

# Hlavní mechanismy toxicity cizorodých látek

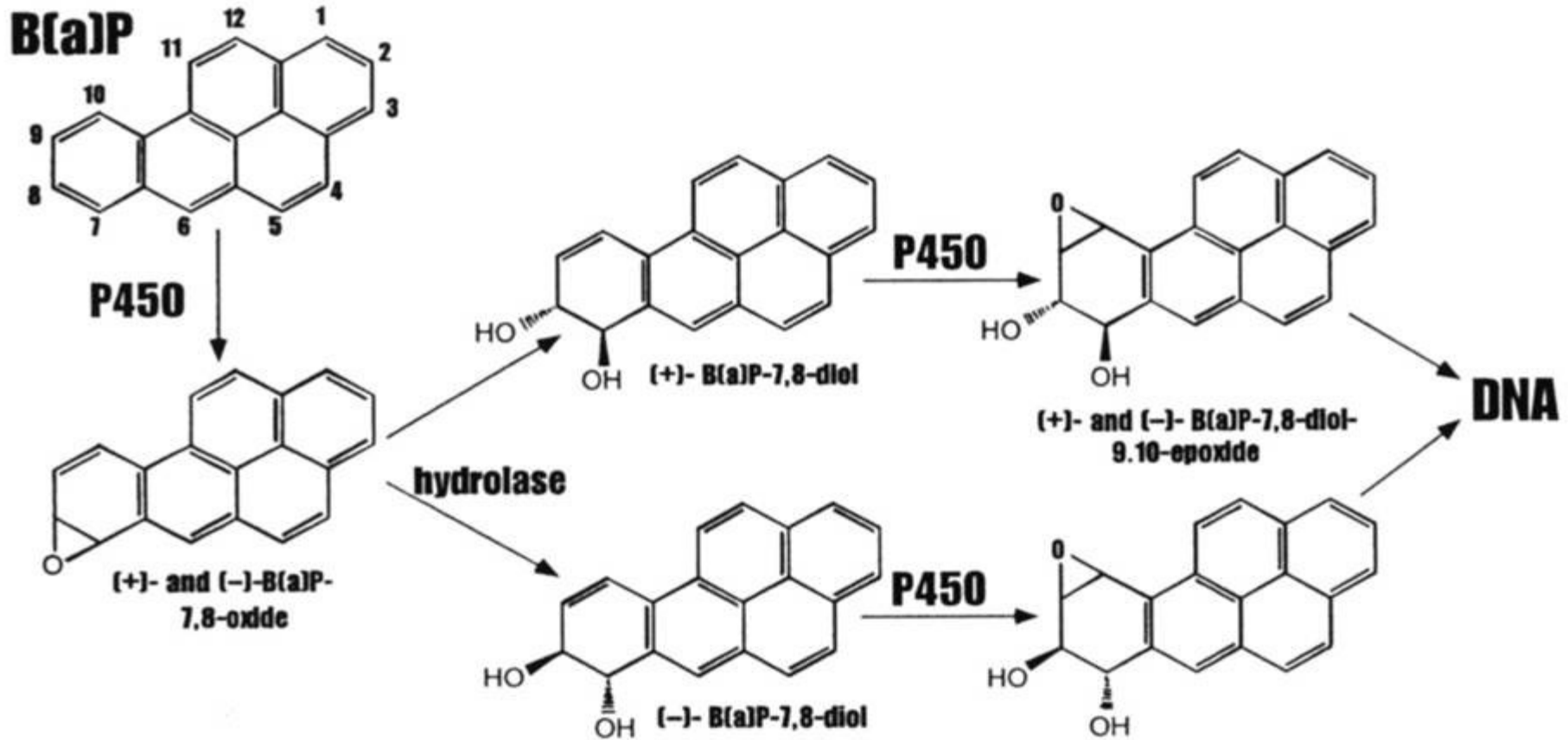
# HLAVNÍ MECHANISMY TOXICITY XENOBIOTIK

- ☛ Genotoxicita - přímé genotoxiny/mutageny; metabolická aktivace promutagenů; adukty s DNA, zlomy 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.
- ☛ Receptor-dependentní mechanismy endokrinní disrupce (např. estrogenita, antiestrogenita)
- ☛ Inhibice mitochondriálních funkcí (respirace, syntéza ATP, ale také apoptóza - porušení mitochondriální membrány)
- ☛ Neurotoxicita
- ☛ Imunotoxicita
- ☛ Poruchy metabolismu endogenních látek po expozici cizorodými látkami (CAR, PXR, PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ ).

# GENOTOXICITA

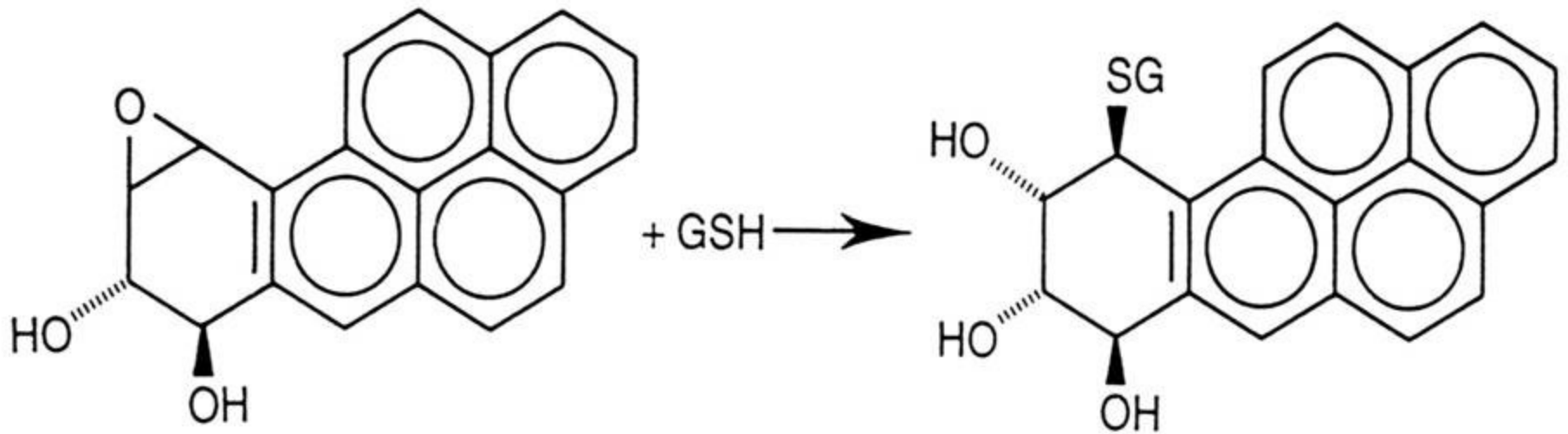
- Genotoxicita = potenciálně škodlivé účinky chemických látek nebo záření na genetický materiál; důsledkem nemusí být smrt buňky, ale trvalé genetické změny (mutace, chromosomální aberace aj.).
- Příklady hlavních genotoxinů: PAHs (benzo[a]apyren), alkyl-PAHs, aromatické a heterocyklické aminy, nitro- a nitrososloučeniny, halogen. deriváty uhlovodíků ( $\text{CCl}_4$ ), aldehydy a epoxidy, azobarviva a akridinová barviva, silná oxidační činidla, některé těžké kovy (Cd) 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).

# GENOTOXICITA - METABOLICKÁ AKTIVACE POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ



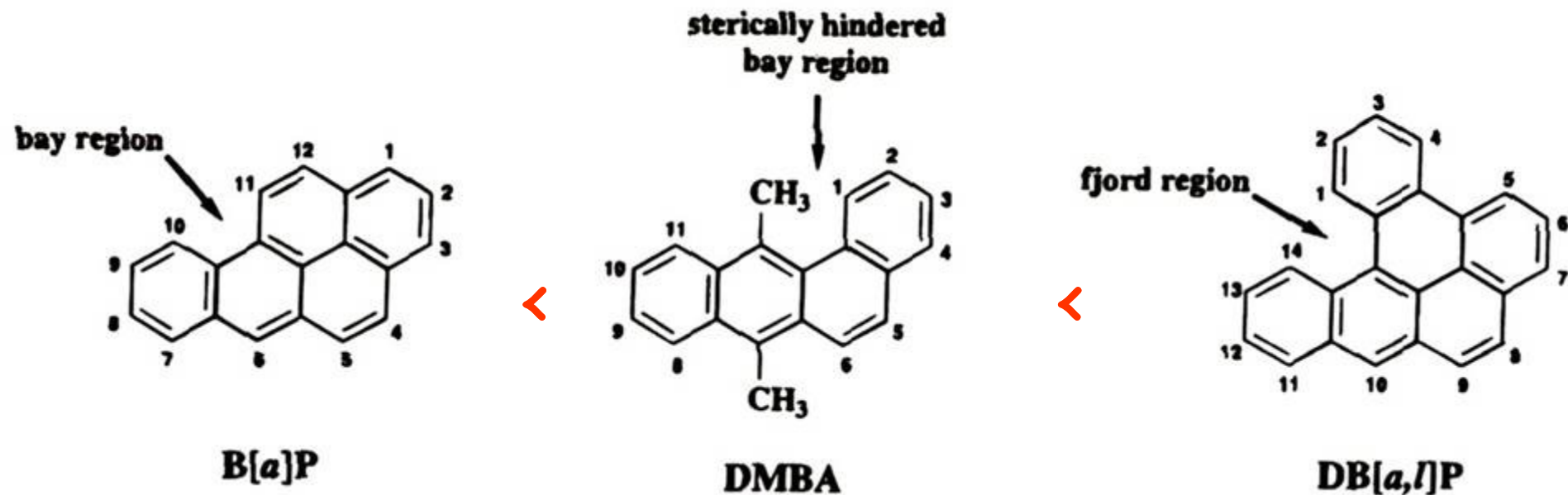
# DETOXIKACE POLYCYKLIČKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ:

