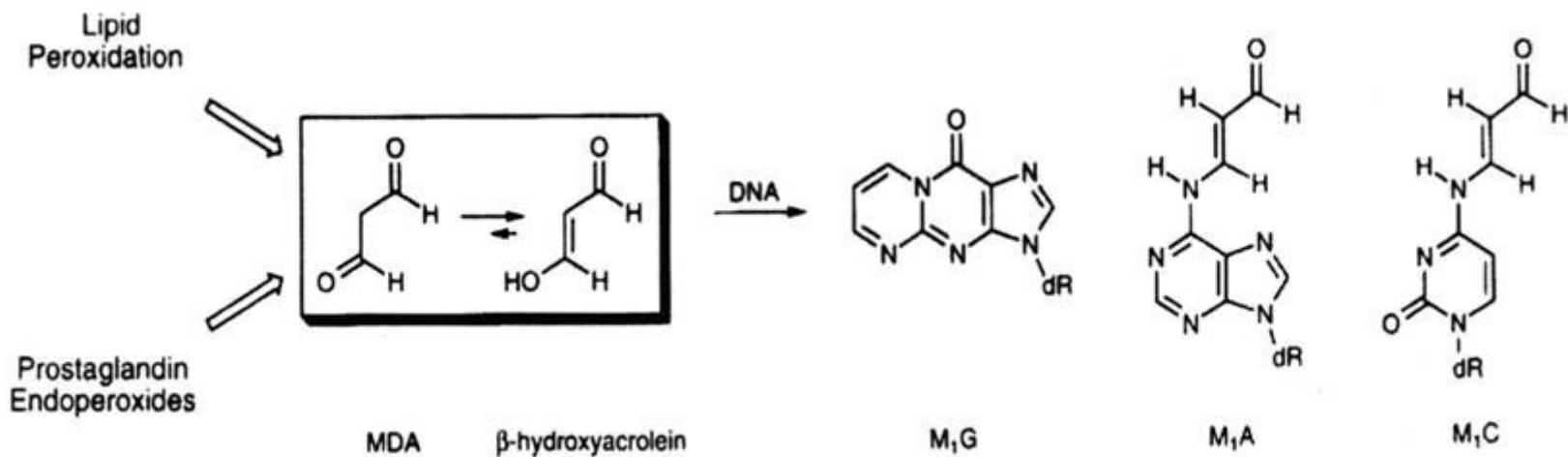


OR



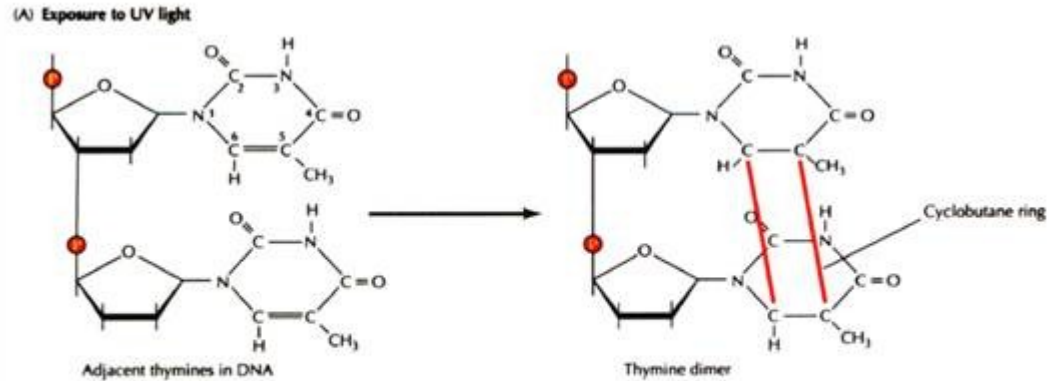
N3-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-adenine (N3-GA-Ade)

MALONDIALDEHYD - TYPICKÝ PRODUKT PEROXIDACE LIPIDŮ TVOŘÍ ADUKTY S DNA

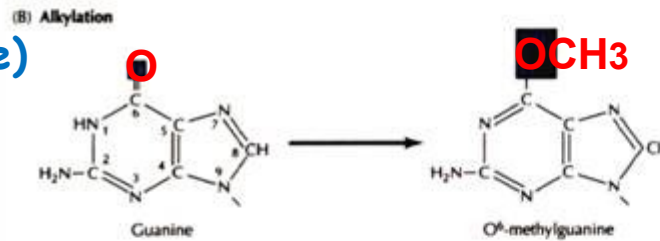


2) HLAVNÍ TYPY POŠKOZENÍ DNA

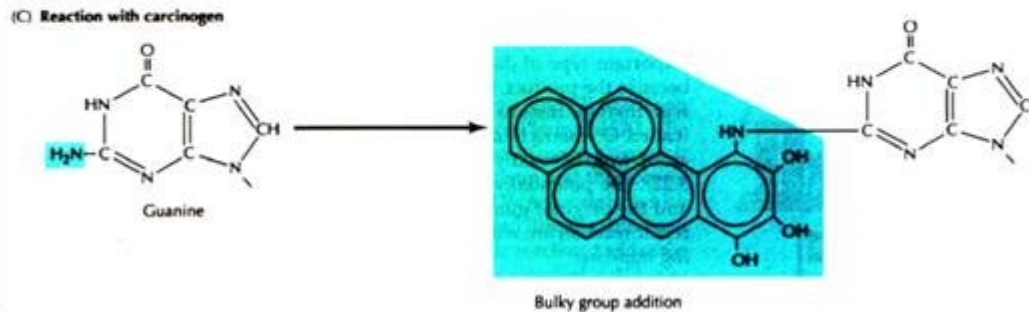
UV záření:
dimerizace



Alkylace (methylace)
= O \longrightarrow -OCH₃



Vznik objemných
aduktů
("bulky adducts")

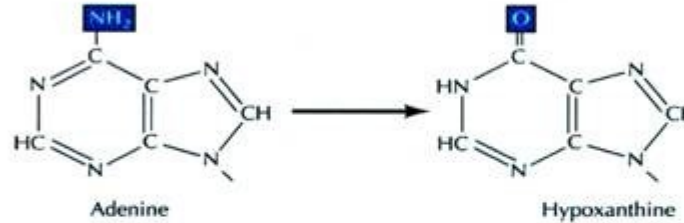
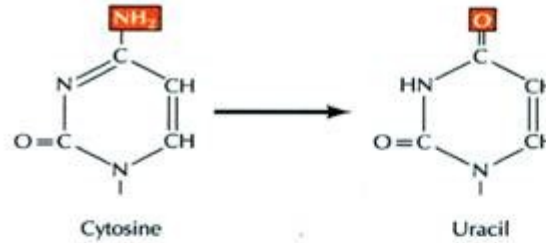


Oxidativní poškození
DNA - viz dále

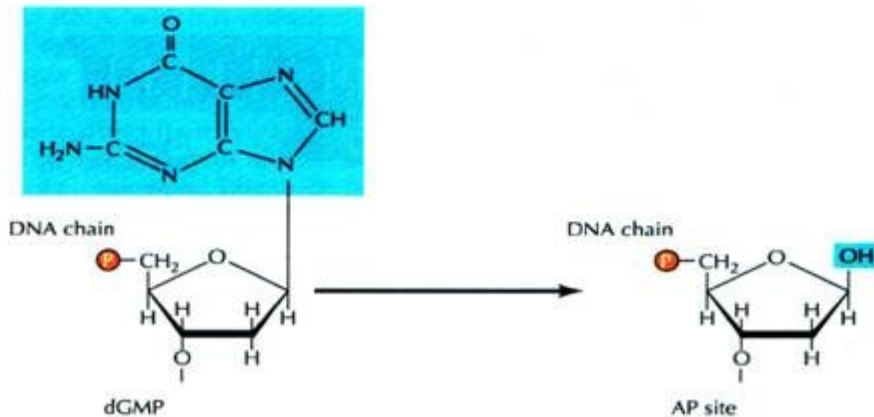
HLAVNÍ TYPY OXID. POŠKOZENÍ DNA ("apurinic sites")

Oxidativní deaminace

(A) Deamination

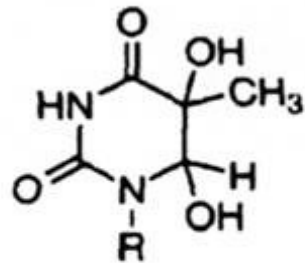


(B) Depurination

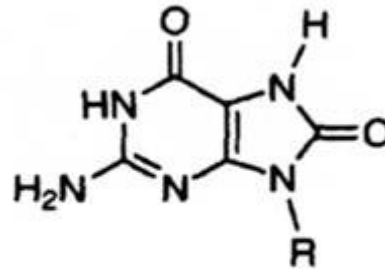


Depurinace (nestabilní
modifikované nukleotidy)

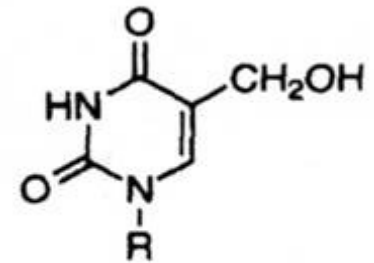
PRODUKTY OXIDATIVNÍHO POŠKOZENÍ DNA



thymine glycol

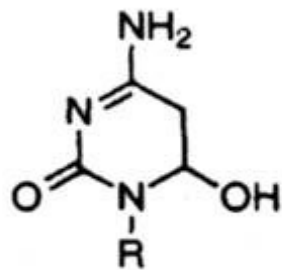


8-oxo-dG

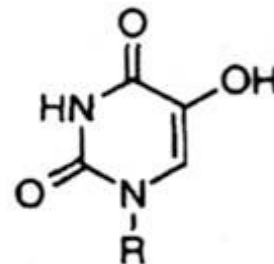


5-hydroxymethyluracil

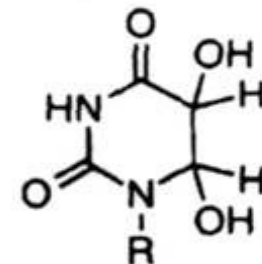
Biomarker
oxidativního
poškození
DNA
(stanovení
HPLC)



