



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Účinky toxických látek 1 - Molekulární mechanismy -

Luděk Bláha, PŘF MU

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Co by si měl student odnést z této přednášky?

- Chápat a dokázat vysvětlit základní pojmy toxikodynamiky
 - receptor, interakce, afinita, účinnost
- Vysvětlit molekulární principy interakcí mezi toxickými látkami a cílovými místy (receptory)
- Vysvětlit a popsat principy nescifického a specifického působení toxických látek
- Znat principy a příklady látek, které působí nejdůležitějšími mechanismy toxicity, tj.
 - narušení přirozené fluidity membrány
 - interakce látek s DNA
 - inhibice enzymových aktivit
 - narušení redox-potenciálu
 - narušení gradientů na membránách
 - kompetice se substráty / přirozenými ligandy
- Poznat ve struktuře vybraných modelových látek strukturní znaky, které jsou odpovědné za konkrétní mechanismy působení

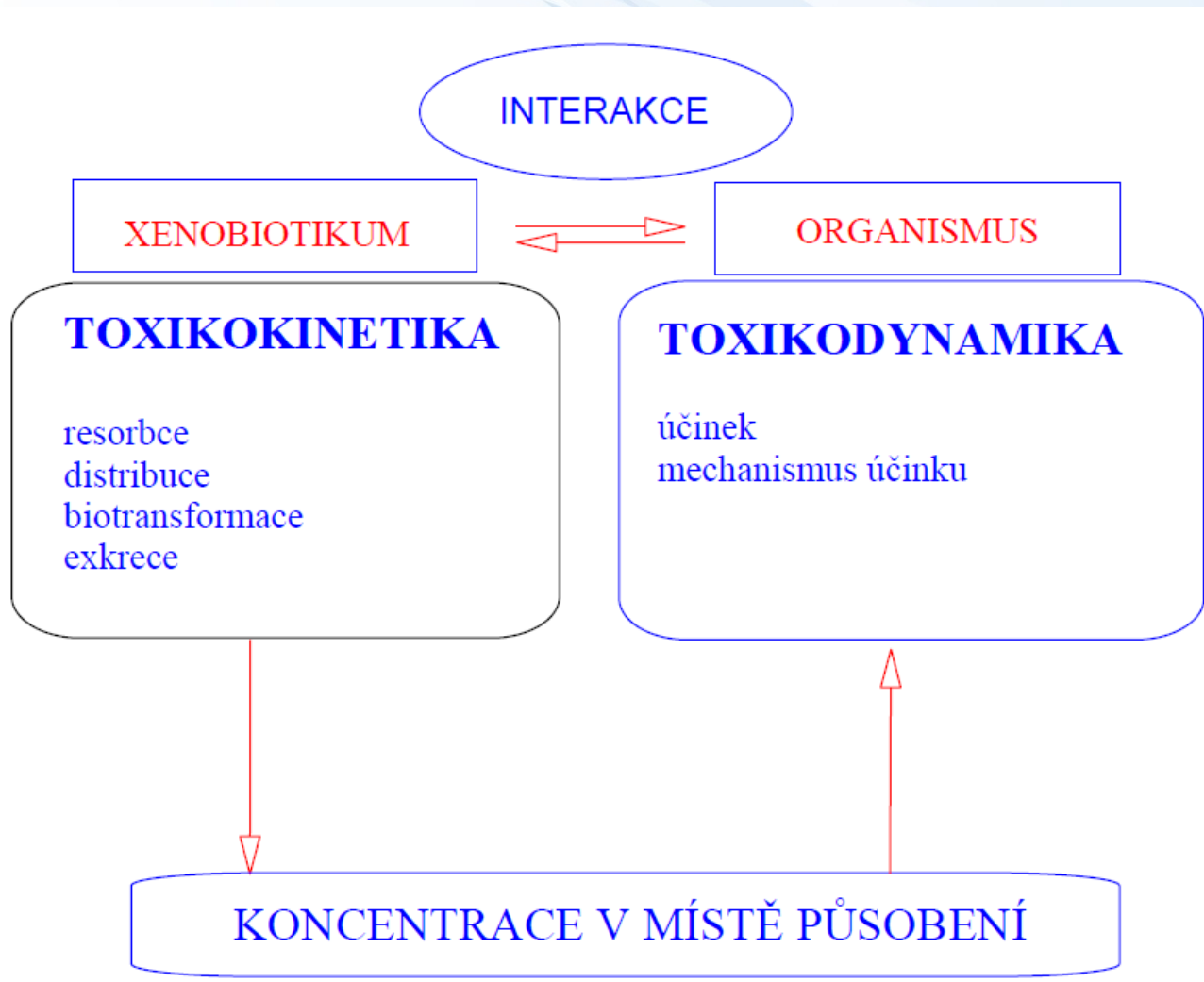


TOXIKODYNAMIKA

- základní principy -



Vztah mezi toxikokinetikou a toxikodynamikou



Toxikodynamika

vychází z propracované „farmakodynamiky“ a přejímá její koncepty popisuje procesy na molekulární úrovni

V místě kontaktu toxikantu s cílovým místem („receptorem“) dochází k interakci **toxikant-receptor**

Interakce mezi dvěma chemickými látkami

Ilustrace – příklady funkcí proteinů (jen membránové)

Cílové struktury = základní makromolekuly:

Proteiny

STRUKTURNÍ (tubulin apod.)

ENZYMY

TRANSPORTÉRY (v membráně, hemoglobin)

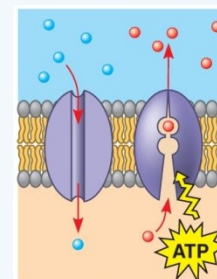
PROTEINOVÉ RECEPTORY

(v membráně i v cytoplasmě)

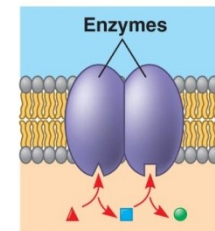
Nukleové kyseliny

Fosfolipidy

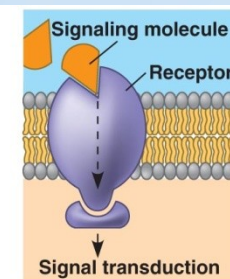
(Sacharidy – méně významné v ekotoxicitě)