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



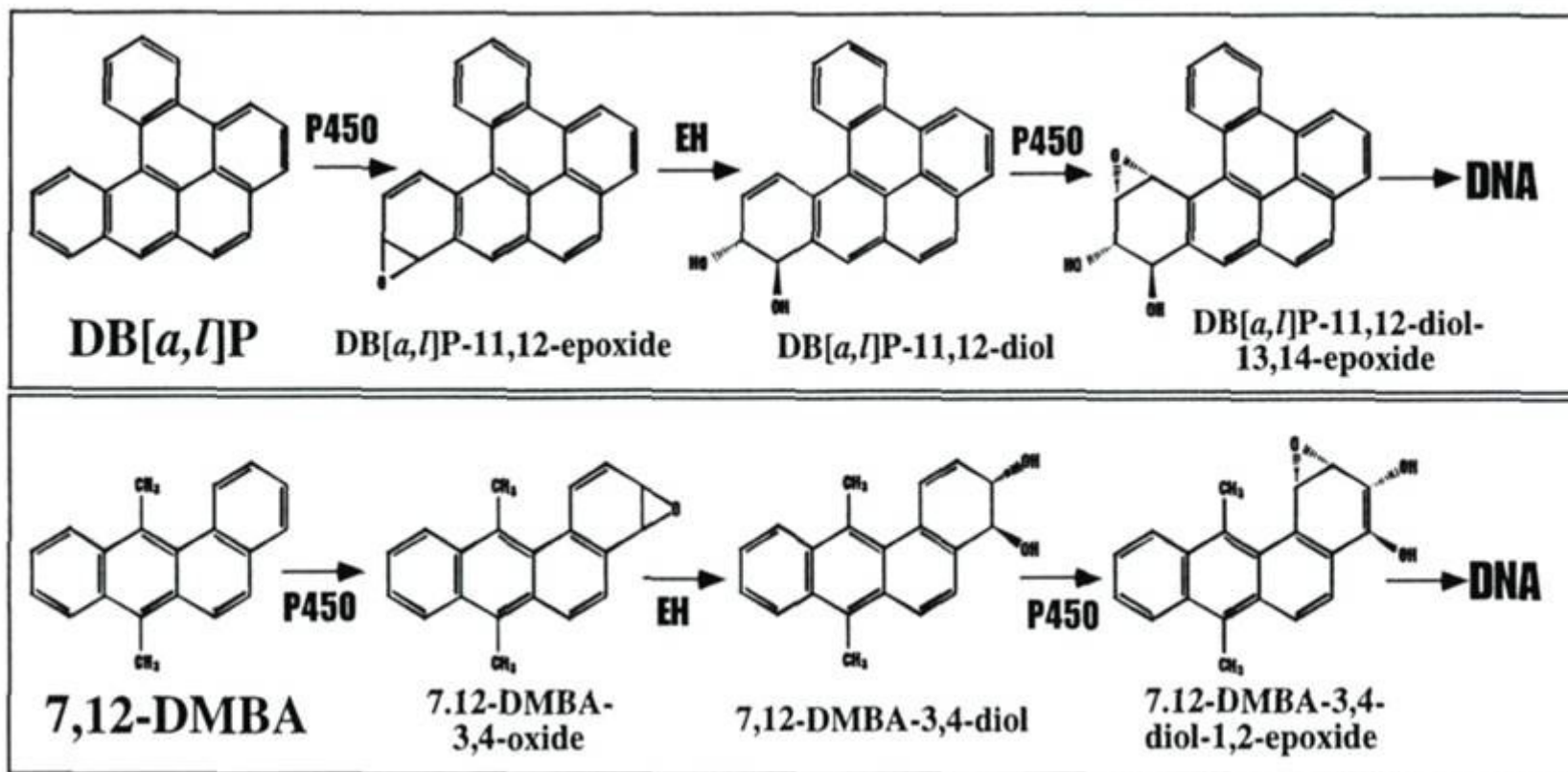
Glutathione-S-transferase

# GENOTOXICITA - METABOLICKÁ AKTIVACE POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ



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

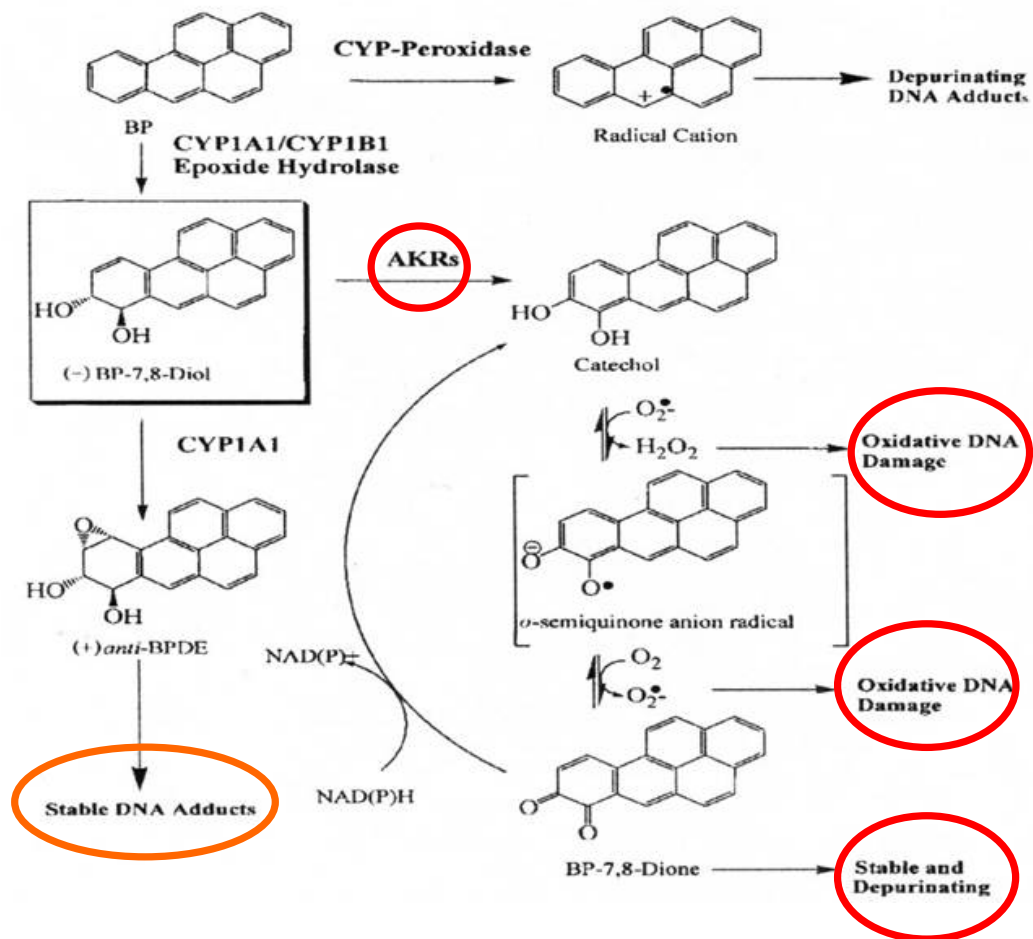
# GENOTOXICITA - METABOLICKÁ AKTIVACE POLYCYKLIČKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ



# GENOTOXICKÉ EFEKTY PAHs:

alternativní dráha (AKR) vede k oxidačnímu poškození DNA

Metabolická dráha CYP1/EH vede k detoxikaci event. stabilním DNA aduktům.  
Alternativní AKR dráha vede k ox. stresu (redox cyklování chinonů).



Oxidativní stres

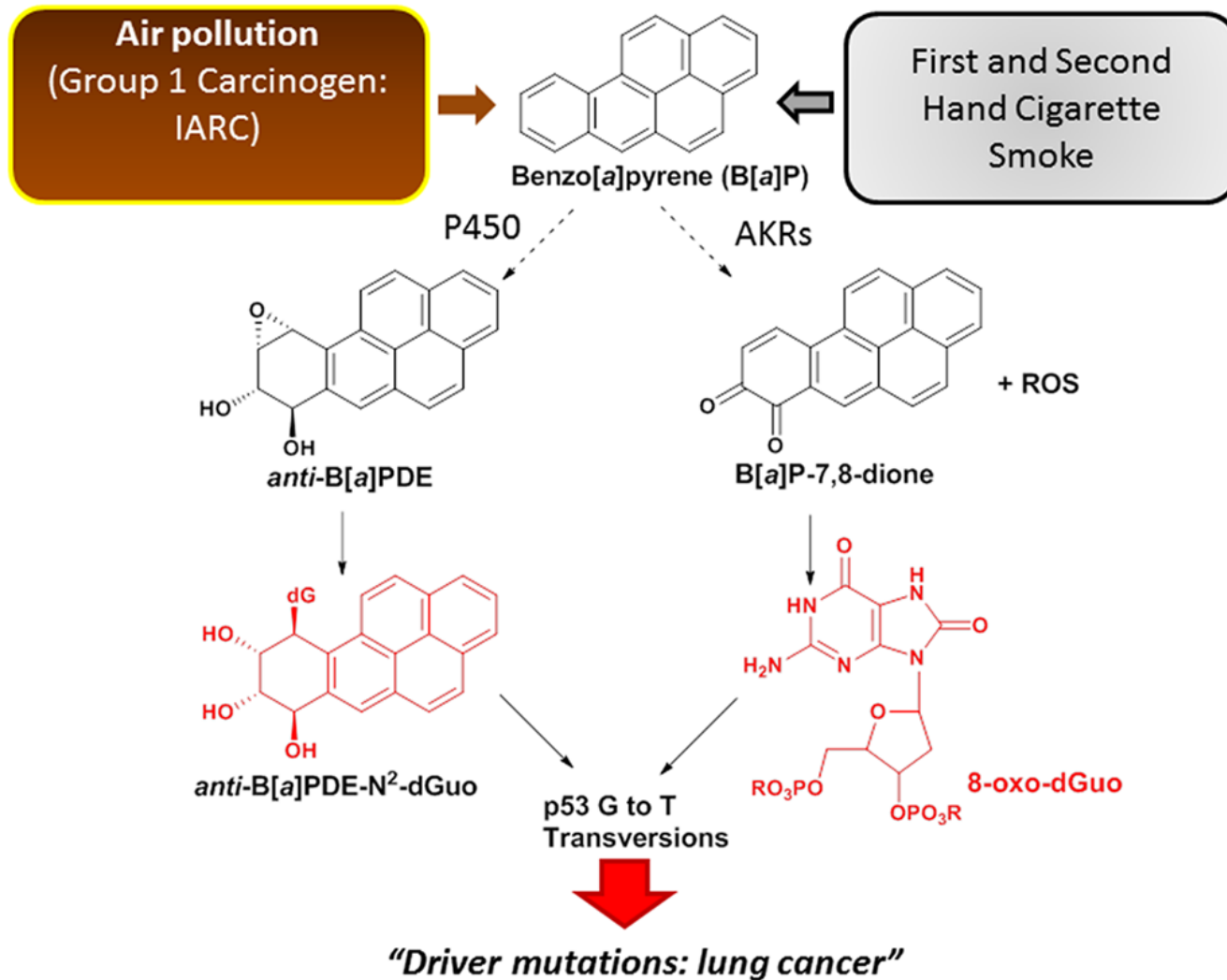
Oxidativní poškození DNA (oxidace bází, apurinová místa)

Stabilní adukty DNA-PAH



# GENOTOXICKÉ EFEKTY PAHs

Metabolická aktivace cytochromy P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1);  
alternativní dráha v lid. buňkách (AKR1C1-AKR1C4, AKR1A1)



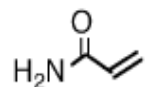
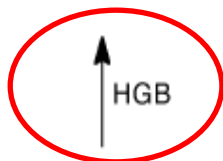
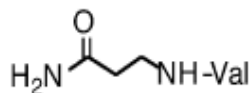
# Akrylamid: detoxikace vs. tvorba aduktů

detoxikace  
metabolická aktivace

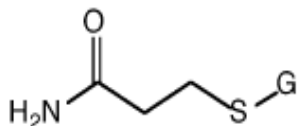
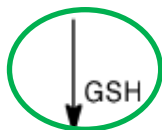
-tvorba aduktů s proteiny

-tvorba aduktů s DNA

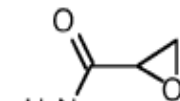
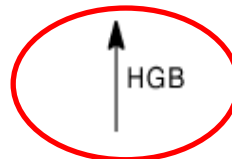
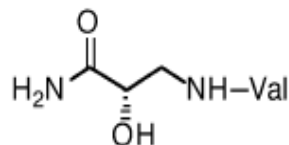
N-(2-carbamoyl-ethyl)-valine (AAVal)



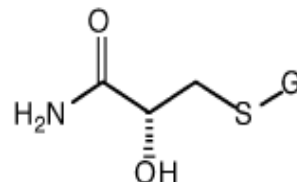
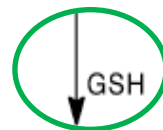
Acrylamide