6-hydroxy-5,6-dihydrocytosine



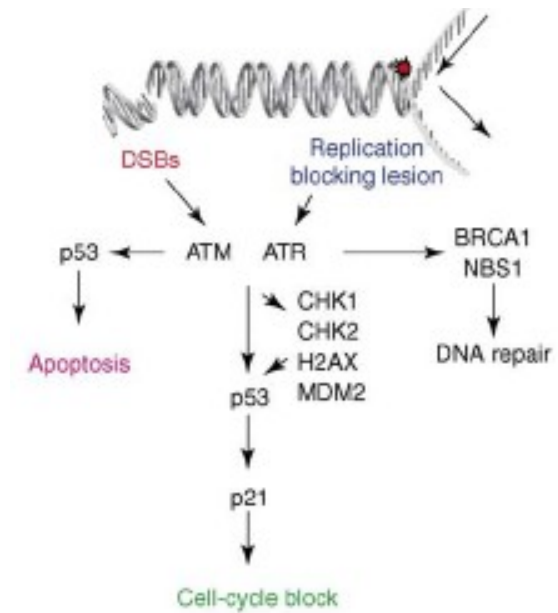
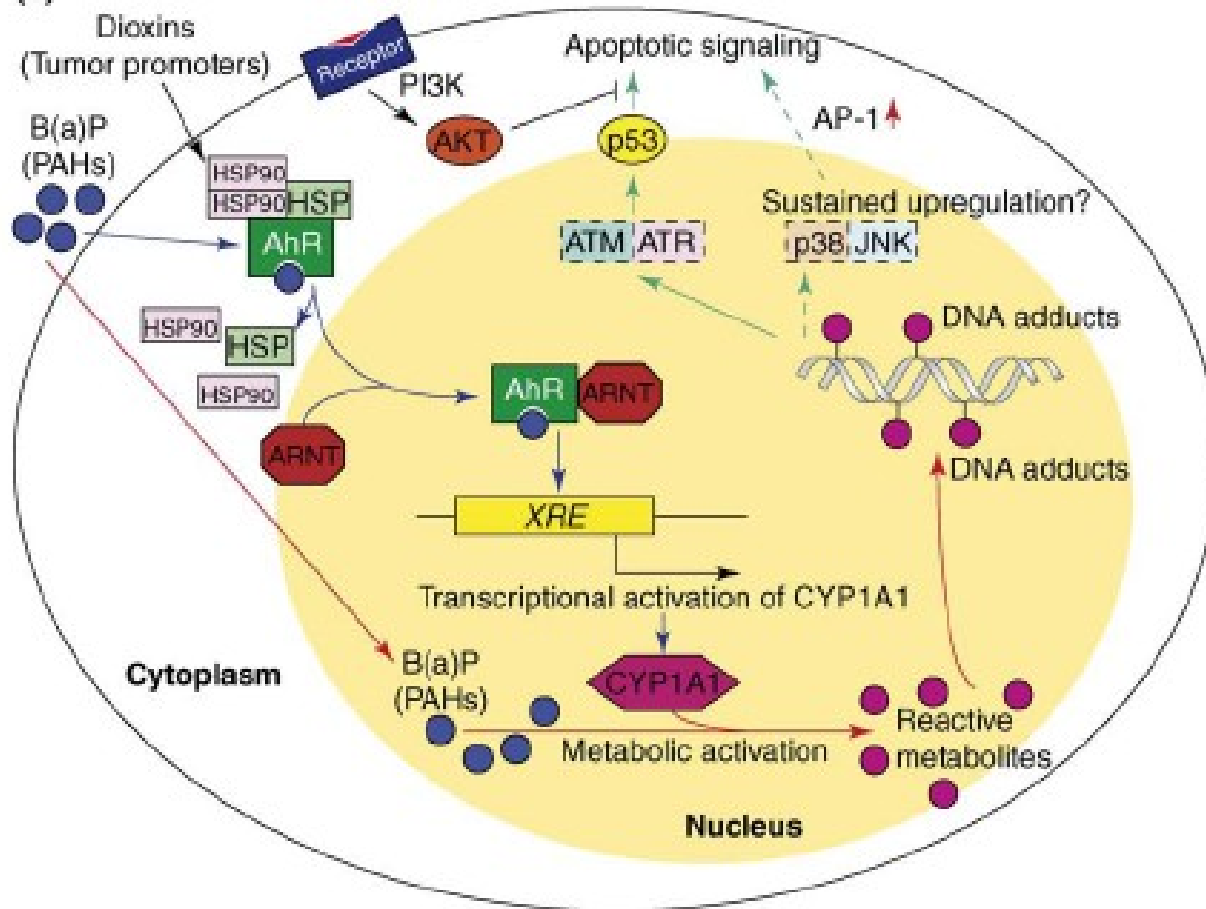
5-hydroxyuracil



uracil glycol

3) POSTGENOTOXICKÉ SIGNÁLY

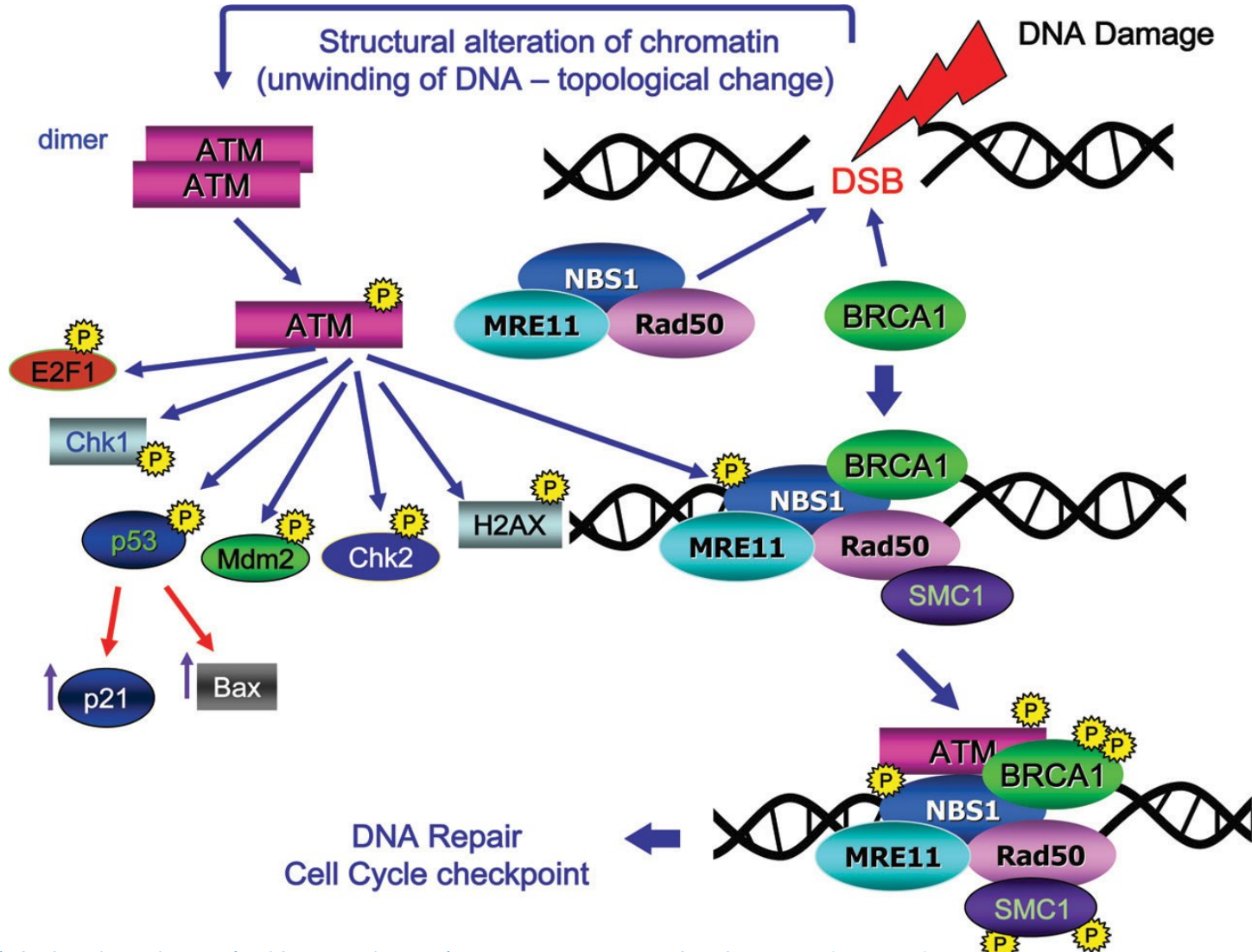
POSTGENOTOXICKÉ SIGNÁLY: sensory genotox. poškození, přenos post-genotoxických signálů a regulátory bun. cyklu, oprav DNA a apoptózy (H2AX, ATM, ATR, ChK1, ChK2, p53)



(podle Roos, Kaina, 2006)

POSTGENOTOXICKÉ SIGNÁLY

(sensory poškození a regulátory buněčného cyklu)



Příklad odpovědi na dvoušroubovicové zlomy (DSB)



OXIDATIVNÍ STRES

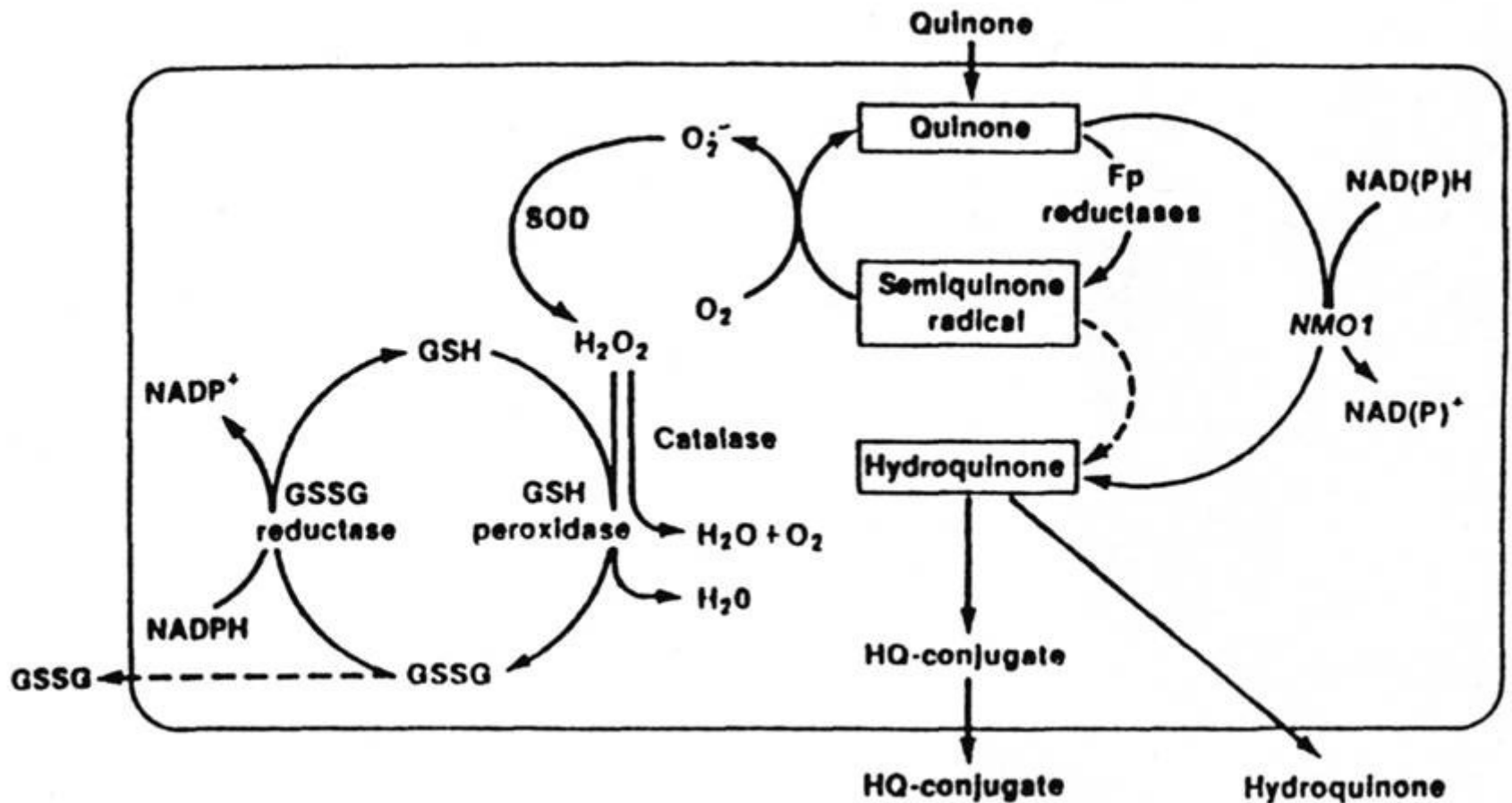
OXIDATIVNÍ STRES

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

Hlavní mechanismy vzniku ROS:

- chorobné stavy (reumatoidní choroby, záněty...)
- vedlejší produkty respirace a dalších metabolických procesů (prostaglandin H syntáza, diaminoxidáza, xanthinoxidáza)
- radiace
- metabolismus ciz.látek - aktivace O_2 v cyklu P450 (např. pomalu metabolizované substráty fenobarbital, lindan CYP2B); redoxní cyklování chinonů aj.; v experimentálních studiích přímá produkce ROS (terc-BuHP), snížení hladiny GSH (dietylmaleát)