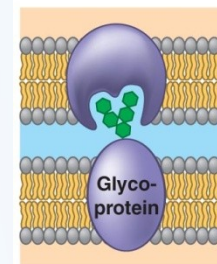
(a) Transport



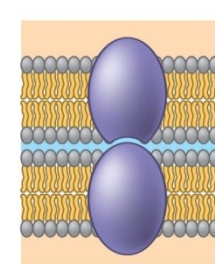
(b) Enzymatic activity



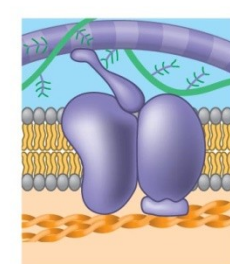
(c) Signal transduction



(d) Cell-cell recognition



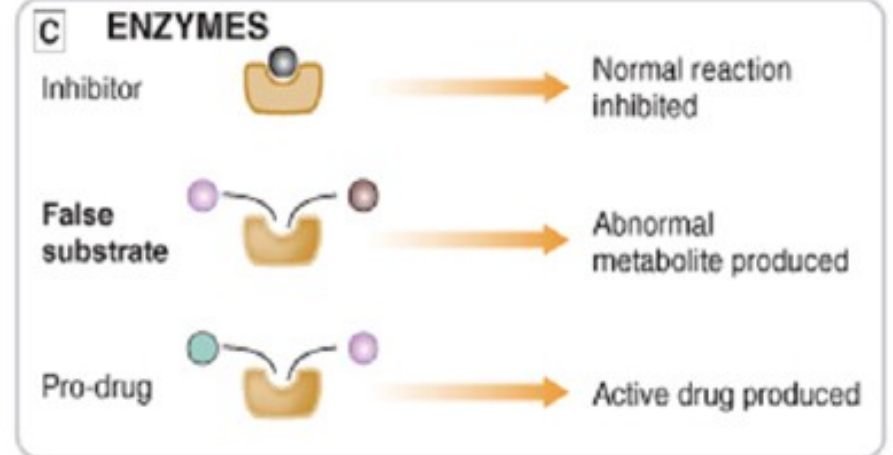
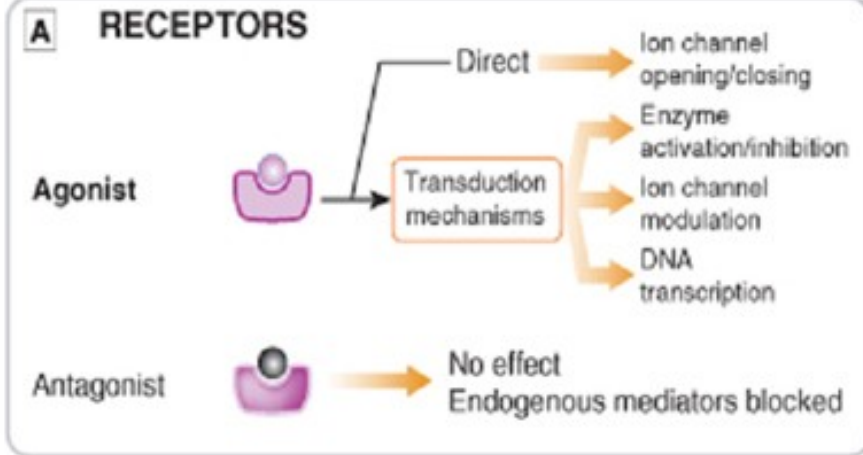
(e) Intercellular joining



(f) Attachment to the cytoskeleton and extracellular matrix (ECM)

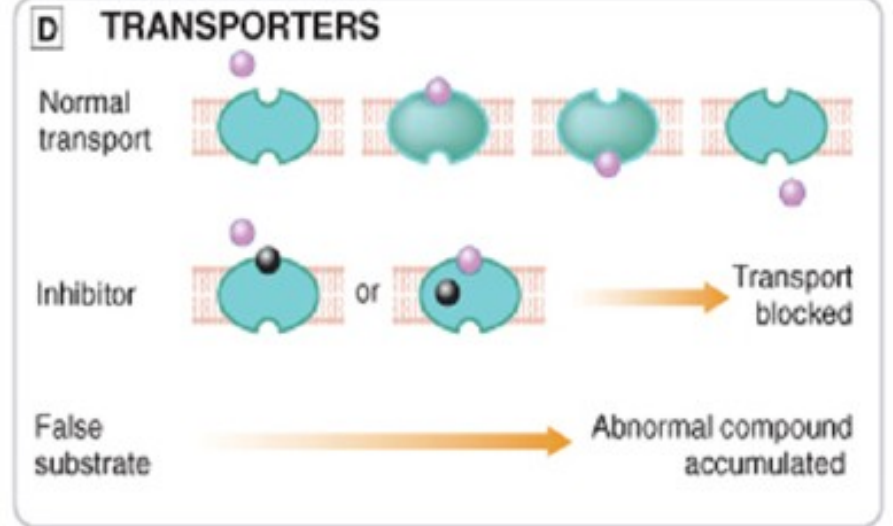
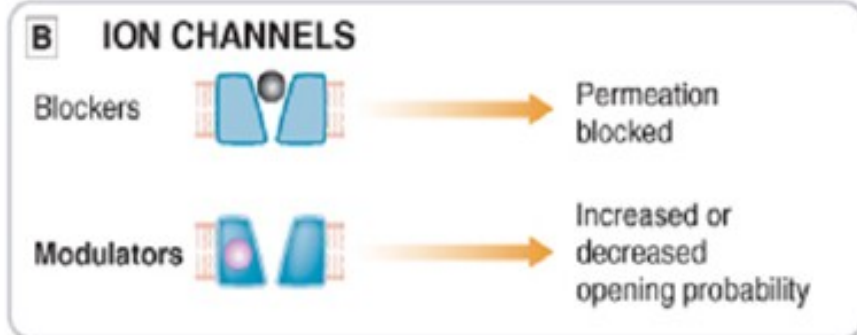