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



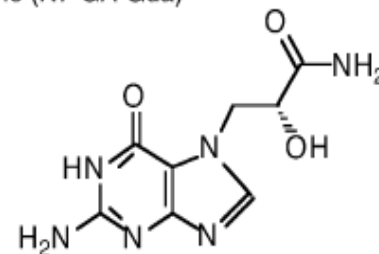
Glycidamide



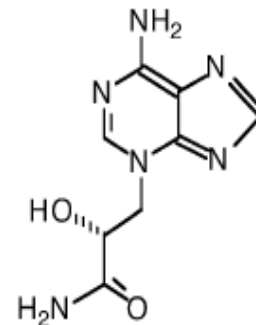
CYP2E1

DNA

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

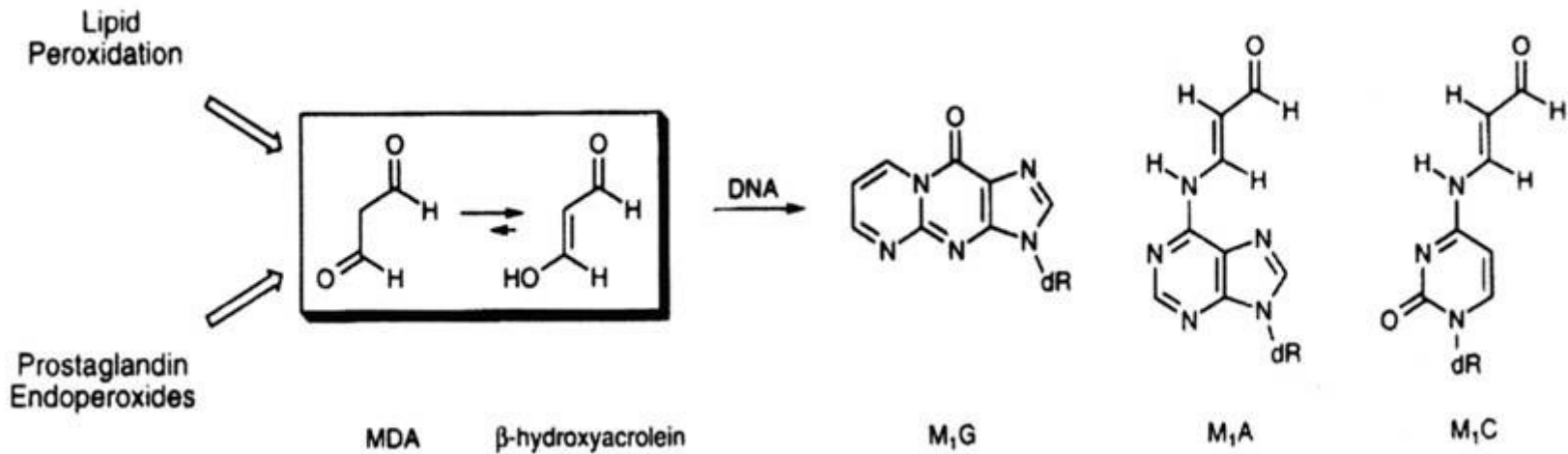


OR



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

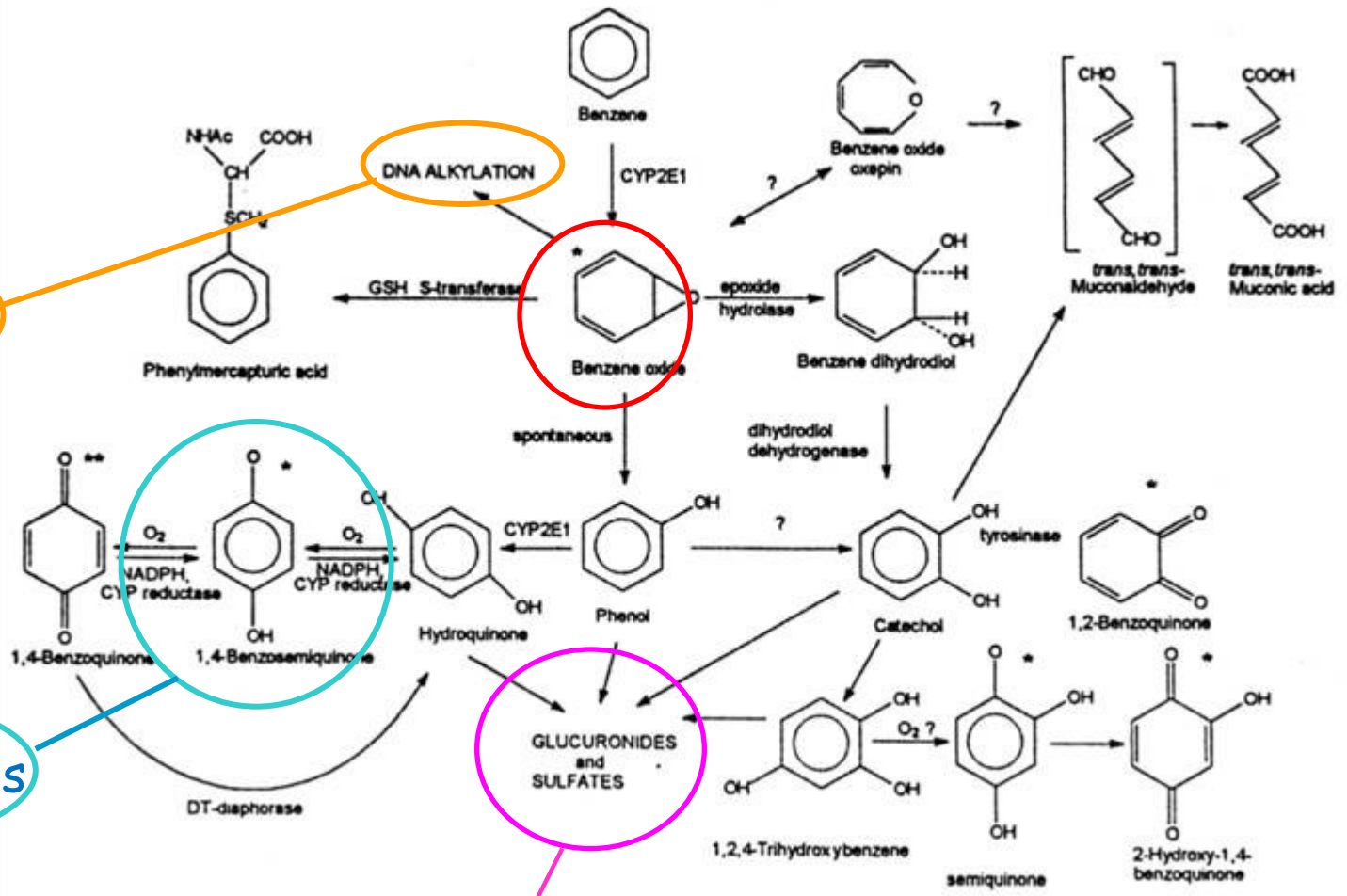
# MALONDIALDEHYD - TYPICKÝ PRODUKT PEROXIDACE LIPIDŮ TVOŘÍ ADUKTY S DNA



# Metabolická aktivace, detoxikace a toxické efekty benzenu

metabolic activation

mutagenicity

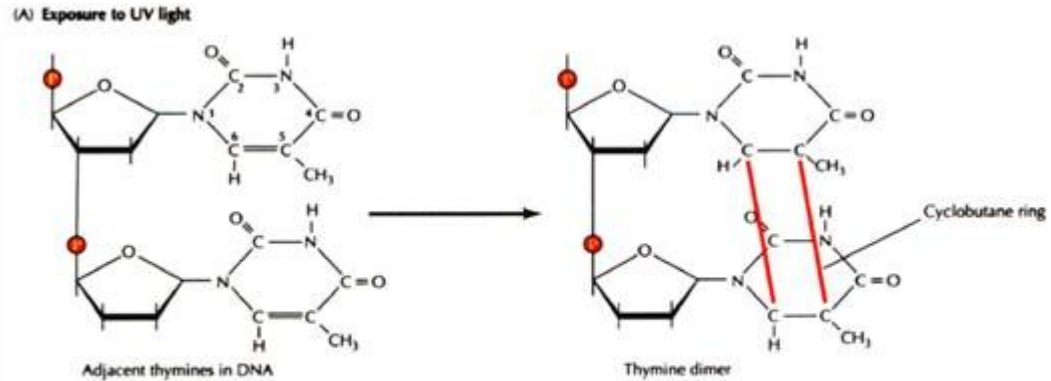


oxidative stress

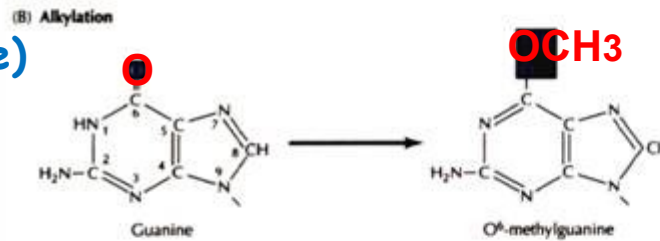
detoxification

# HLAVNÍ TYPY POŠKOZENÍ DNA

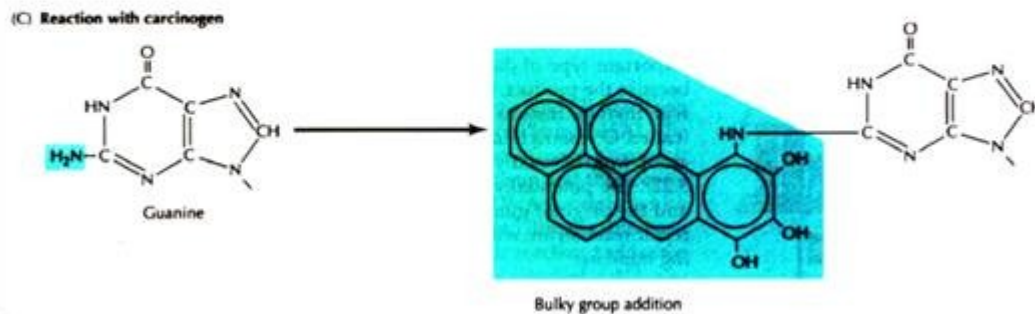
UV záření:  
dimerizace



Alkylace (methylace)  
= O  $\longrightarrow$  -OCH<sub>3</sub>

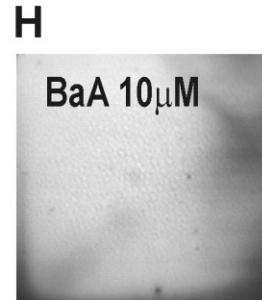
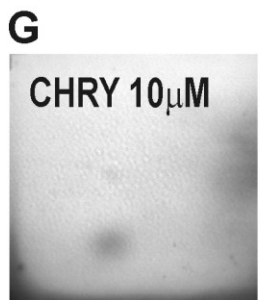
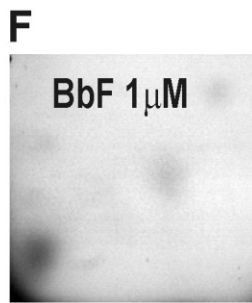
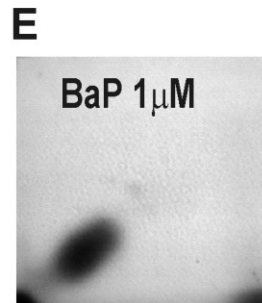
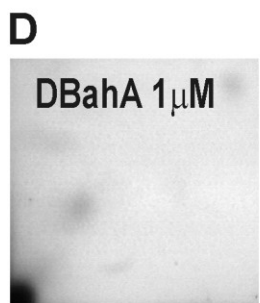
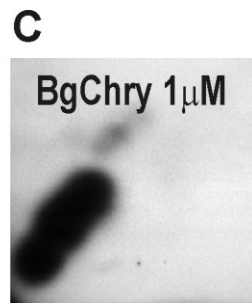
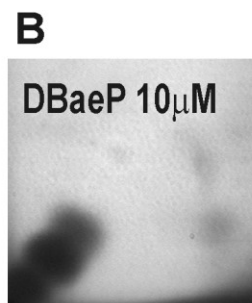
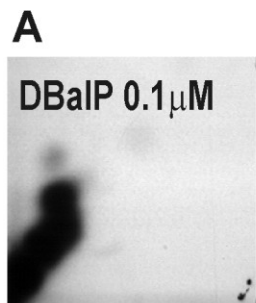


Vznik objemných  
aduktů  
("bulky adducts")



Oxidativní poškození  
DNA - viz dále

# GENOTOXICKÉ EFEKTY PAHs: detekce stabilních aduktů DNA s metabolity PAHs



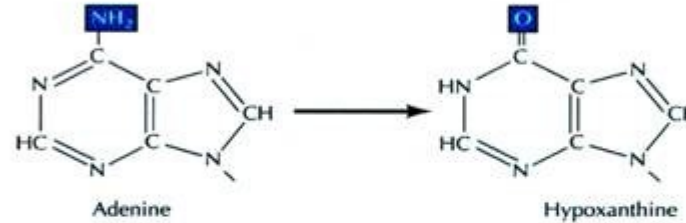
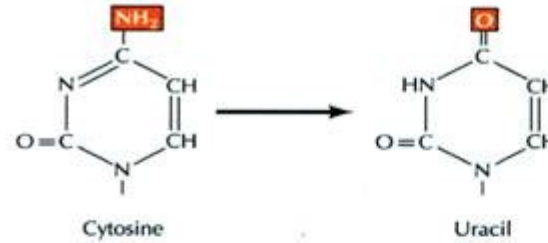
Metoda  $^{32}\text{P}$ -postlabeling:  
expozice buněk, izolace DNA,  
digesce a značení  $^{32}\text{P}$ , TLC,  
detekce radioakt. fosforu

DBaIP, DBaeP, BgChry, BaP –  
silně genotoxické PAHs;  
DBahA, BbF, Chry, BaA –  
převážně negenotoxické efekty  
(aktivace AhR atd.)