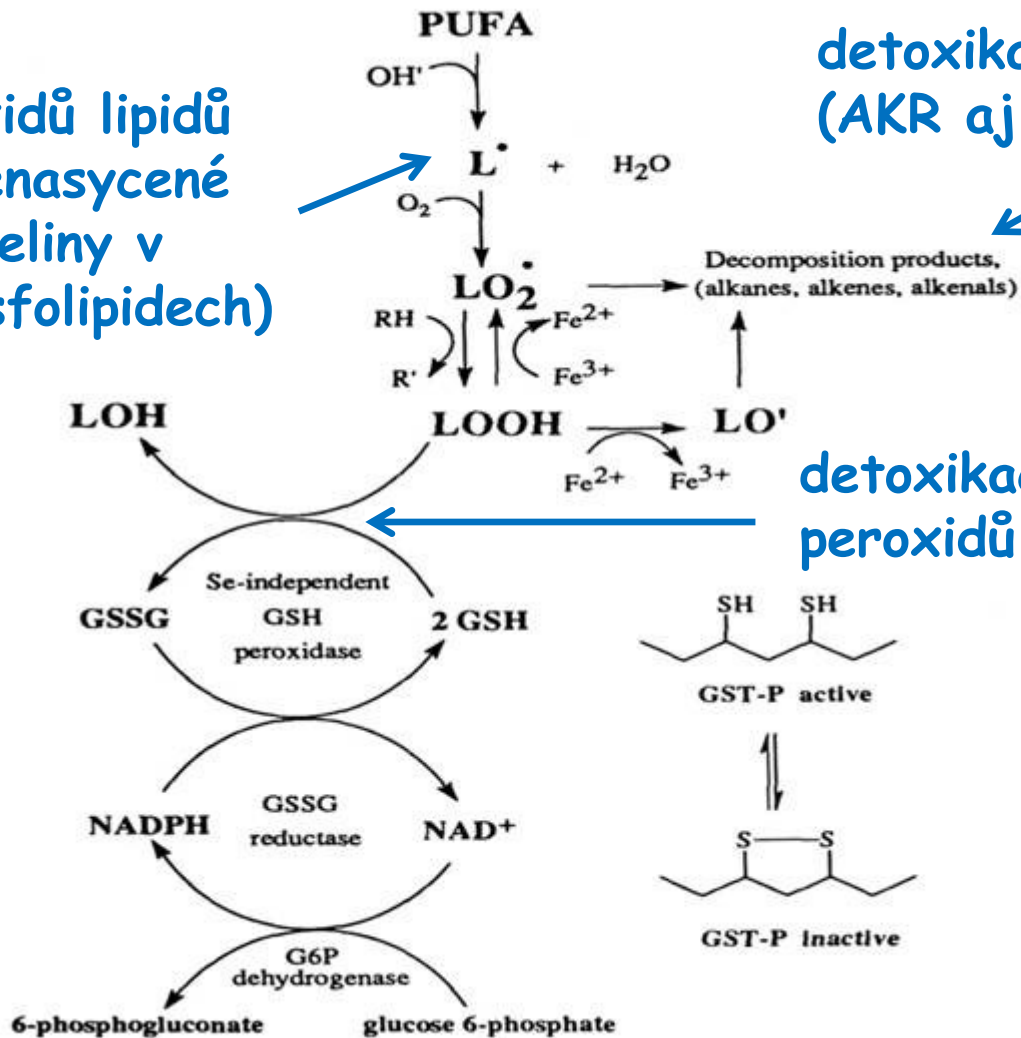
REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU: redoxní cyklování chinonů / antioxidační enzymy



PEROXIDACE LIPIDŮ

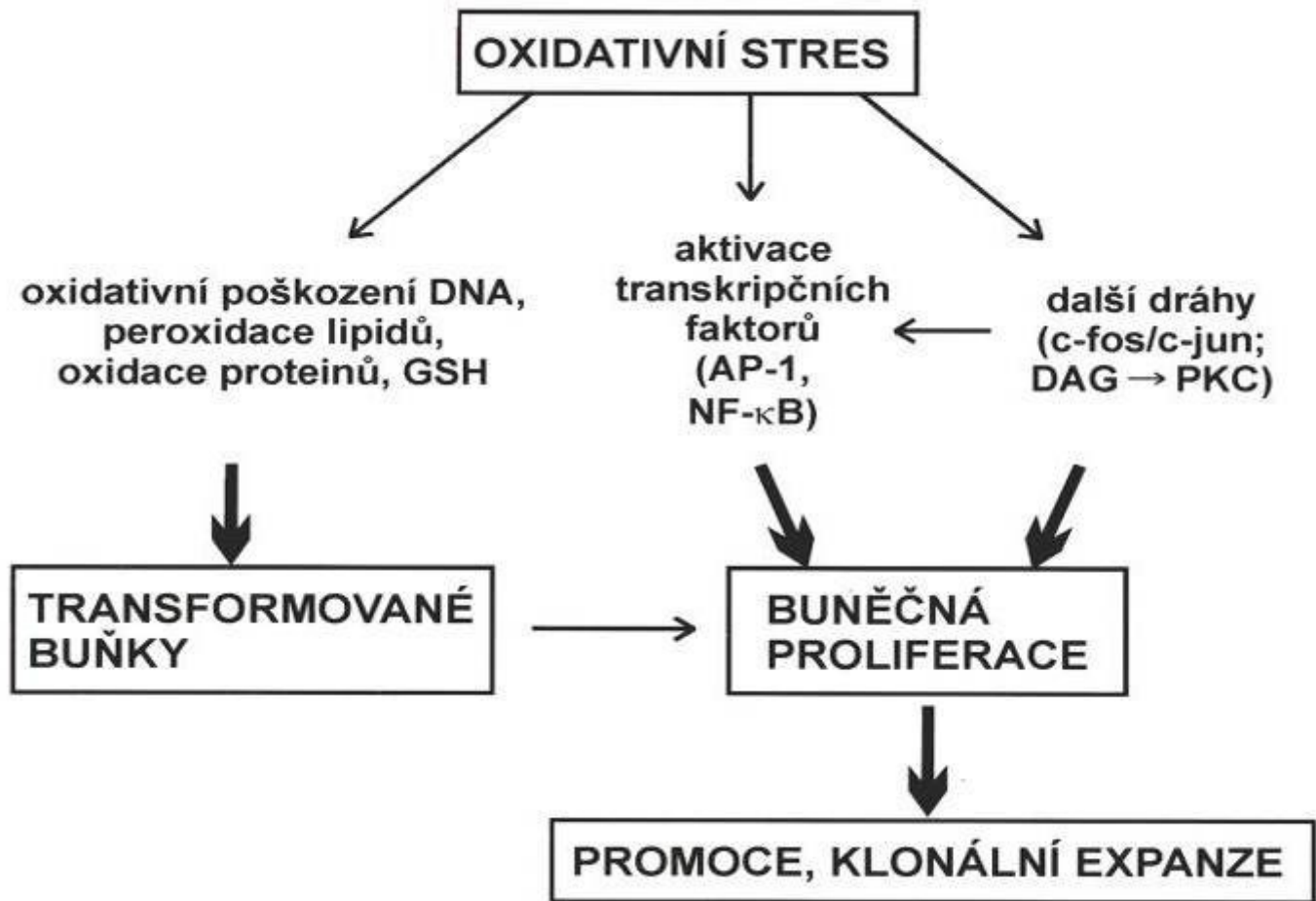
vznik peroxidů lipidů
(PUFA = nenasycené
mastné kyseliny v
membr. fosfolipidech)

detoxikace aldehydů
(AKR aj. reduktázami)



detoxikace org. hydro-
peroxidů (GPx)

DŮSLEDKY OXIDATIVNÍHO STRESU



(různé role ox. stresu v chemické karcinogenezi)



ENDOKRINNÍ DISRUPCE



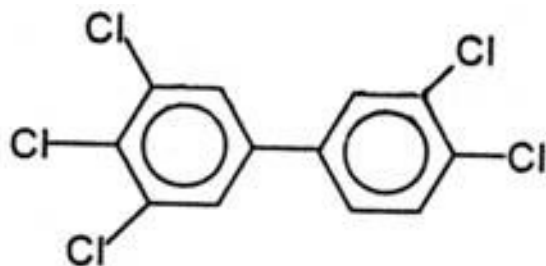
MECHANISMY ENDOKRINNÍ DISRUPCE

- biosyntéza steroidních hormonů (např. inhibice CYP19 - aromatázy snižuje hladinu estrogenů);
- transport steroidních a thyroïdních hormonů (kompetice vazby hormonů na transportní bílkoviny snižuje hladinu hormonů v cílových tkáních);
- aktivace nebo suprese nukleárních receptorů (AR, ER, TR aj. vede k nežádoucím změnám v receptor-závislé genové expresi)
- katabolismus (inaktivace) hormonů probíhá za účasti biotransformačních enzymů (např. hydroxylace steroidů enzymy CYP)

AKTIVACE AhR A NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ

- Aktivace AhR (indukce CYP1A1/1A2/1B1 = ovlivnění katabolismu steroidních hormonů; aberantní aktivace AhR = vývojové defekty; interakce s ER aj. nukleárními receptory).
- Aktivace / suprese ER = xenobiotika jako estrogeny / antiestrogeny
- Aktivace / suprese AR = androgeny / antiandrogeny
- Xenobiotika modulující thyroidní funkce (aktivace nebo suprese TR = např. neurodevelopmentální defekty; kompetice xenobiotik s proteiny transportu T4)
- Aktivace PPAR γ - obesogeny (tributyltin, bisfenol A, alkylftaláty) - několik mechanismů, např. disrupce metabolismu lipidů a ukládání tuku (PPAR γ zvyšuje biosyntézu lipidů); diferenciaci preadipocytů na adipocyty; v mozku deregulace apetitu - "central balance of energy" (např. receptory neurotransmiterů)

PCB jako endokrinní disruptory (příklad působení cizorodých látek více mechanismy)



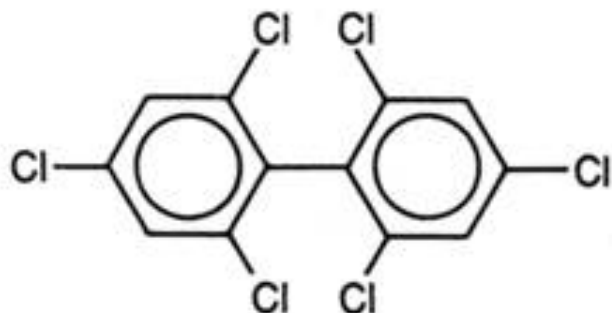
3,4,5,3',4'-pentachlorobifenyl
(PCB)

Koplanární PCB: induktory AhR ("dioxin-like compounds");

efekty také na thyroidní funkce (kompetitivní vazba na thyroid-binding protein);

antiestrogenita (suprese ER-dependentní genové exprese;

indukce hydroxylace (inaktivace) estradiolu



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

Nekoplanární PCB:

nízkomolekulární kongenery mají estrogení aktivitu (aktivace ER);

prevalentní výšechlorované PCB jsou antiestrogení a antiandrogení (ER, AR);

vazba na thyroid-binding protein;

vazba na RyR (disrupce Ca²⁺ signálování = neurotoxicita)



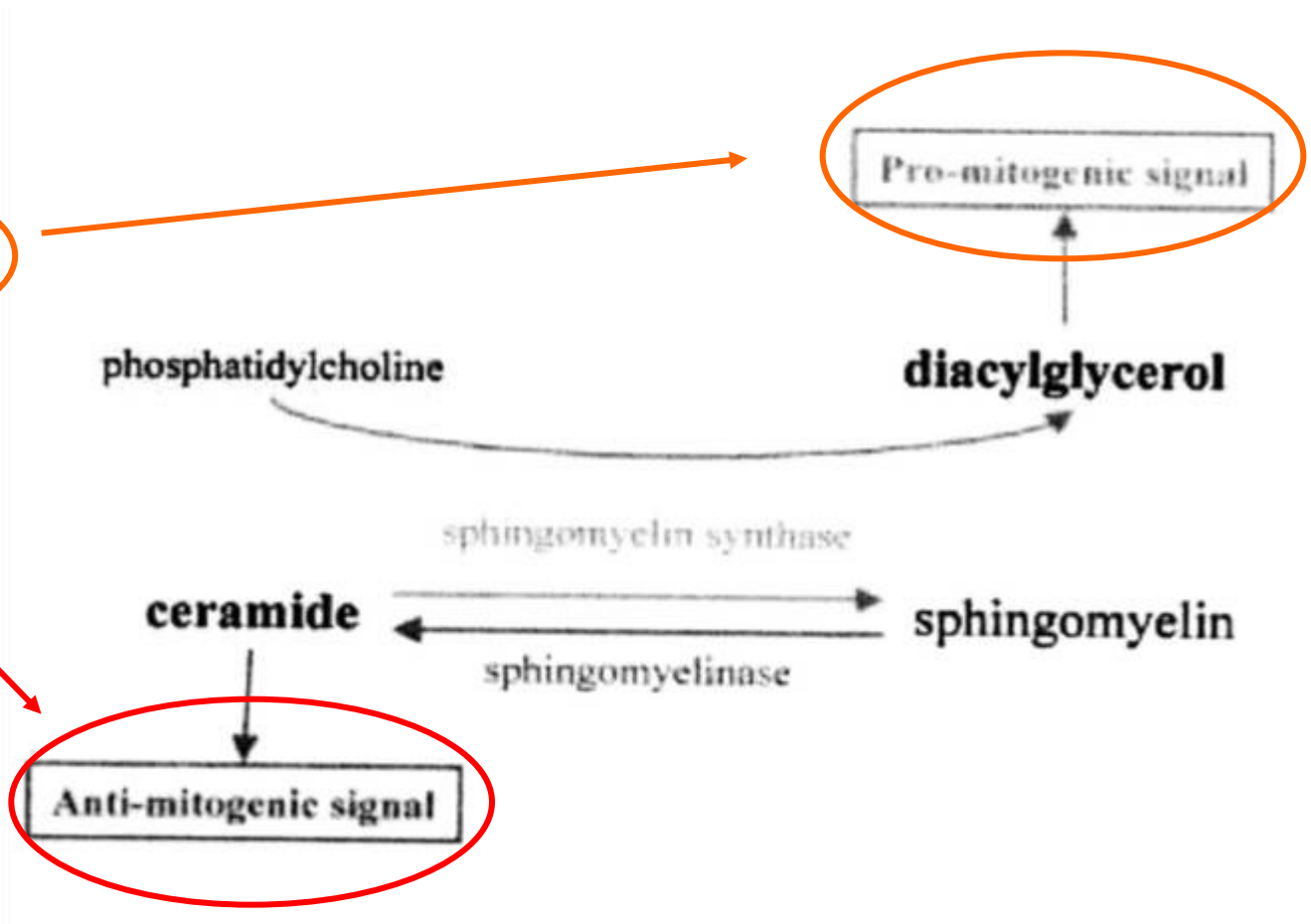
VLIV CIZORODÝCH LÁTEK NA METABOLISMUS A HOMEOSTÁZI LIPIDŮ

Xenobiotika ovlivňují syntézu a metabolismus lipidů: role syntézy ceramidu a DAG v signální transdukci (ovšem neplatí obecně!)