Interakce látek s proteiny: klíčové procesy



(eg beta blockers, 17α -ethinylestradiol)

(eg aspirin, ketoconazole)



(eg local anaesthetics, cypermethrin)

(eg fluoxetine, omeprazole)

● Agonist/normal substrate

● Abnormal product

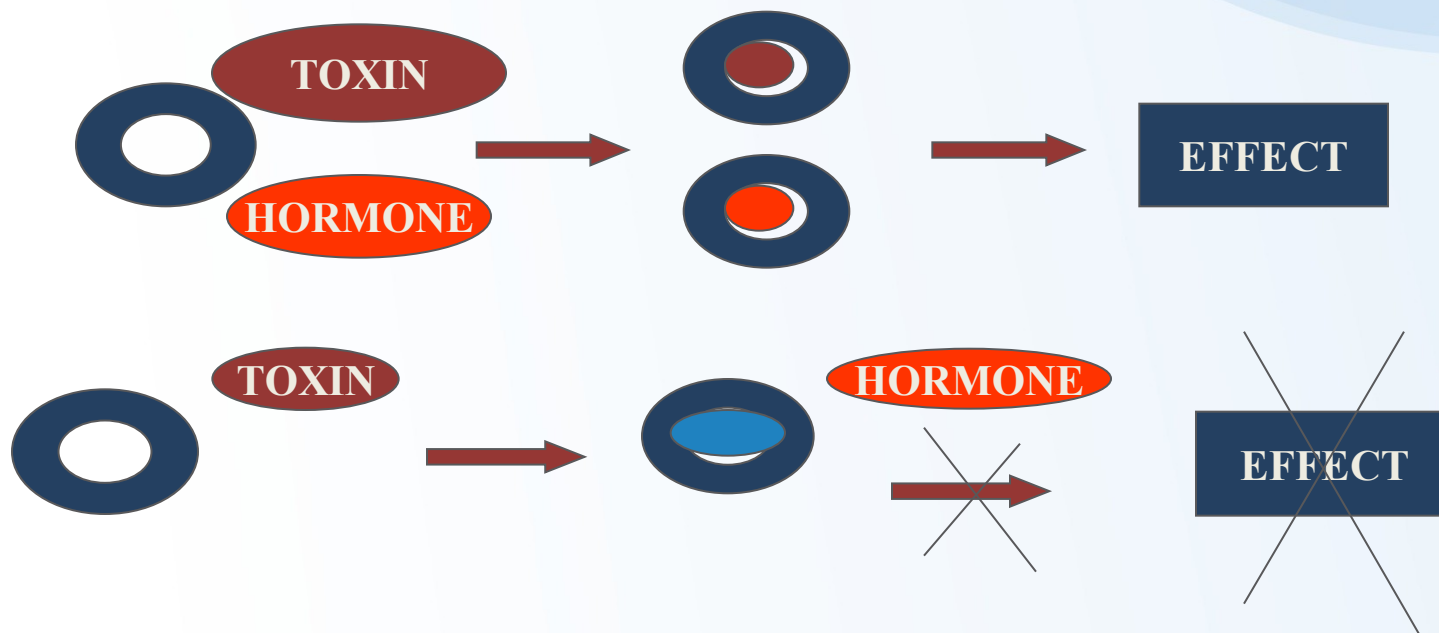
● Antagonist/inhibitor

● Pro-drug

Note – a few drugs target DNA rather than proteins (eg mitomycin C).