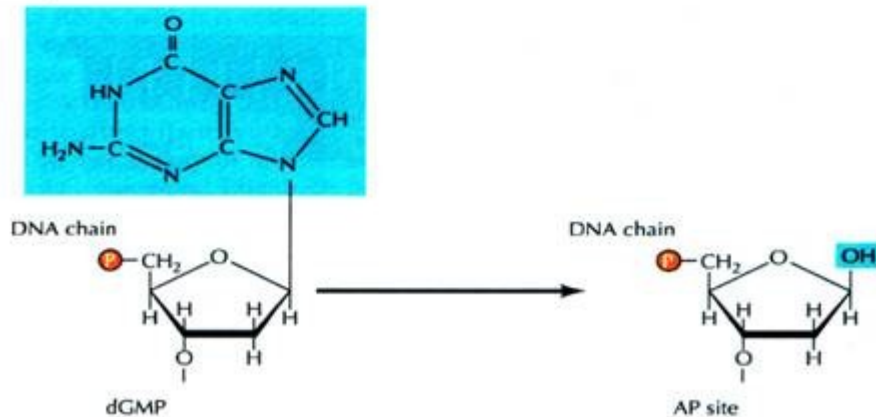
# HLAVNÍ TYPY OXID. POŠKOZENÍ DNA ("apurinic sites")

Oxidativní deaminace

(A) Deamination

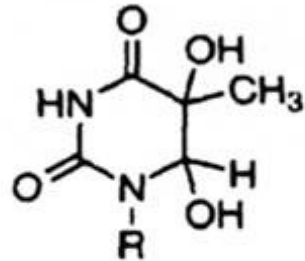


(B) Depurination

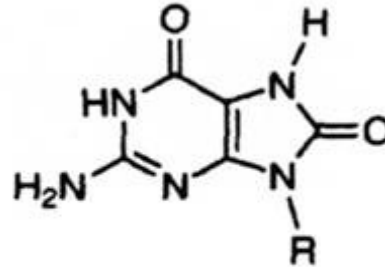


Depurinace (nestabilní modifikované nukleotidy)

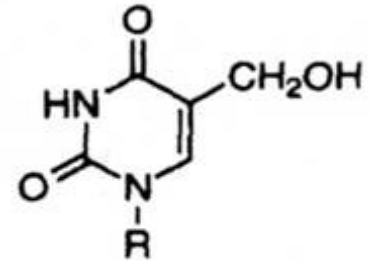
# PRODUKTY OXIDATIVNÍHO POŠKOZENÍ DNA



thymine glycol

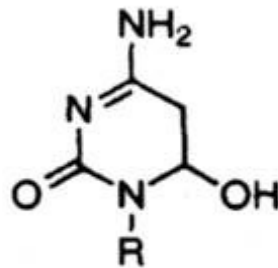


8-oxo-dG

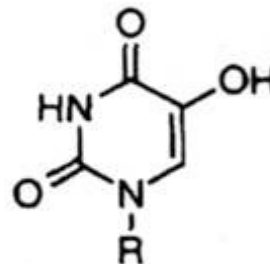


5-hydroxymethyluracil

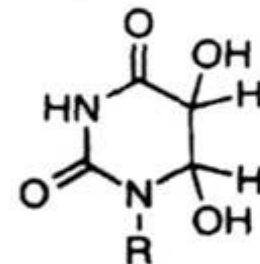
Biomarker  
oxidativního  
poškození  
DNA  
(stanovení  
HPLC)



6-hydroxy-5,6-dihydrocytosine



5-hydroxyuracil

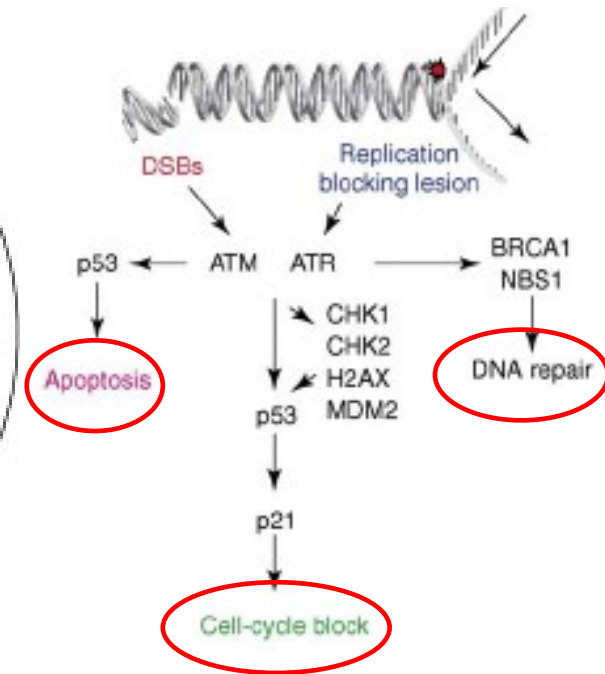
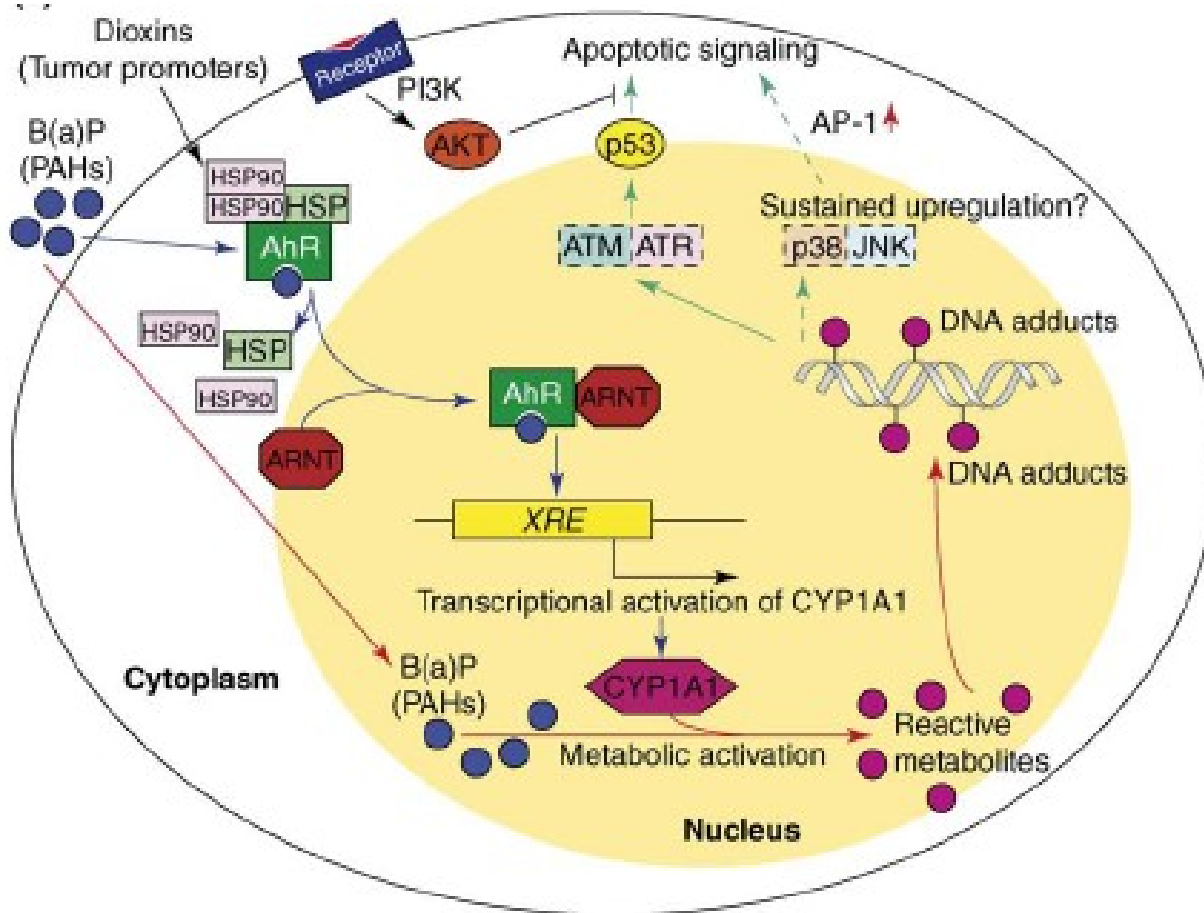