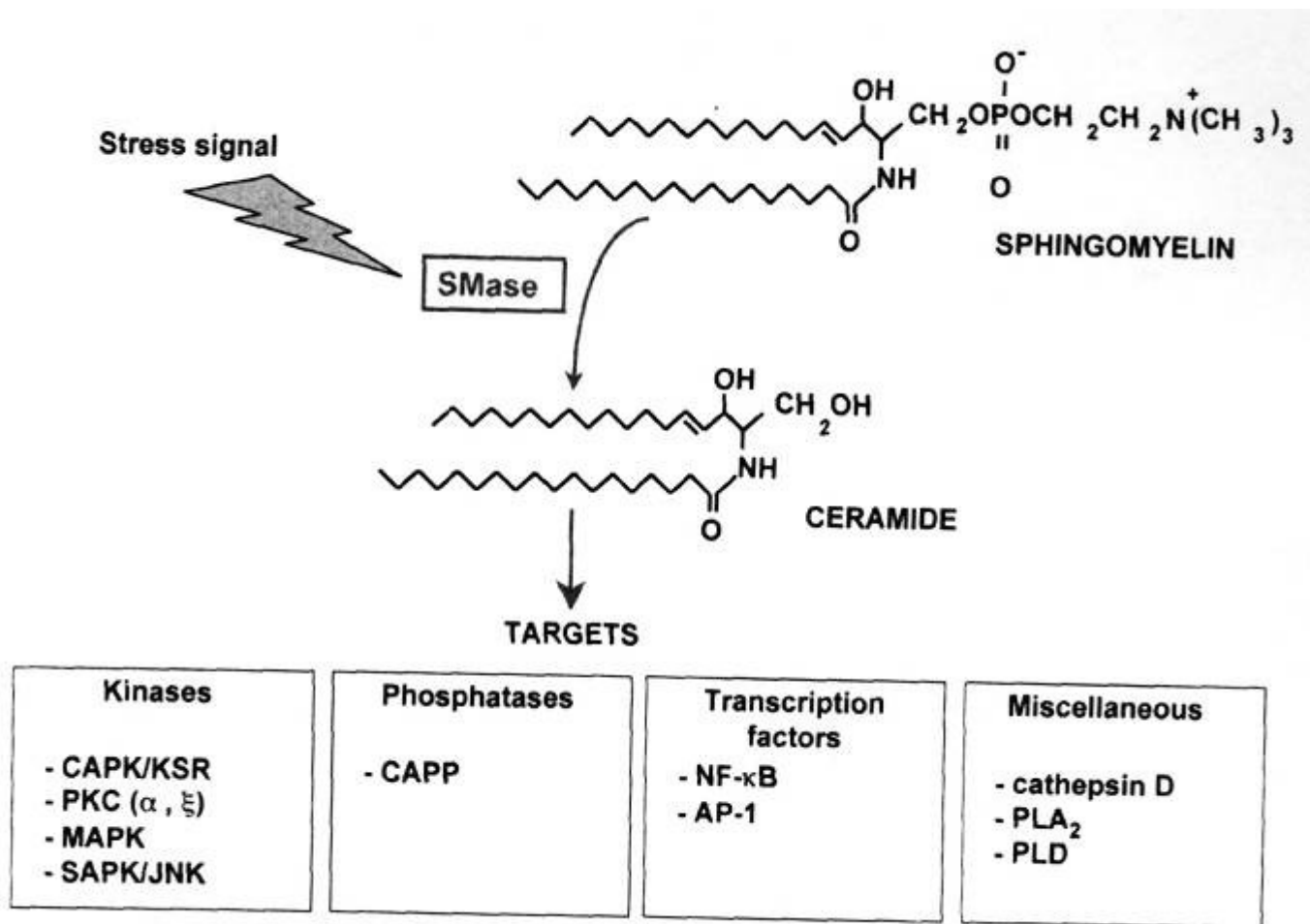
PC-PLC a
SMsyntáza

versus

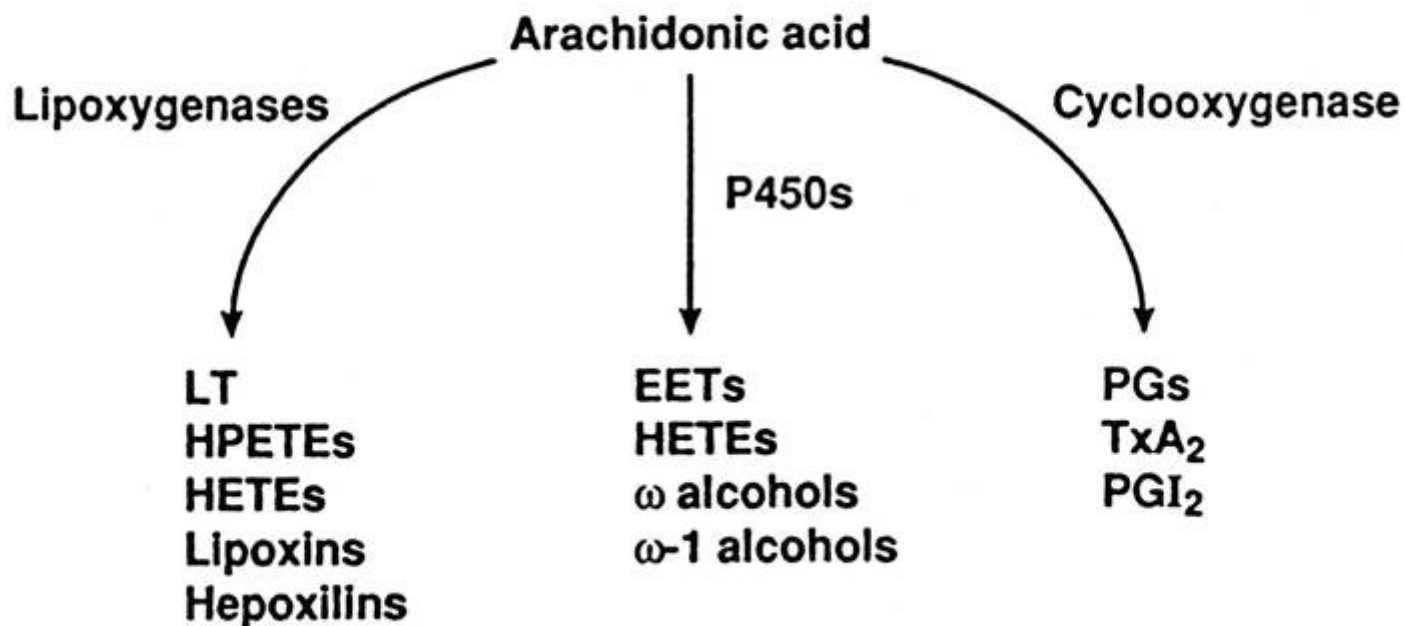
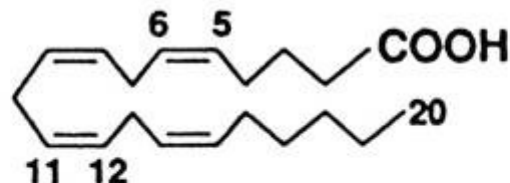
SMáza



Mechanismy účinku ceramidu: aktivuje enzymy signální transdukce



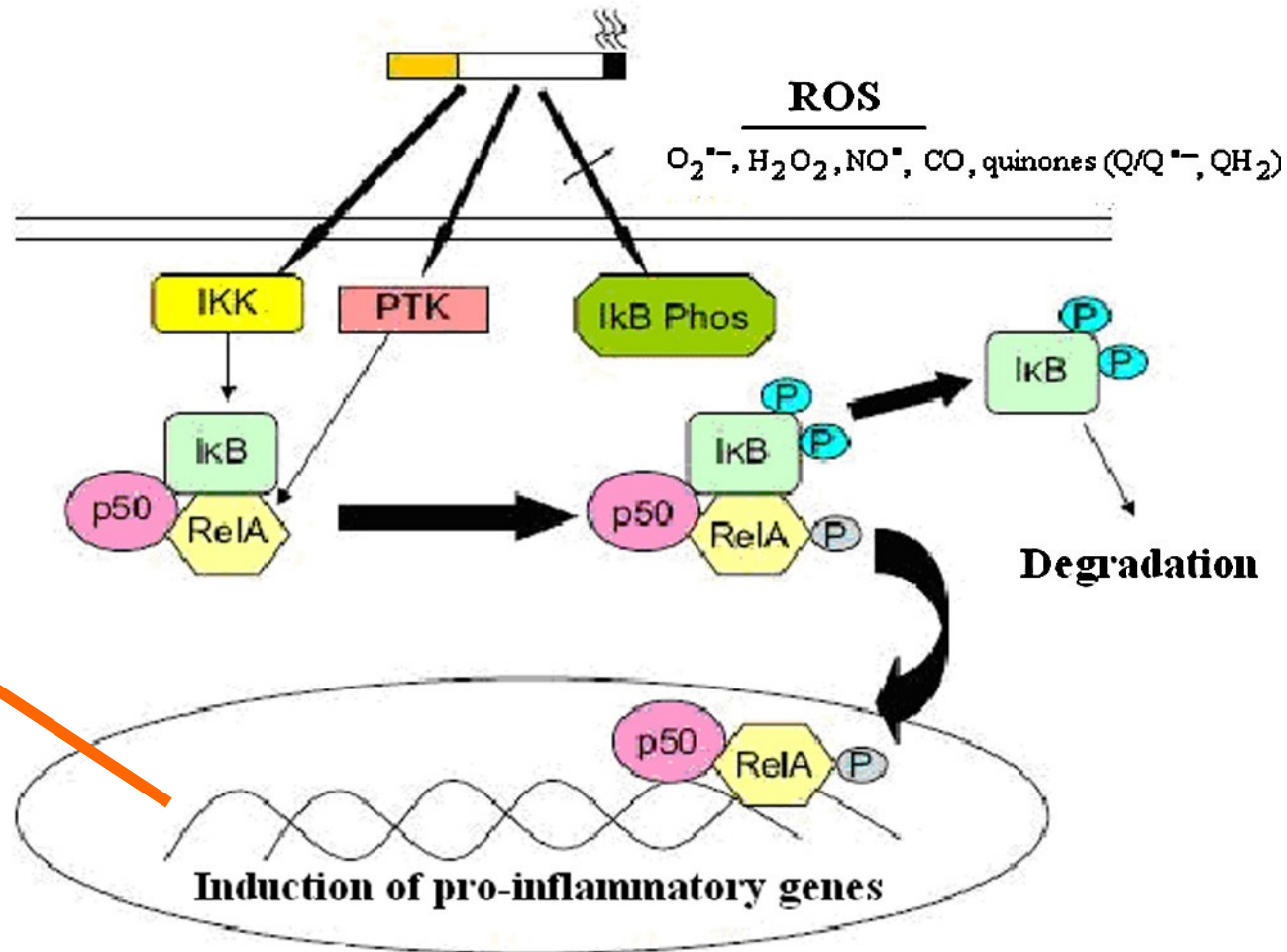
Další efekty xenobiotik: produkce mediátorů zánětlivých procesů a toxických lipidových metabolitů (kyselina arachidonová jako substrát pro enzymy CYP, LOX a COX)