uracil glycol



# POSTGENOTOXICKÉ SIGNÁLY

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



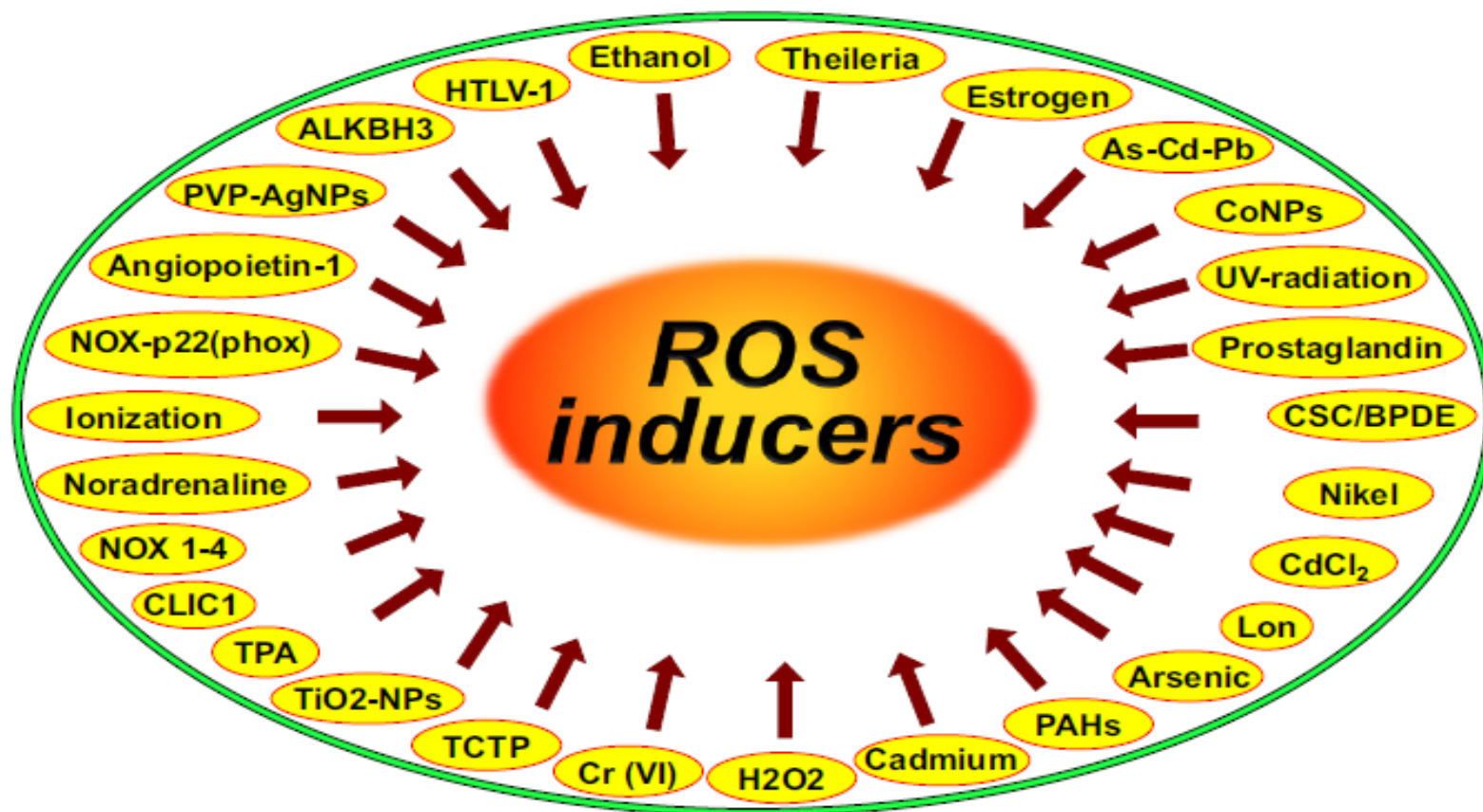
(podle Roos, Kaina, 2006)



# OXIDATIVNÍ STRES

# OXIDATIVNÍ STRES

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

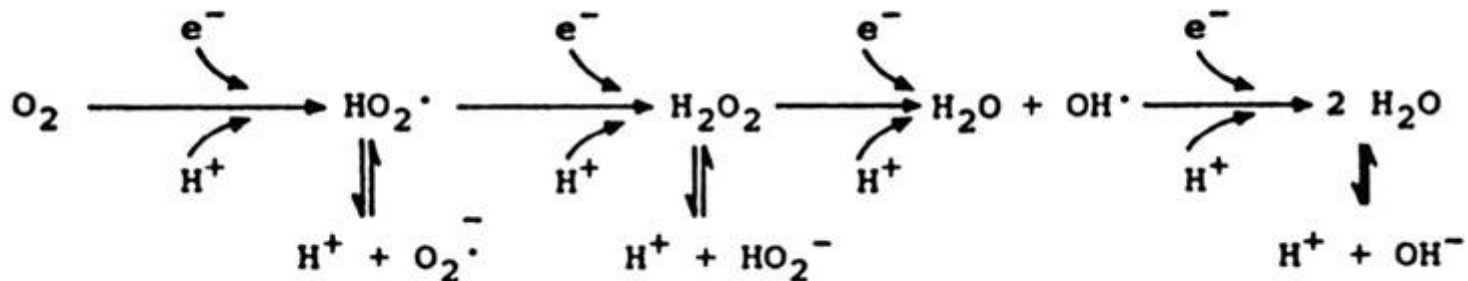


# REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU (ROS)

Superoxid

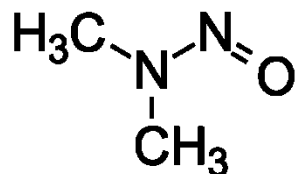
Peroxid

Hydroxylový radikál



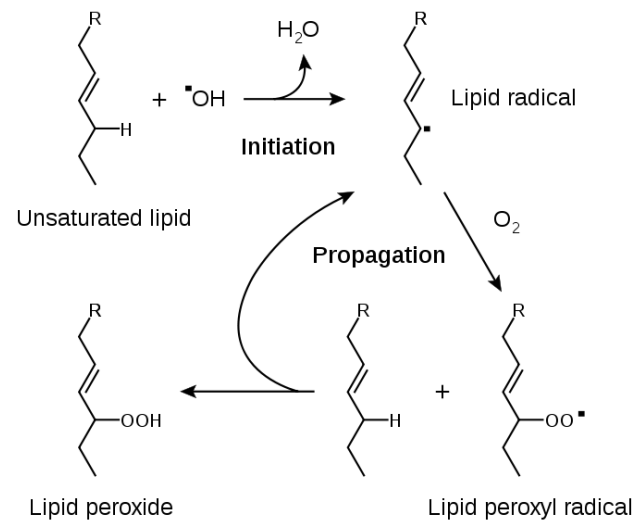
## REAKTIVNÍ SLOUČENINY NEBO INTERMEDIÁTY XENOBITIK

Nitrososloučeniny, semichinony aj.

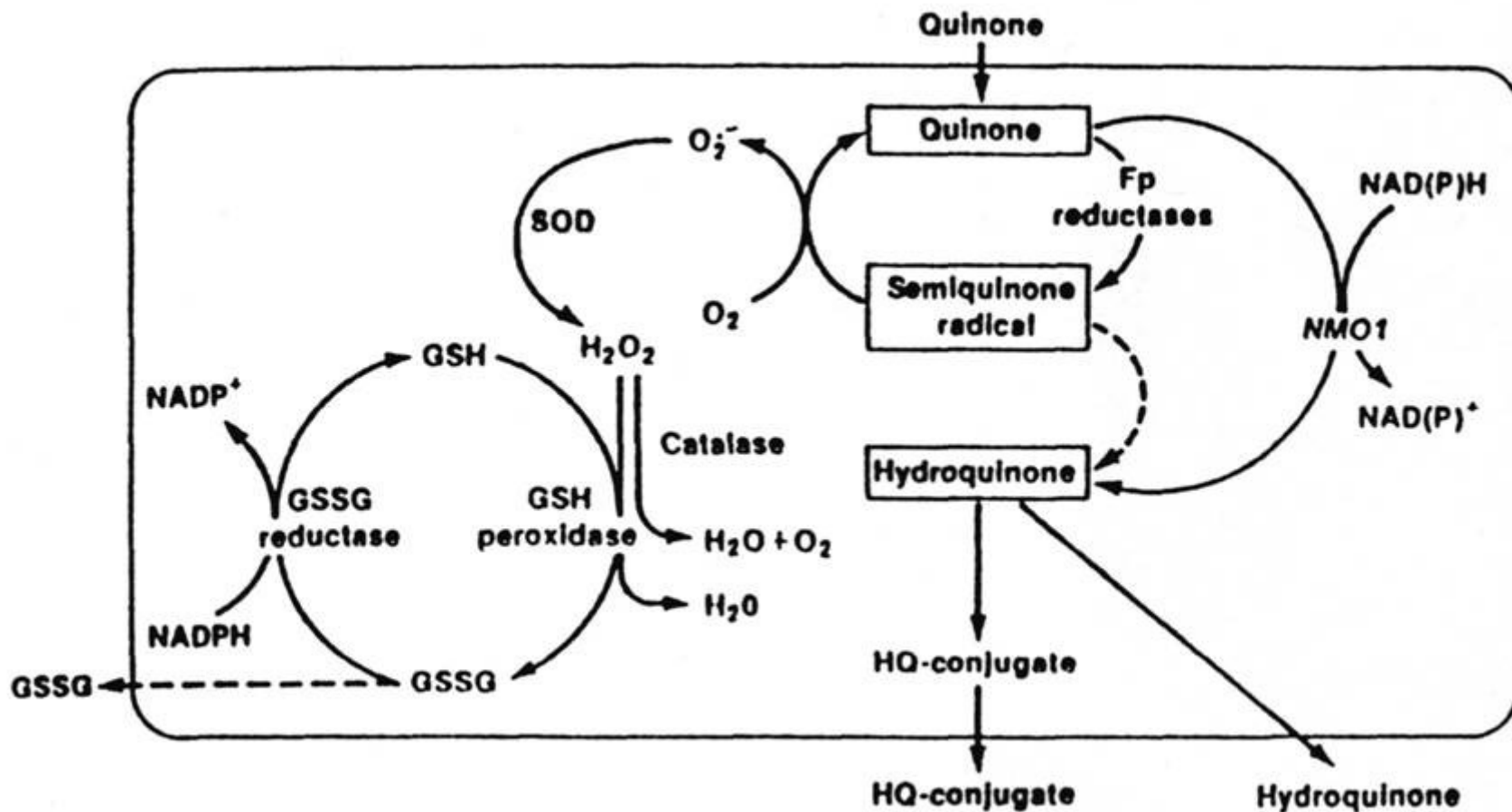


## REAKTIVNÍ INTERMEDIÁTY ENDOGEN. LÁTEK

Peroxidy membránových lipidů

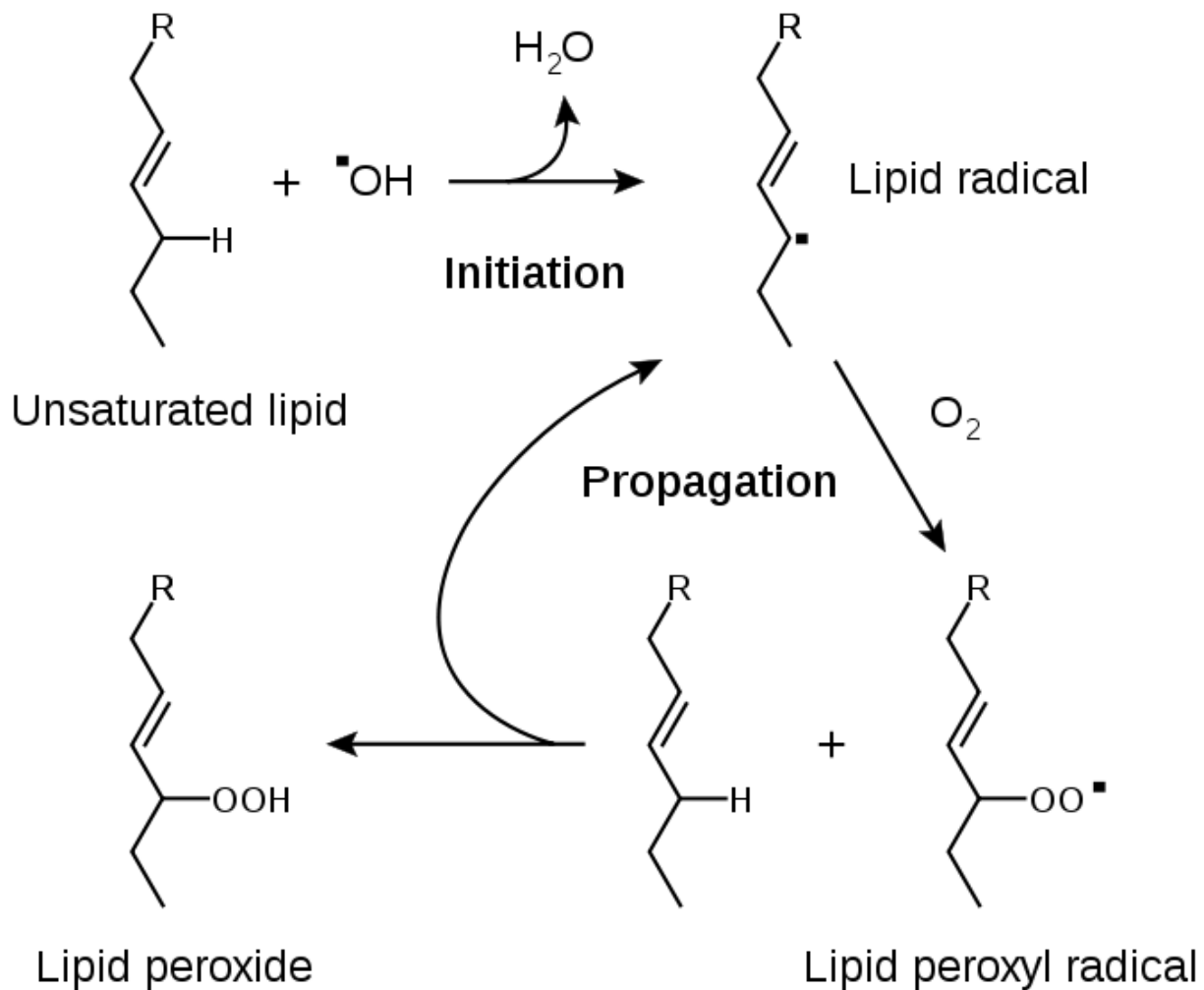


# REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU: redoxní cyklování chinonů / antioxidační enzymy



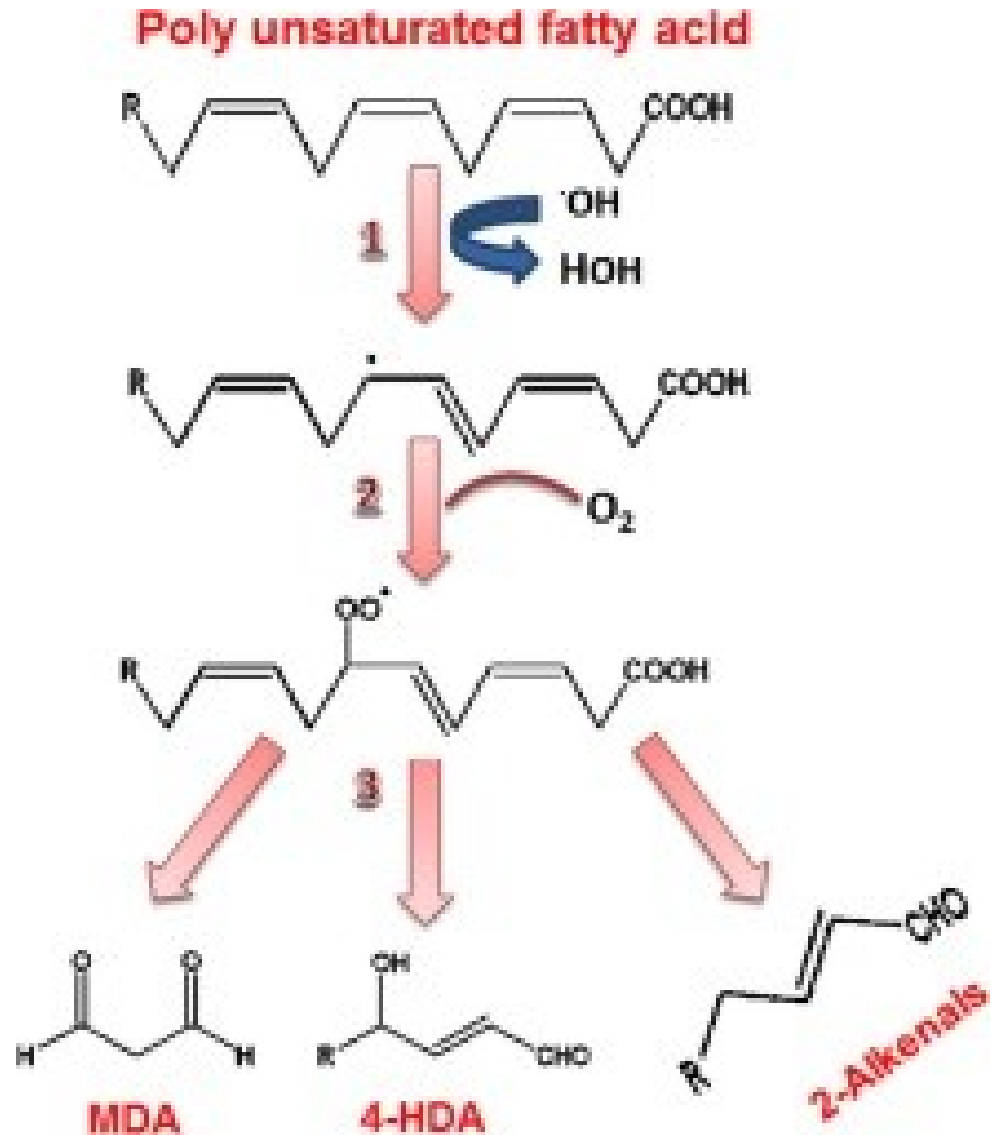
# PEROXIDACE LIPIDŮ

vznik peroxidů  
lipidů a LP cyklování  
(„propagace“)



# PEROXIDACE LIPIDŮ

Produkty lipidní  
peroxidace

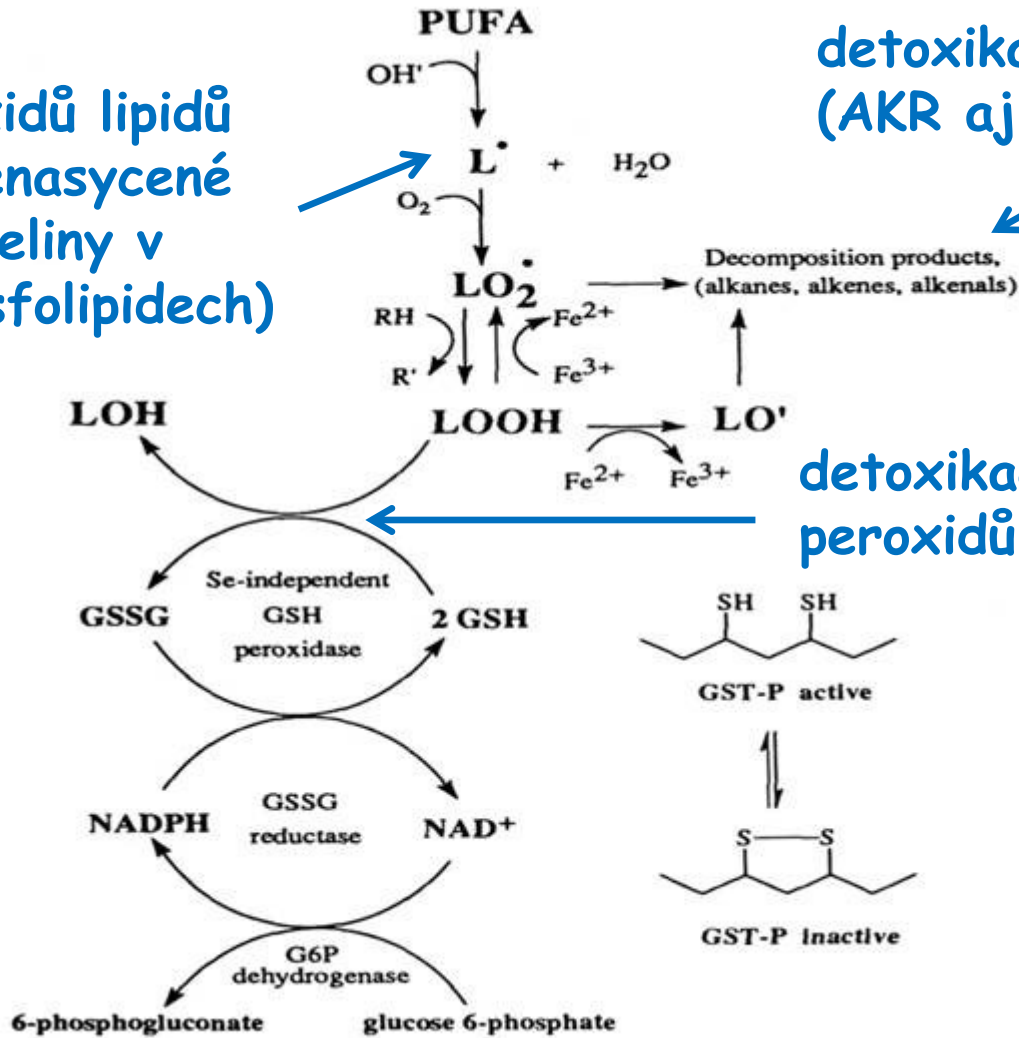




# PEROXIDACE LIPIDŮ

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

detoxikace aldehydů  
(AKR aj. reduktázami)

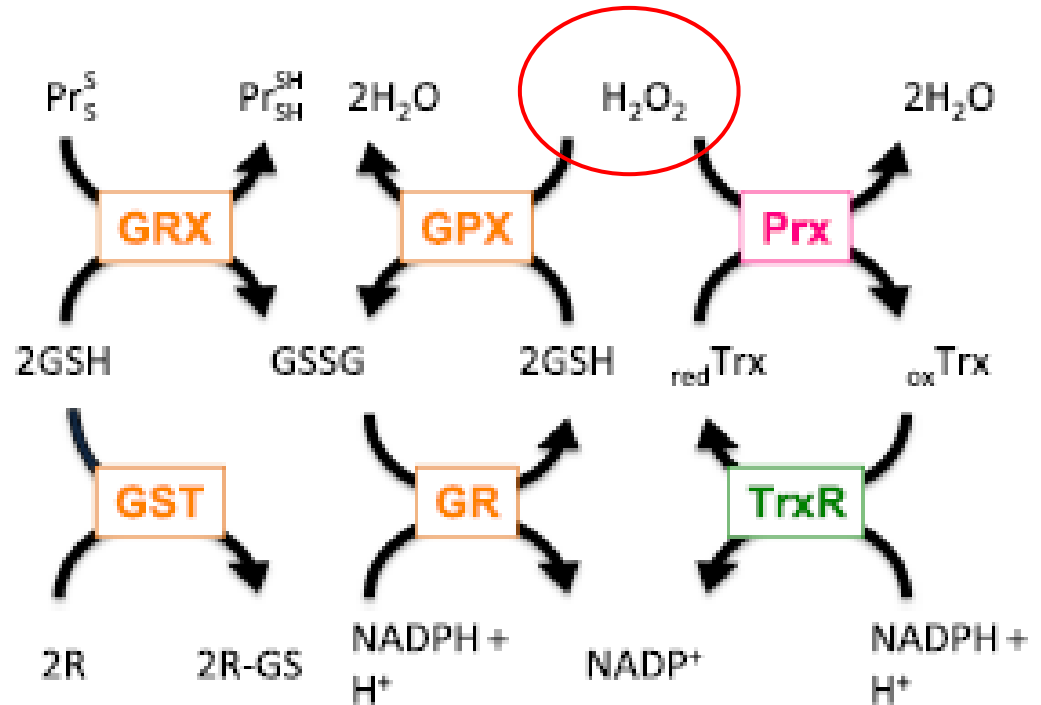


detoxikace org. hydro-  
peroxidů (GPx)