REGULACE EXPRESE TRANSKRIPČNÍMI FAKTORY NF- κ B (ovlivněny řadou xenobiotik)

GENOVÁ EXPRESE
COX-2, PLA2,
iNOS, cytokinů
(TNF α aj.),
chemokinů

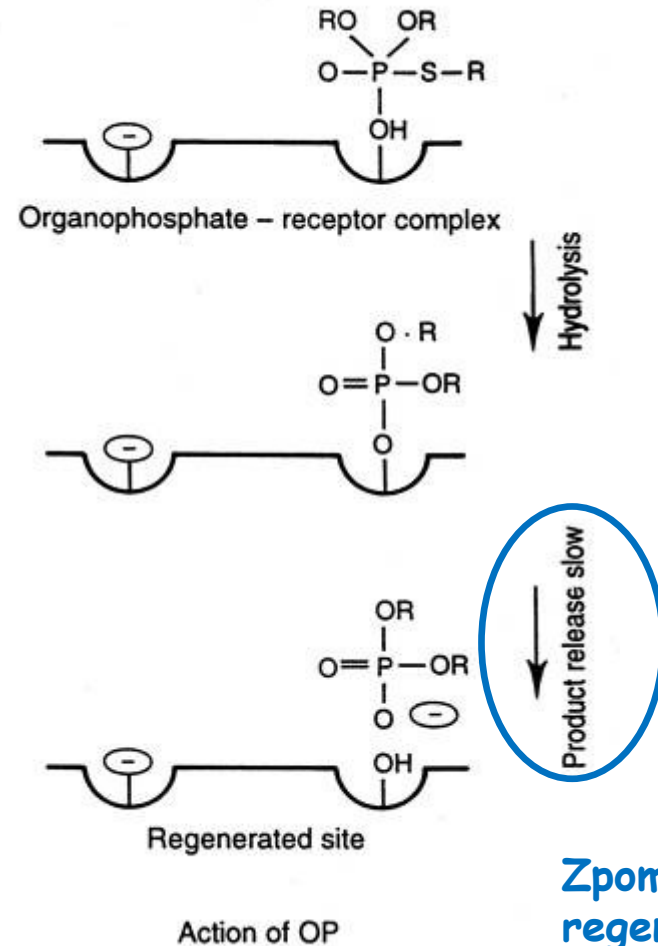
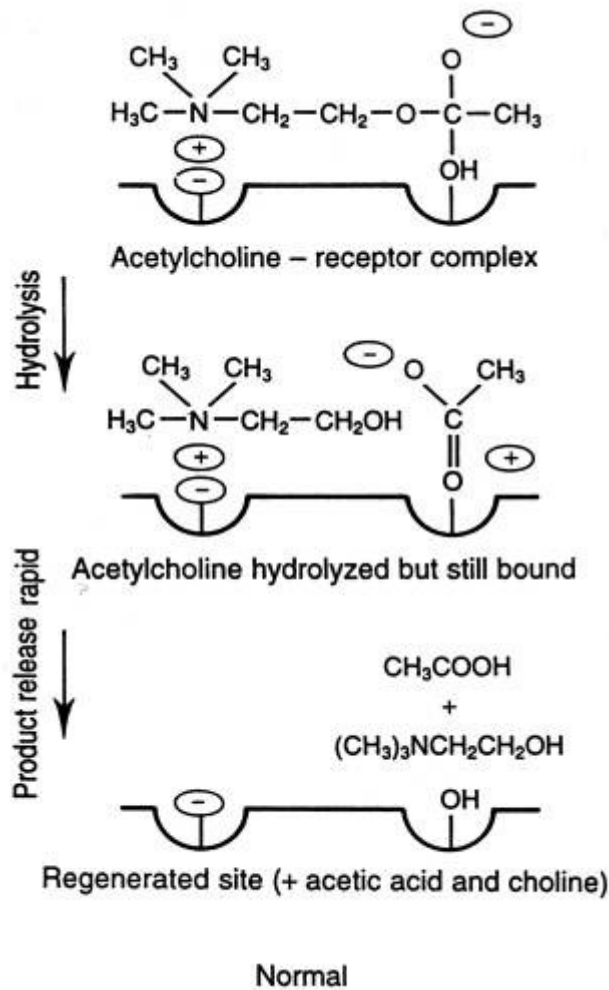
PROZÁNĚTLIVÉ
PROCESY



NEUROTOXICITA

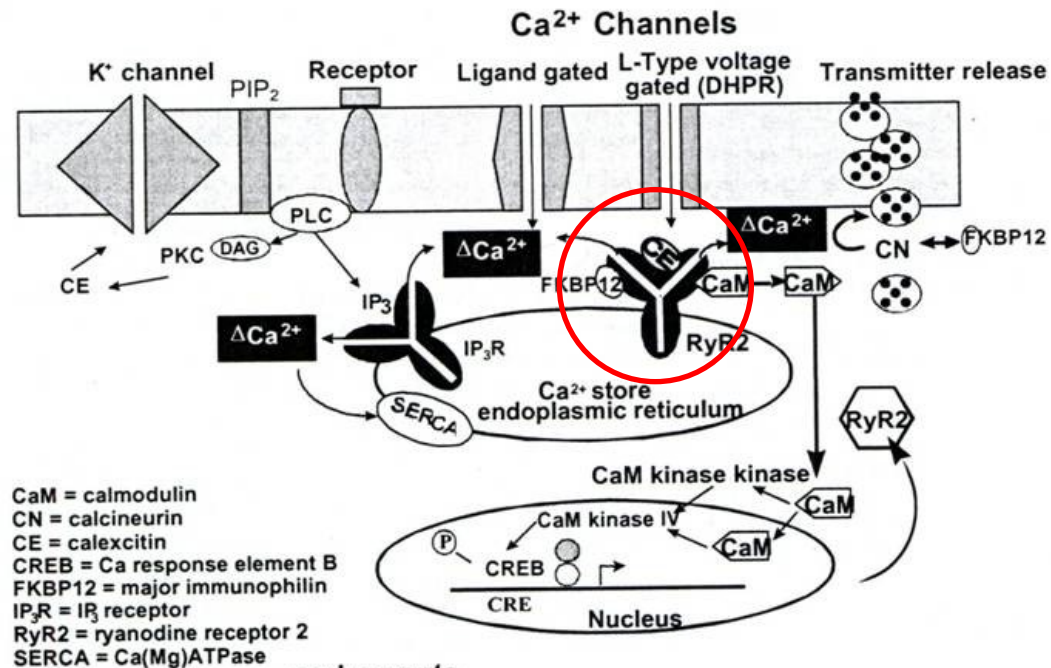
- ☛ Inhibice acetylcholinesteráz (např. karbamáty, organofosfáty, ..)
- ☛ Modulace uvolňování dopaminu; efekty na další signálování pomocí neurotransmitterů (efekty na cholinergní receptory apod.)
- ☛ Interakce s ryanodyne receptorem (RyR) - deregulace Ca^{2+} koncentrací = modulace Ca^{2+} -dependentní enzymů
- ☛ Poruchy diferenciaci a růstu nervové tkáně (inhibice GJIC, další interakce, např. s TR)

NEUROTOXICITA: inhibice acetylcholinesterázy (AChE)



Zpomalení regenerace vazebného místa (uvolnění produktu esterázové reakce)

NEUROTOXICITA: interakce s RyR a modulace Ca²⁺



early events

- Altered neurotransmitter release
- Altered dendritic spine morphology, arborization
- Altered synaptic circuitry
- Altered learning, cognition

late events

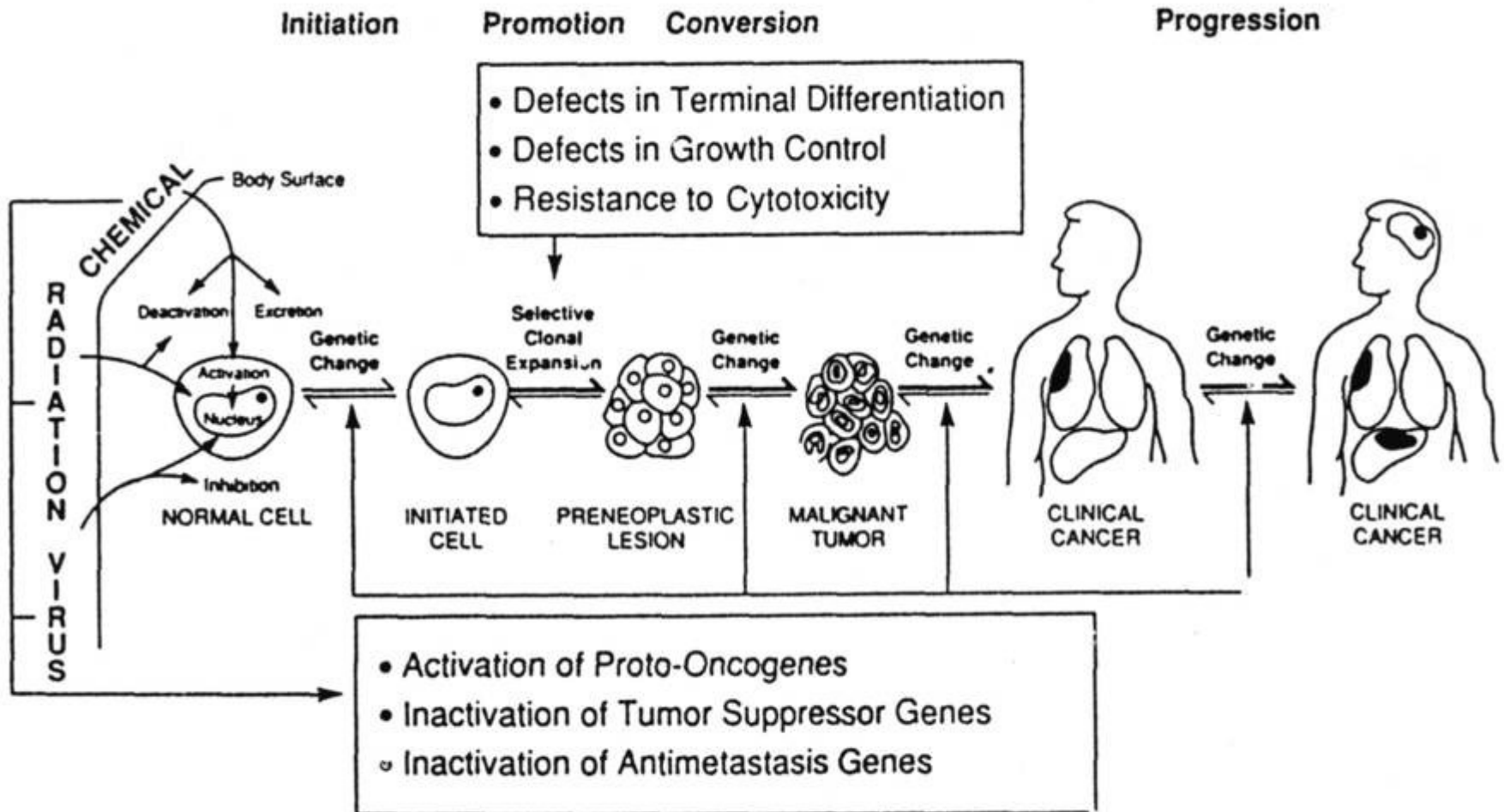
IMUNOTOXICITA

- 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

CHEMICKÁ KARCINOGENEZE - základní koncept:

- **Mnohastupňový proces** vývoje rakoviny, komplexní interakce genetických, genotoxických a epigenetických (negenotoxických) faktorů. Základní fáze karcinogeneze:
 - 1) iniciace (akumulace mutací v určitých skupinách genů);
 - 2) promoce (epigenetické změny – změny genové exprese, především změněný statut metylace DNA a acetylace histonů; ovlivnění přenosu signálů regulujících bun. cyklus, proliferaci, diferenciaci a apoptózu; inhibice mezibuněčných spojení GJIC, AJ)
 - 3) progrese, metastáze (další změny genové exprese, genetická instabilita a chromosomová instabilita)
- **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
- **Cizorodé látky mohou ovlivňovat všechny uvedené procesy**

CHEMICKÁ KARCINOGENEZE



Vznik mutací - genetická instabilita prakticky ve všech fázích



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, např. PCB, dioxiny);
- ☛ pracovní prostředí (PAHs, chemické výroby, cytostatika aj.)