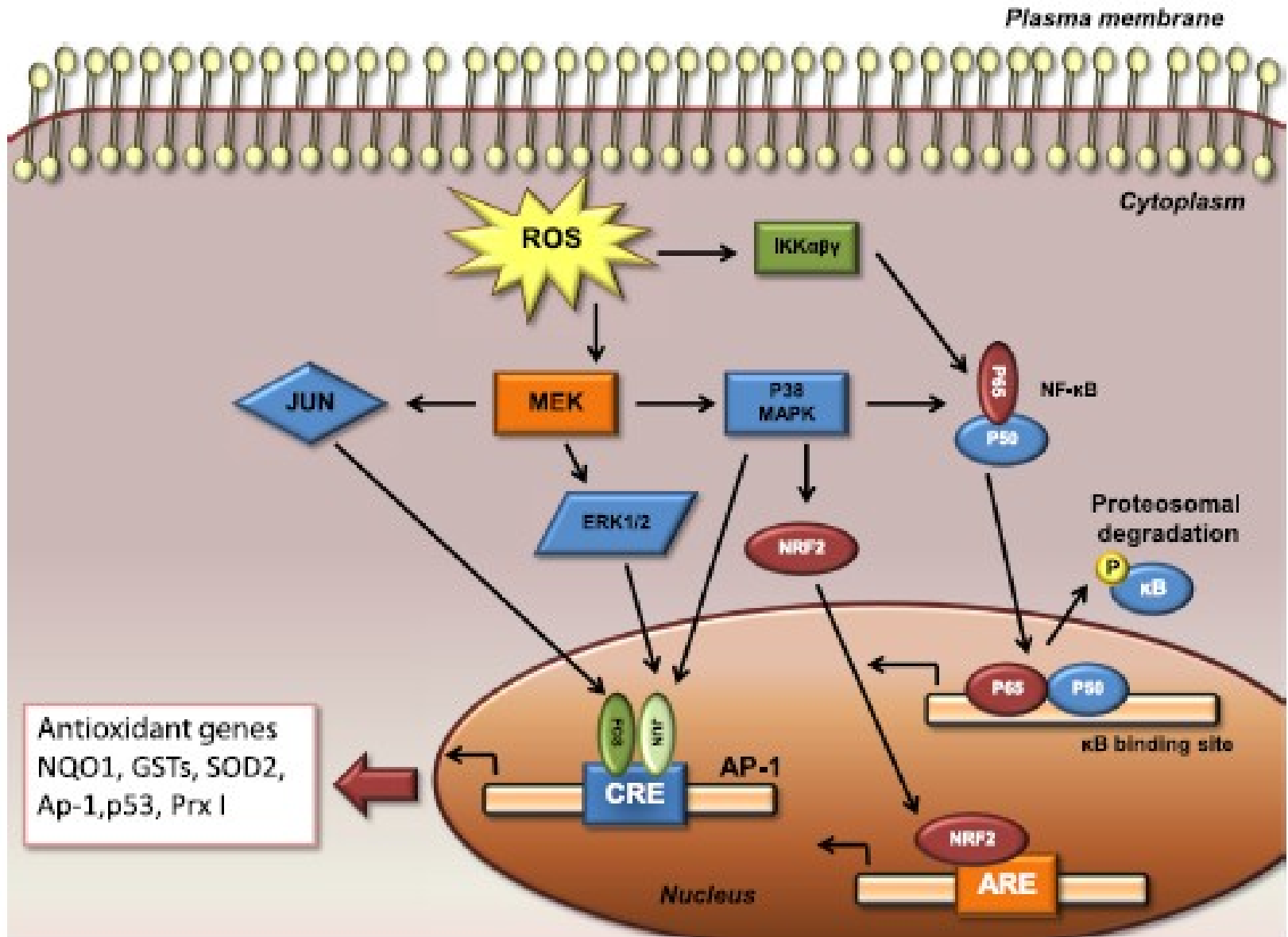
# PŘEHLED ANTIOXIDAČNÍCH SYSTÉMŮ

Centrální role glutathionu  
glutaredoxin (GRX)  
glutathionreduktáza (GR)

Další antioxidant -  
peroxiredoxin (Prx) je  
recyklován pomocí  
thioredoxinu (Trx),  
oxidovaný stav Trx je  
redukován  
thioreduxinreduktázou  
(TrxR)

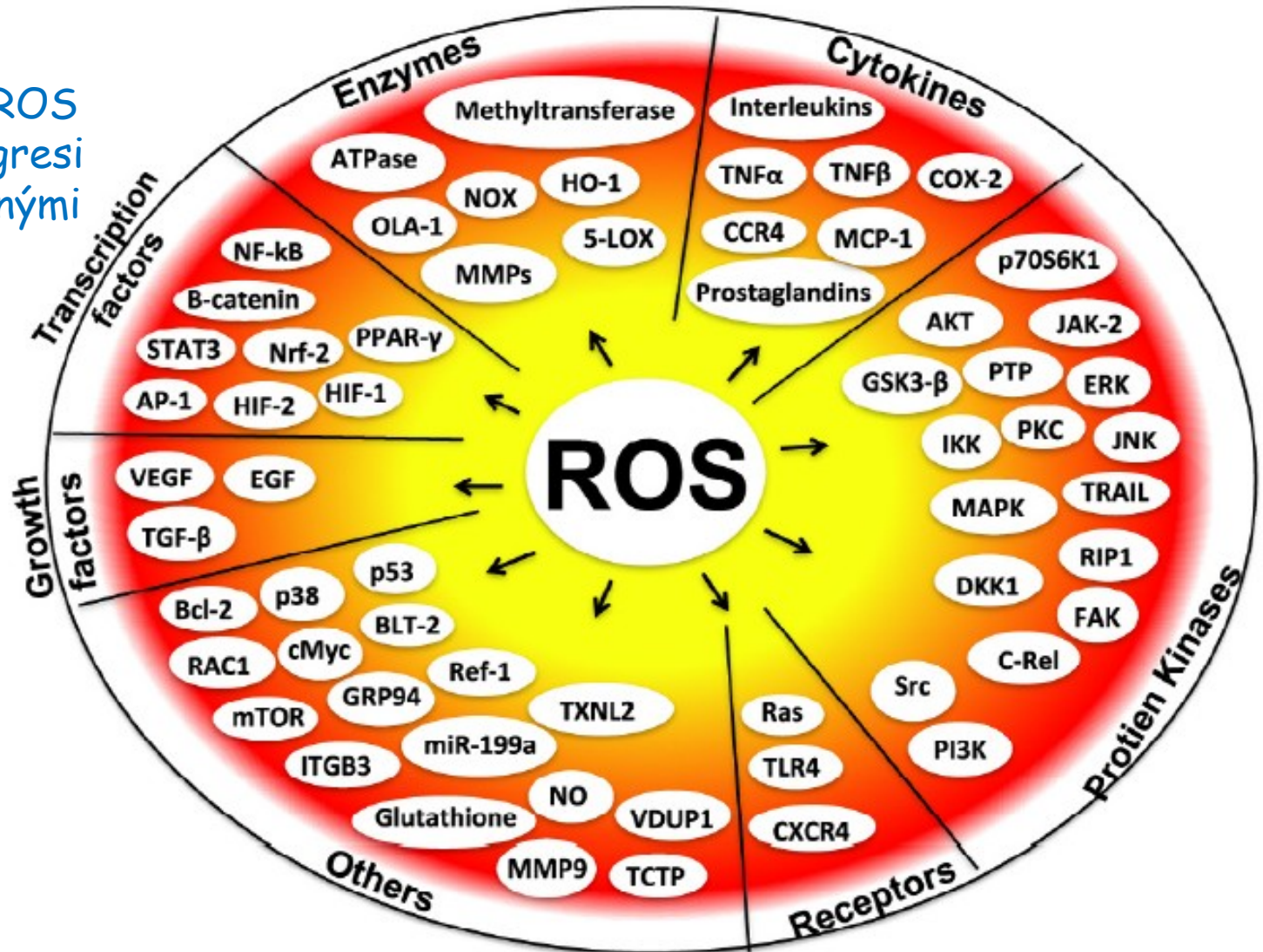


# DŮSLEDKY OXIDATIVNÍHO STRESU



# DŮSLEDKY OXIDATIVNÍHO STRESU

vys. hladiny ROS působí v progresi rakoviny různými mechanismy



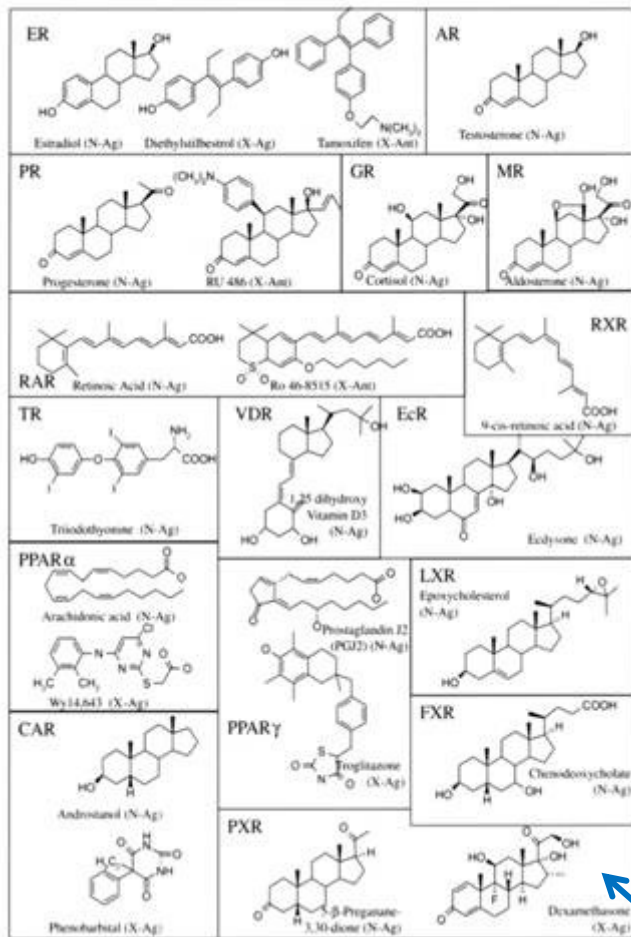
# ENDOKRINNÍ DISRUPCE

# 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)

# NUKLEÁRNÍ RECEPTORY - KLASIFIKACE

Nuclear Hormone Receptors

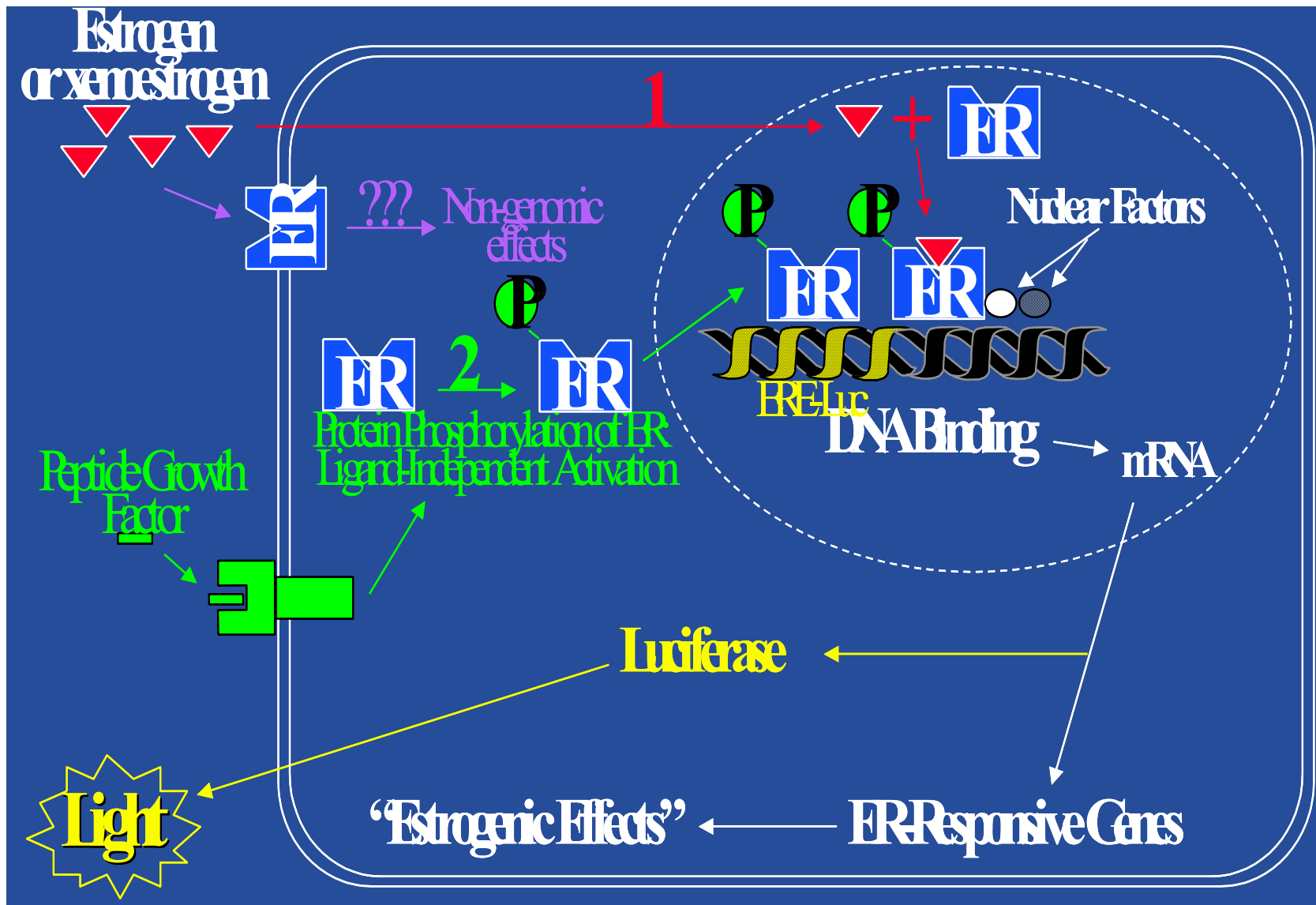


	Endocrine Receptors	Adopted Orphan Receptors	Orphan Receptors
Ligands:	High-affinity, hormonal lipids	Low-affinity, dietary lipids	Unknown
	<div style="background-color: #000080; color: white; padding: 5px;">                     ER <math>\alpha, \beta</math>                      PR                      AR                      GR                      MR                 </div> <div style="background-color: #800080; color: white; padding: 5px;">                     RAR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>                      TR <math>\alpha, \beta</math>                      VDR                      EcR                 </div>	<div style="background-color: #FF0000; color: white; padding: 5px;">                     RXR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>                      PPAR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>                      LXR <math>\alpha, \beta</math>                      FXR                      PXR/SXR                      CAR                 </div>	<div style="background-color: #000000; color: white; padding: 5px;">                     SF-1                      LRH-1                      DAX-1                      SHP                      TLX                      PNR                      NGFI-B <math>\alpha, \beta, \gamma</math>                      ROR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>                      ERR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>                      RVR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>                      GCNF                      TR 2,4                      HNF-4                      COUP-TF <math>\alpha, \beta, \gamma</math> </div>

Ligandy (agonisté) jaderných receptorů



# Stanovení estrogenní/antiestrogenní aktivity (aktivace ER-závislé genové exprese měřena jako luciferázová aktivita)

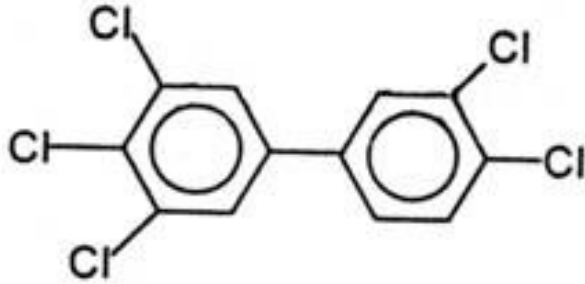




# AKTIVACE AhR A NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ

- 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 $\gamma$  - obesogeny (tributyltin, bisfenol A, alkylftaláty) - několik mechanismů, např. disrupce metabolismu lipidů a ukládání tuku (PPAR $\gamma$  zvyšuje biosyntézu lipidů); diferenciaci preadipocytů na adipocyty; v mozku deregulace apetitu - „central balance of energy“ (např. receptory neurotransmiterů)

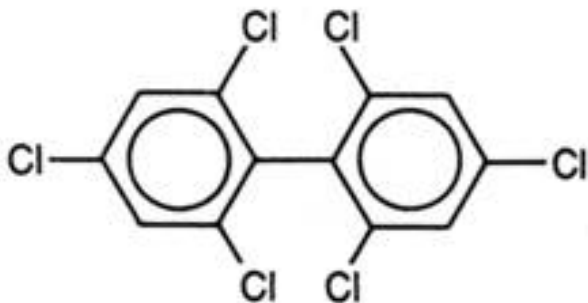
# PCB jako endokrinní disruptory (příklad působení cizorodých látek více mechanismy)



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);
- antiestrogenita: zvýšená hydroxylace (= inaktivace) estradiolu indukovanými CYP1



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

Nekoplanární PCB:

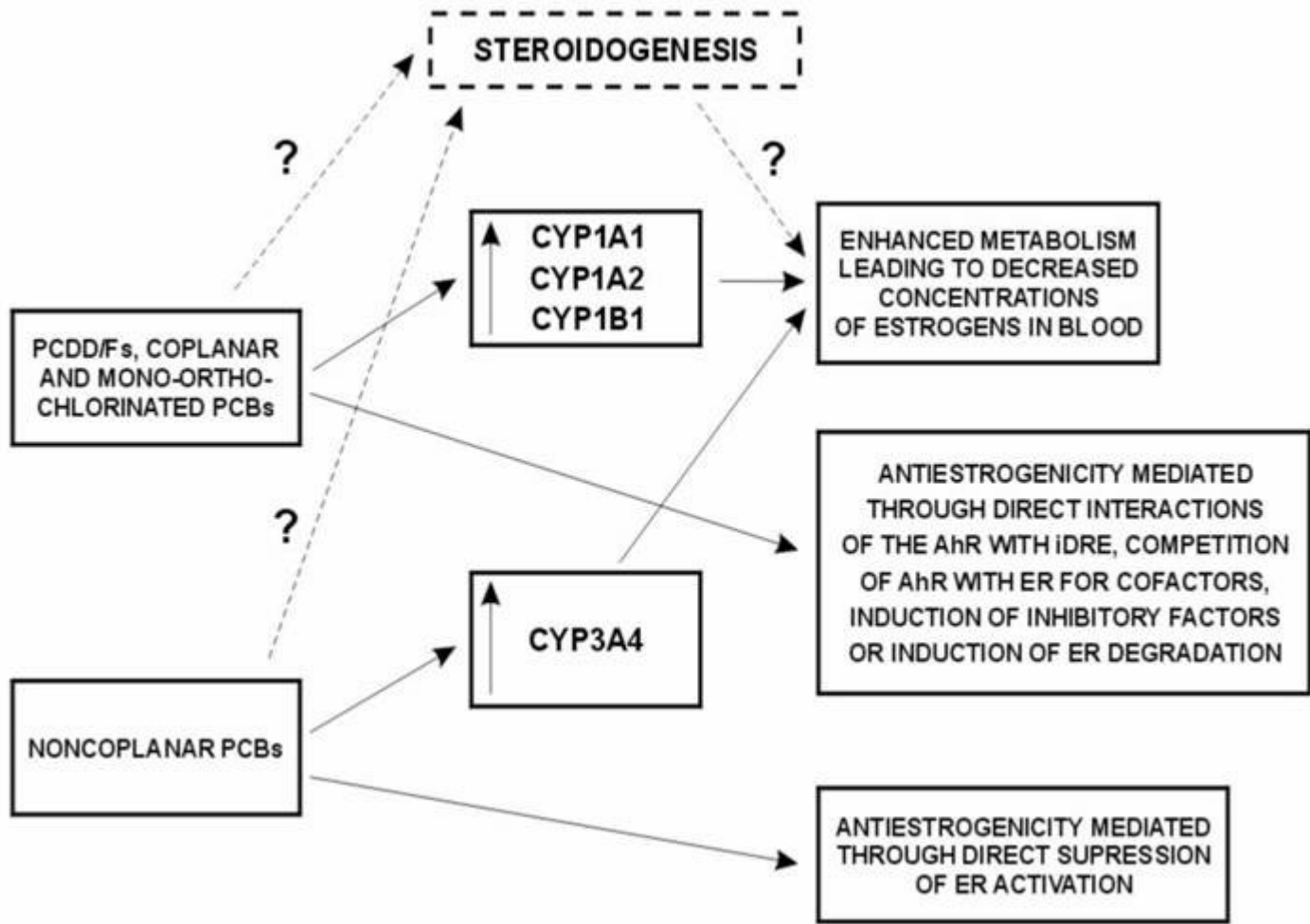
- nízkomolekulární kongenery mají estrogení aktivitu (aktivace ER);
- výšechlorované PCB jsou antiestrogení a antiandrogení (ER, AR);
- vazba na thyroid-binding protein;
- vazba na RyR (disrupce Ca<sup>2+</sup> signálování = neurotoxicita, neurodevelopment. toxicita)

# Komplexní směs PCB - antiestrogenita

vliv na biosyntézu?

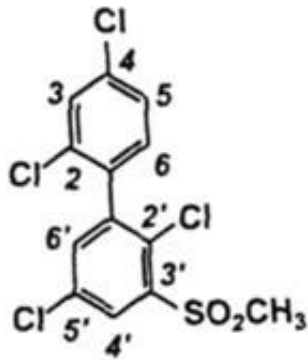
zvýšení metabolismu E2 = inaktivace hormonu

aktivace/ suprese ER

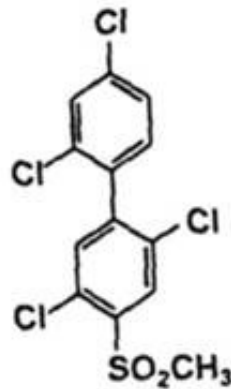


# METABOLITY POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ (PCB) po 2. fázi biotransformace

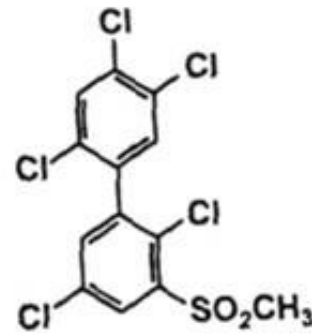
Methylsulfonyl-PCB zůstávají jako relativně lipofilní rezidua v tkáních – také toxicky významné endokrinní disruptory – např. vazba na GR, modulace 2. fáze metabolismu estradiolu aj. efekty



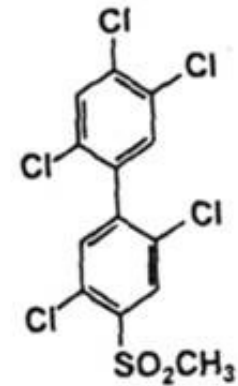
3'-MeSO<sub>2</sub>-2,2',4,5'-tetrachlorobiphenyl  
(3'-MeSO<sub>2</sub>-CB49)



4'-MeSO<sub>2</sub>-2,2',4,5'-tetrachlorobiphenyl  
(4'-MeSO<sub>2</sub>-CB49)



3'-MeSO<sub>2</sub>-2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl  
(3'-MeSO<sub>2</sub>-CB101)



4'-MeSO<sub>2</sub>-2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl  
(4'-MeSO<sub>2</sub>-CB101)

# Stanovení dioxinové toxicity v transgenním rybím modelu (zebrafish)



exprese zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) v přítomnosti dioxinových sloučenin (exprese GFP závislá na aktivaci AhR dioxiny a PAHs)