PREKLINICKÉ EFEKTY

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

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** zahrnuje mutace genů DNA repair, onkogenů (ras, myc aj.) a tumor-supresorových genů (např. p53) - genů kontrolujících buněčný cyklus a proliferaci (PAHs, nitro-PAHs, NNK aj. nitrososloučeniny)
- **NEGENOTOXICKÉ KARCINOGENY** modulují signální transdukcii a gen. expresi - pozměněna proliferace a diferenciace, inhibována apoptóza a mezibuněčná komunikace; 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 aktivaci chemických karcinogenů



MECHANISMY NEGENOTOXICKÝCH PROCESŮ

- aktivace nebo suprese transkripčních faktorů (AhR, NF-κB,...), „klasické“ **epigenetické** mechanismy (de/methylace DNA nebo acetylace/deacetylace histonů);
- aktivace **intracelulární signální transdukce** (ERK1/2, ...);
- strukturální 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

ZÁKLADNÍ MECHANISMY NÁDOROVÉ PROMOCE

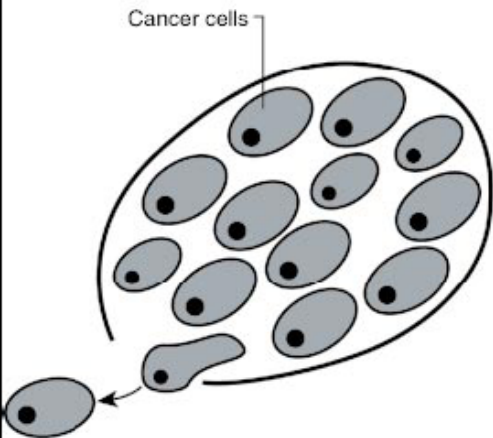
- ☛ Mitogenní efekt, **zvýšení buněčné proliferace**, vyvázání z kontaktní inhibice růstu (role onkogenů - mutanty ras, myc, β -cat, ... a inaktivace tumorových supresorů)
 - interference s transdukčními signály, které kontrolují normální buněčný růst a diferenciaci (aktivace EGFR/ErbB2-ras-ERK, aktivace 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, přechod z epiteliálního na mesenchymální fenotyp buňky



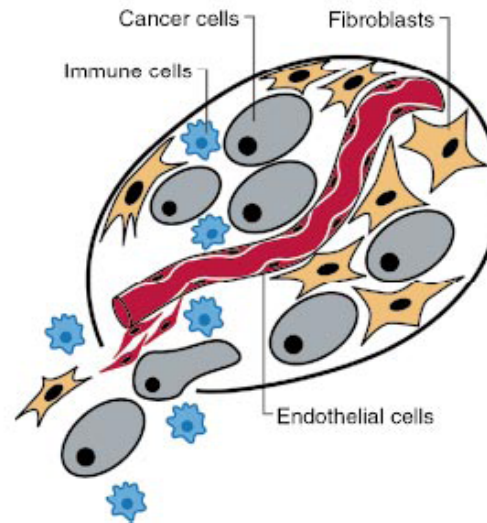
Přežívání a transformace buněk = komplexní mnohastupňový proces iniciace a promočních mechanismů - de/diferenciace, angiogeneze, ...); výsledek změn v genové expresi, na povrchu buňky, intracel. signalizace aj.

ZÁKLADNÍ MECHANISMY NÁDOROVÁ PROMOCE

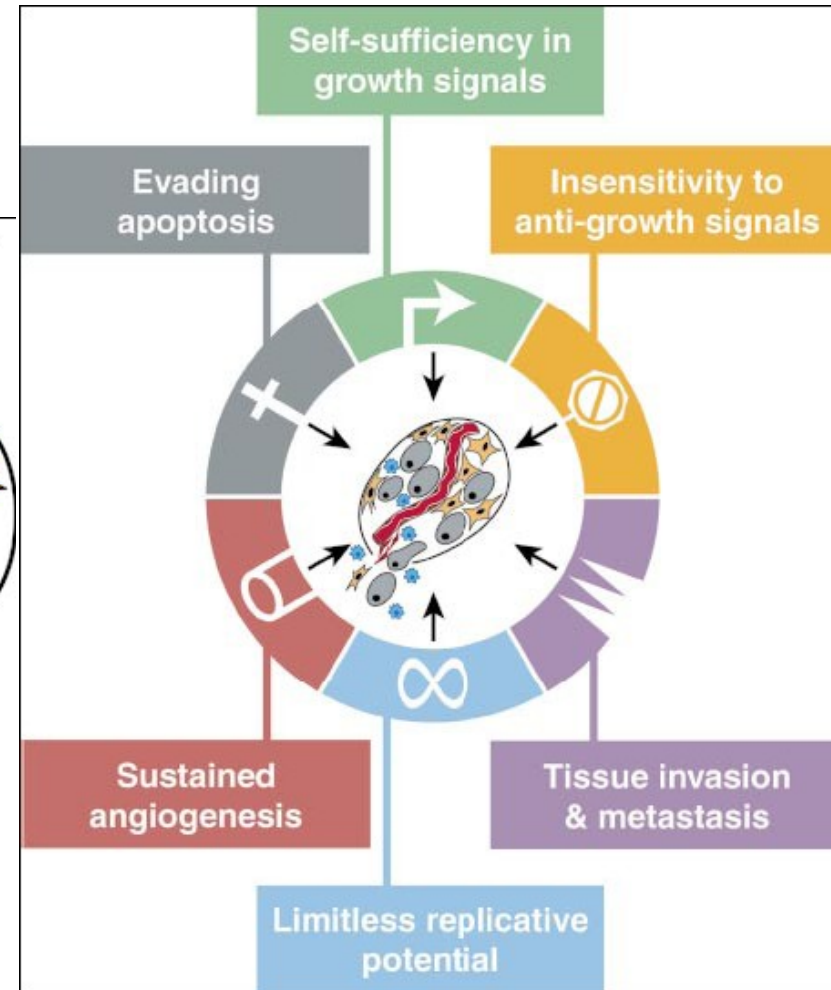
The Reductionist View



A Heterotypic Cell Biology

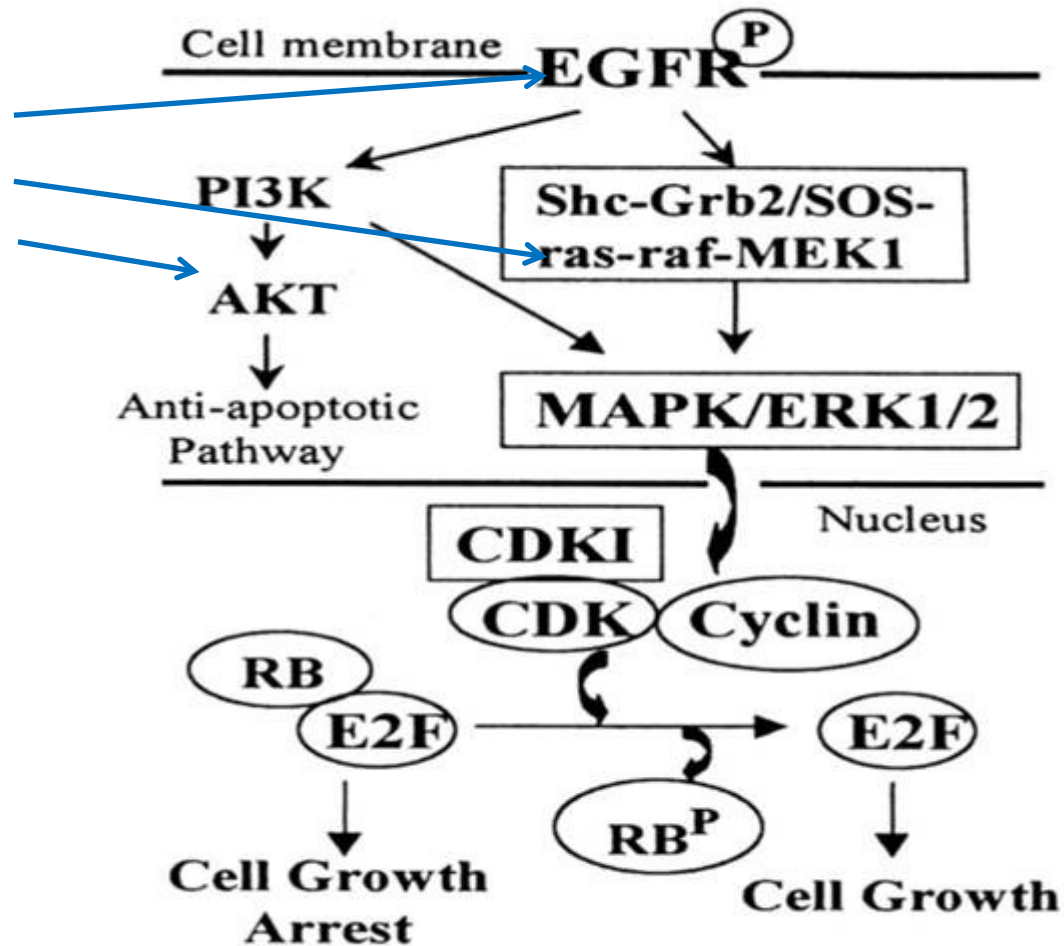


(Hannahan, Weinberg, 2000)



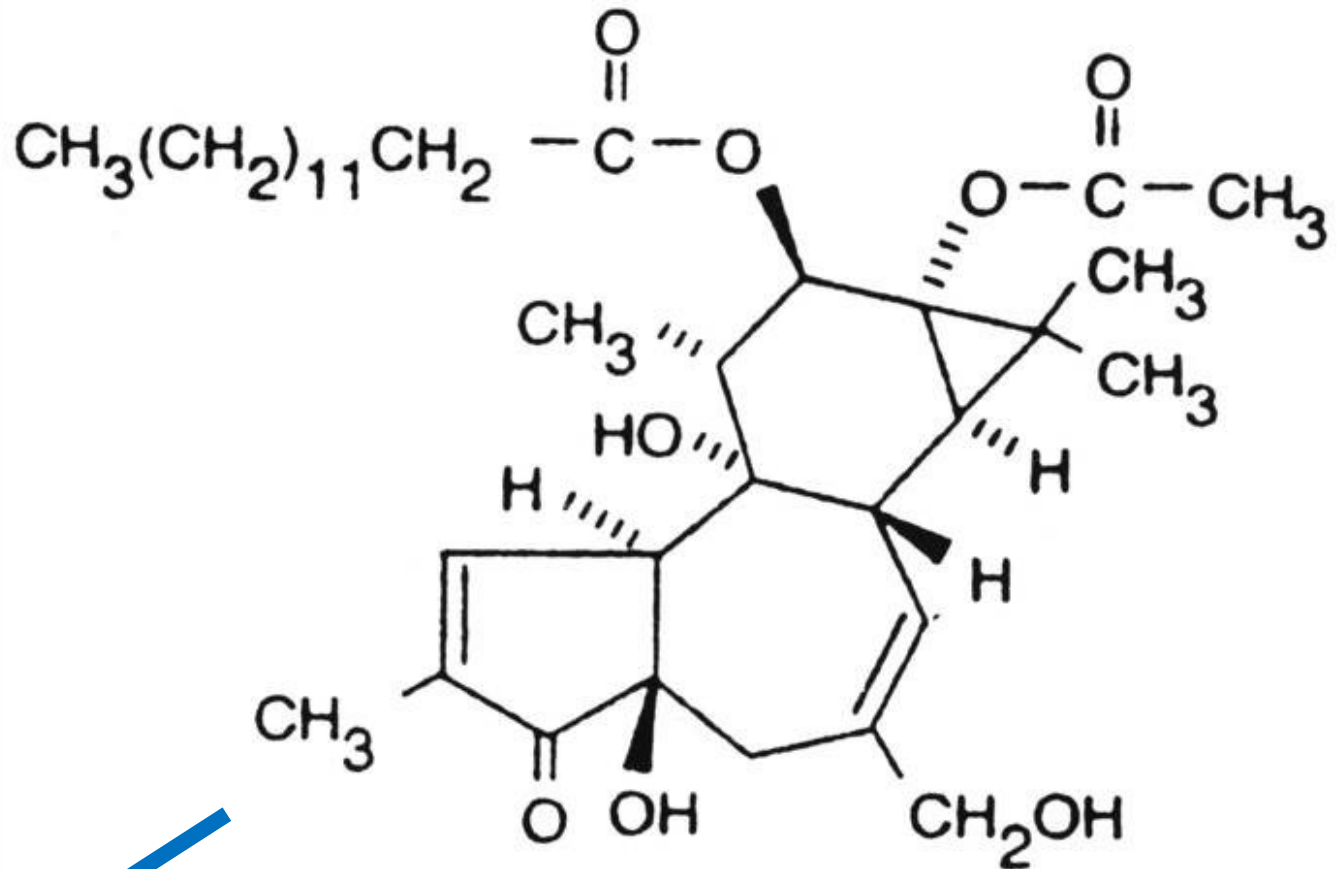
PŘÍKLAD AKTIVACE BUN. PROLIFERACE (aktivací signální transdukce)

velmi časté
mutace =
chronická
aktivace
proliferačních
drah



MECHANISMY NEGENOTOXICKÝCH PROCESŮ

Forbol-myristátacetát = PMA, TPA (modelový tumorový promóter)



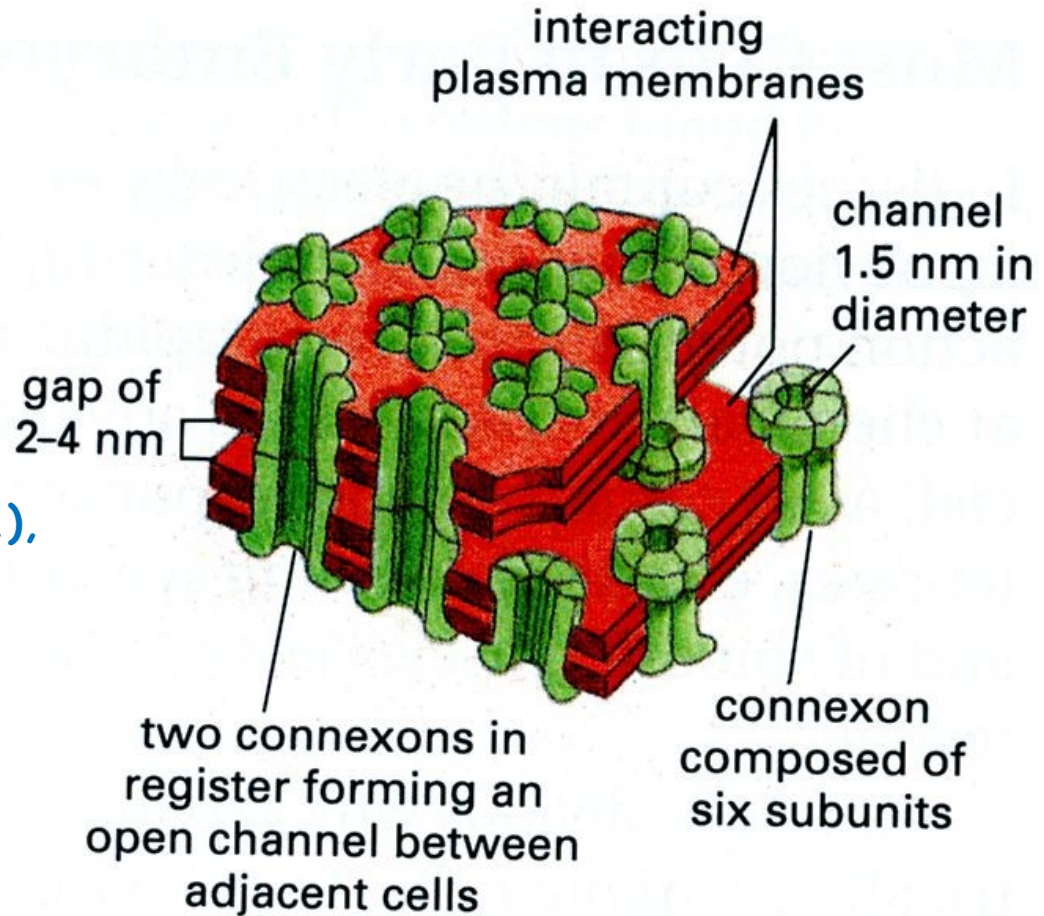
chemická aktivace proteinkináz C a ERK1/2:
- hyperfosforylace Cx, inhibice GJIC
- mitogenní efekty



**DISRUPCE MEZIBUNĚČNÝCH SPOJENÍ -
VEDE K NÁDOROVÉ PROMOCI,
INVAZIVITĚ A METASTÁZÍM**

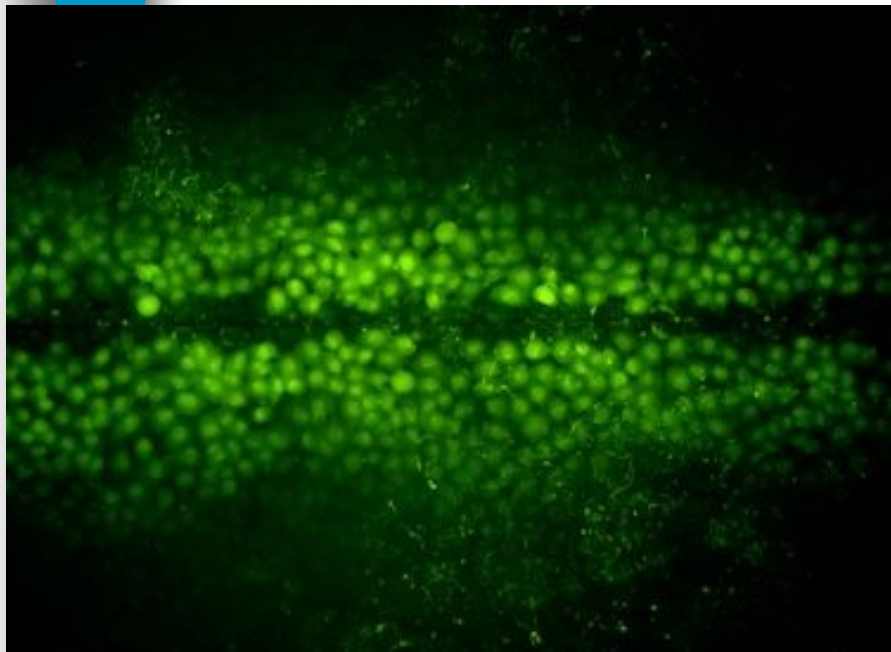
INTERCELULÁRNÍ SPOJENÍ GJIC ("gap junction intercellular communication")

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.)

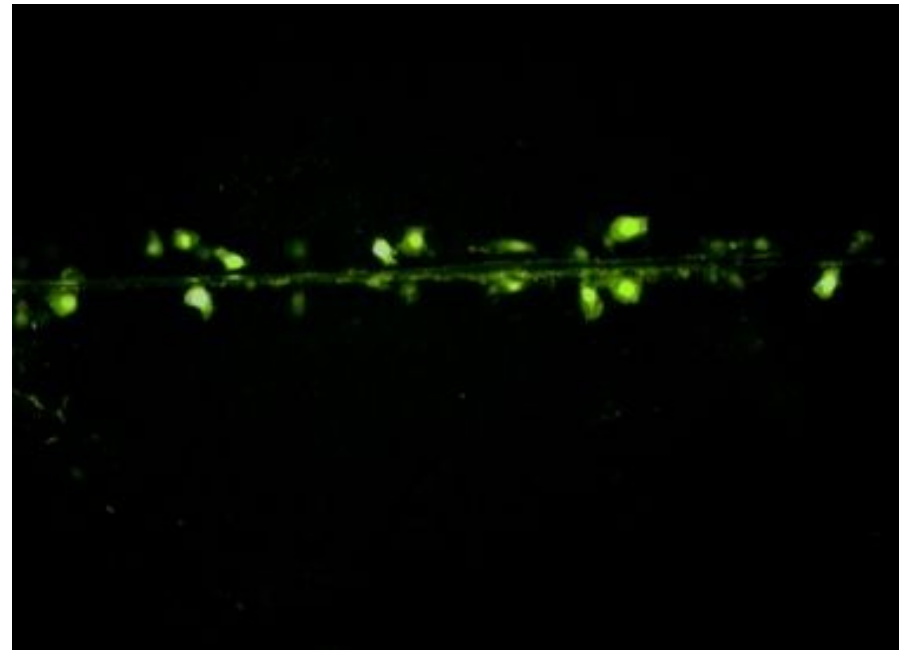


INHIBICE GJIC

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

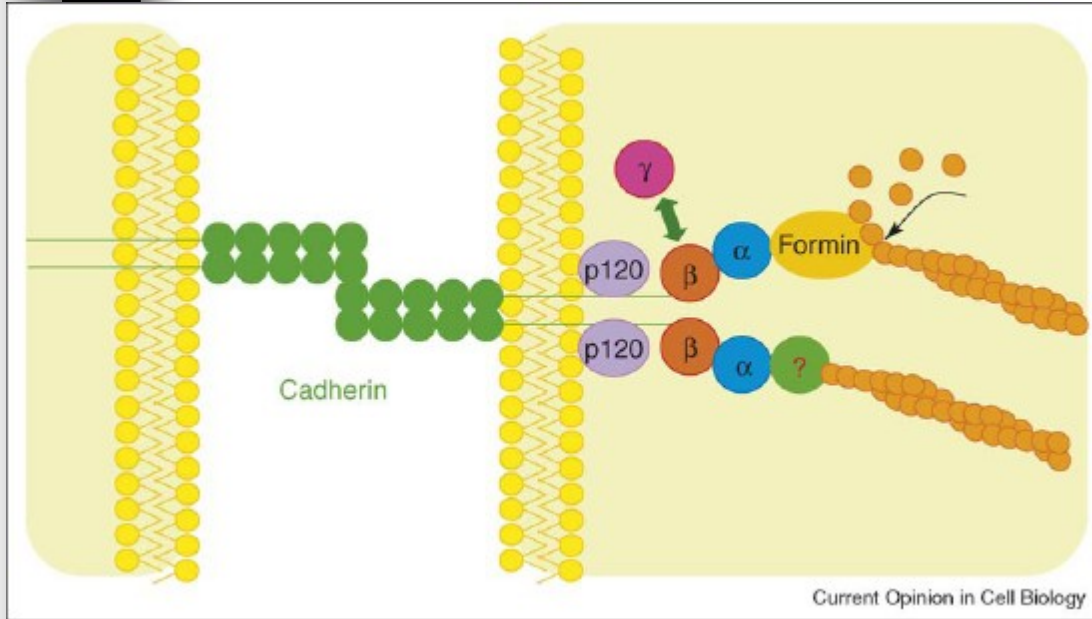


kontrola

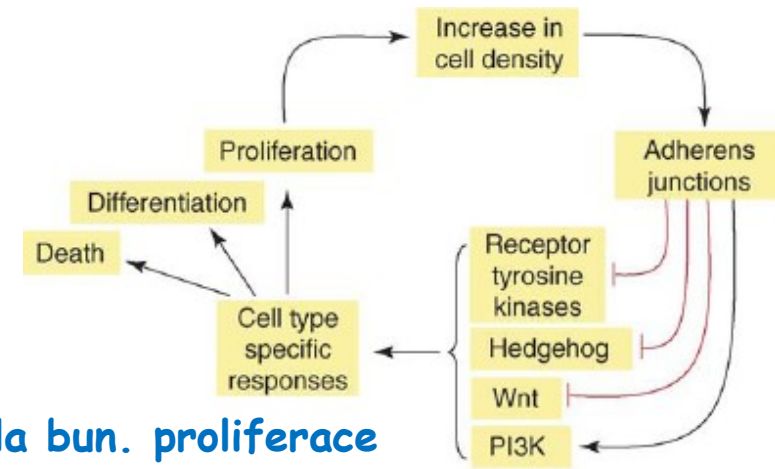
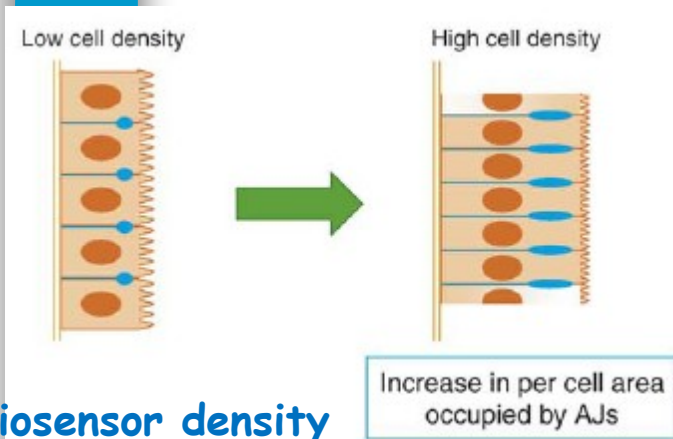
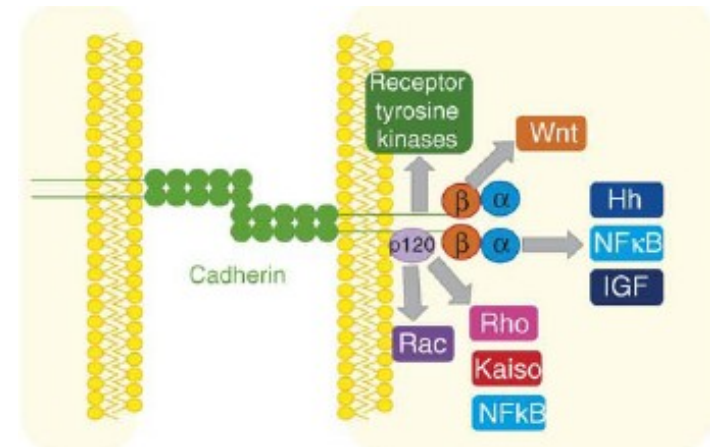


expozice TPA (aktivace PKC a ERK1/2,
hyperfosforylace konexinu)

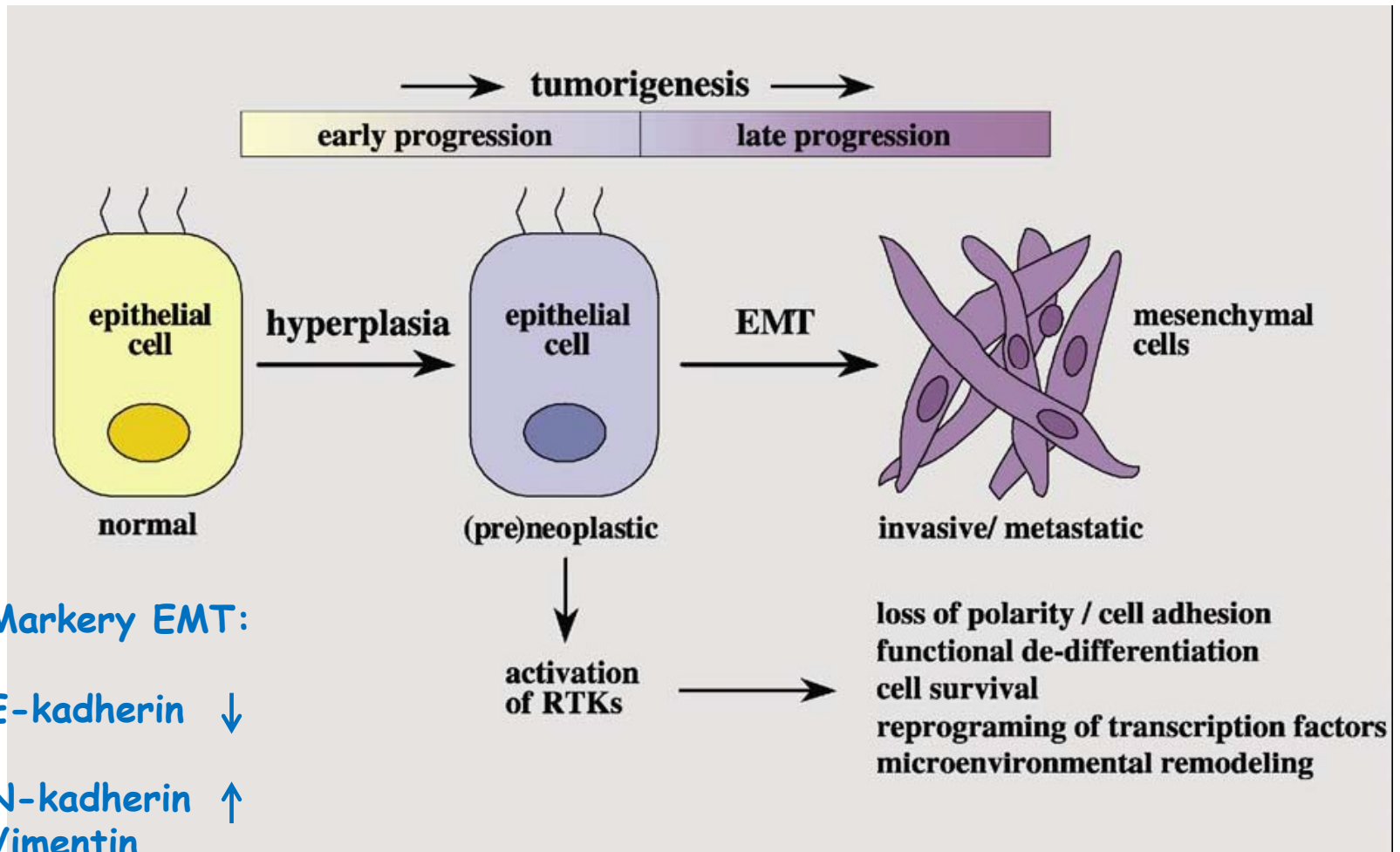
DISRUPCE ADHERENTNÍCH SPOJENÍ (ADHERENS JUNCTIONS)



signálování beta- kateninu -
vývoj tkání, nádor. promoce

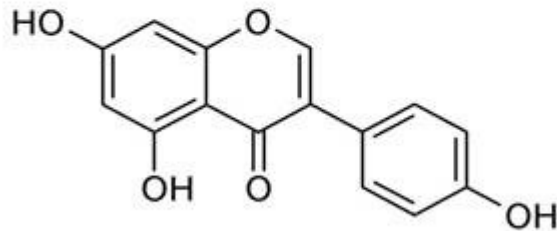


Disrupce adherentních spojů ("adherens junctions") vede ke změně fenotypu buňky

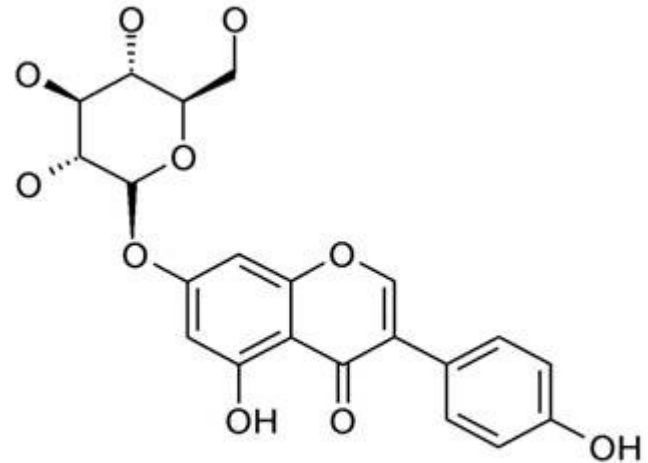


CHEMOPROTEKTIVNÍ LÁTKY

- snižují riziko karcinogeneze různými mechanismy účinku (inhibice enzymů, antioxidační efekty)
- přírodní (směsi i individuální chemické látky) nebo syntetického původu
- příklady chemoprotektivních sloučenin: dietární flavonoidy / glykosidy flavonoidů (antioxidanty, antiestrogeny, modulátory CYP enzymů aj.)



Genistein

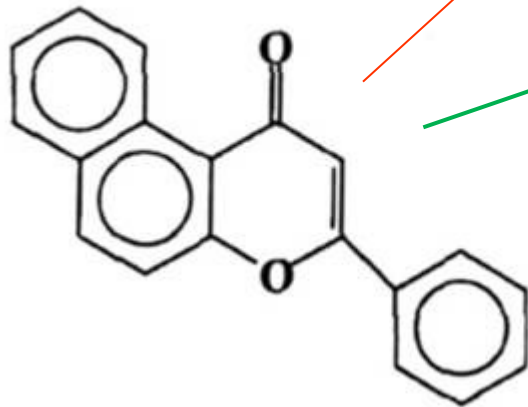


Genistin

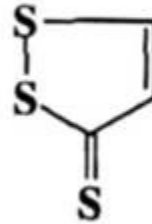
INDUKTORY / INHIBITORY 1. A 2. FÁZE BIOTRANSFORMACE

XRE

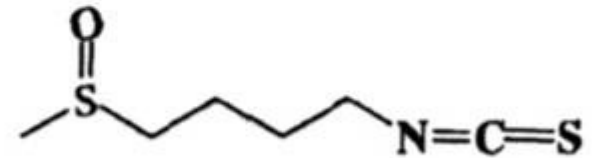
ARE



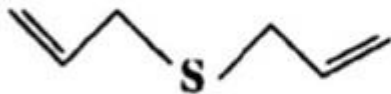
β -naphthoflavone (β -NF)



1, 2-Dithiol-3-thione
(D3T)



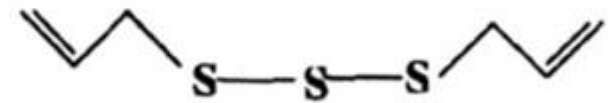
Sulforaphane (SFP)



Diallyl sulfide (DAS)



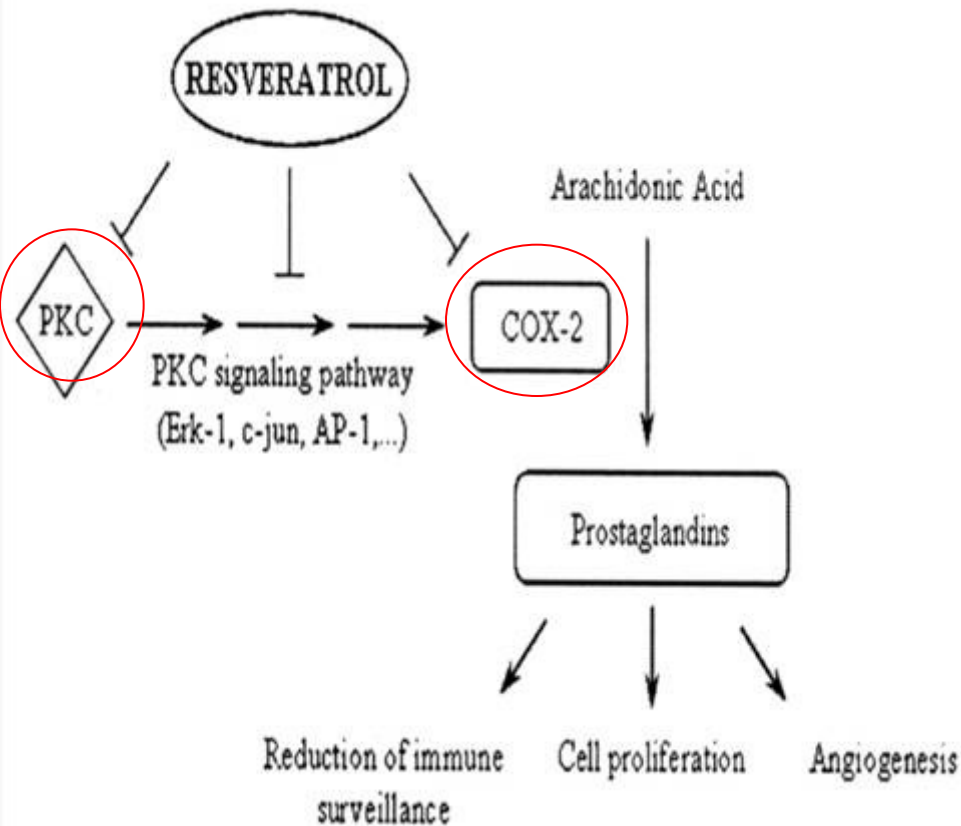
Diallyl disulfide (DADS)



Diallyl trisulfide (DATS)

MECHANISMY PROTEKTIVNÍCH VLASTNOSTÍ RESVERATROLU

protizánětlivá aktivita RES



aktivační vlastnosti RES