Interakce toxických látek s receptory

- interakce pozitivní → indukce odpovědi (**agonista**)
(nahrazuje efekt ligandu, mimic effect, **hormone-like effect**)
- interakce negativní → kompetice: nevyvolává reakci (**antagonista**)
(blokuje navázání a efekt přirozeného ligandu, **př. anti/estrogenita**)



Příklady cílových struktur

(receptor = jakákoliv biomolekula, kterou může ovlivnit toxikant)

- **buněčná membrána**

narkotická toxicita - dosažení takové koncentrace, že dochází k blokaci fluidity membrány a tím její funkce

- **acetylcholinesteráza**

enzym - inhibice v aktivním místě organofosfátovými pesticidy (substrate mimics)

- Arylhydrocarbon **receptor** (AhR), estrogení receptor (ER)

specifické mechanismy toxicity, xenoestrogenity

- další



Typy interakcí („vazby“) mezi toxikantem a receptorem

-nekovalentní (viz příklad na následujícím snímku)

vodíkové můstky

hydrofobní interakce

iontové interakce

van der Waalsovy interakce

(reverzibilní)

-kovalentní

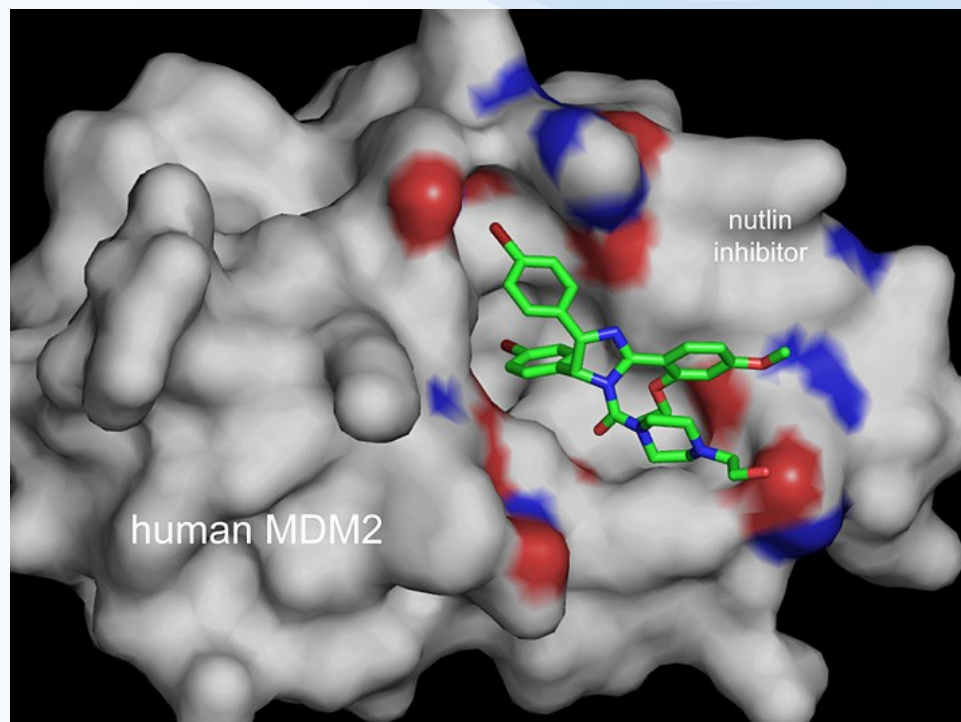
- *inhibice*

acetylcholinesterázy

organofosfátem...

- vazba látky na DNA

(zpravidla ireverzibilní)



Interakce mezi „receptory“ a malými molekulami (toxikanty)

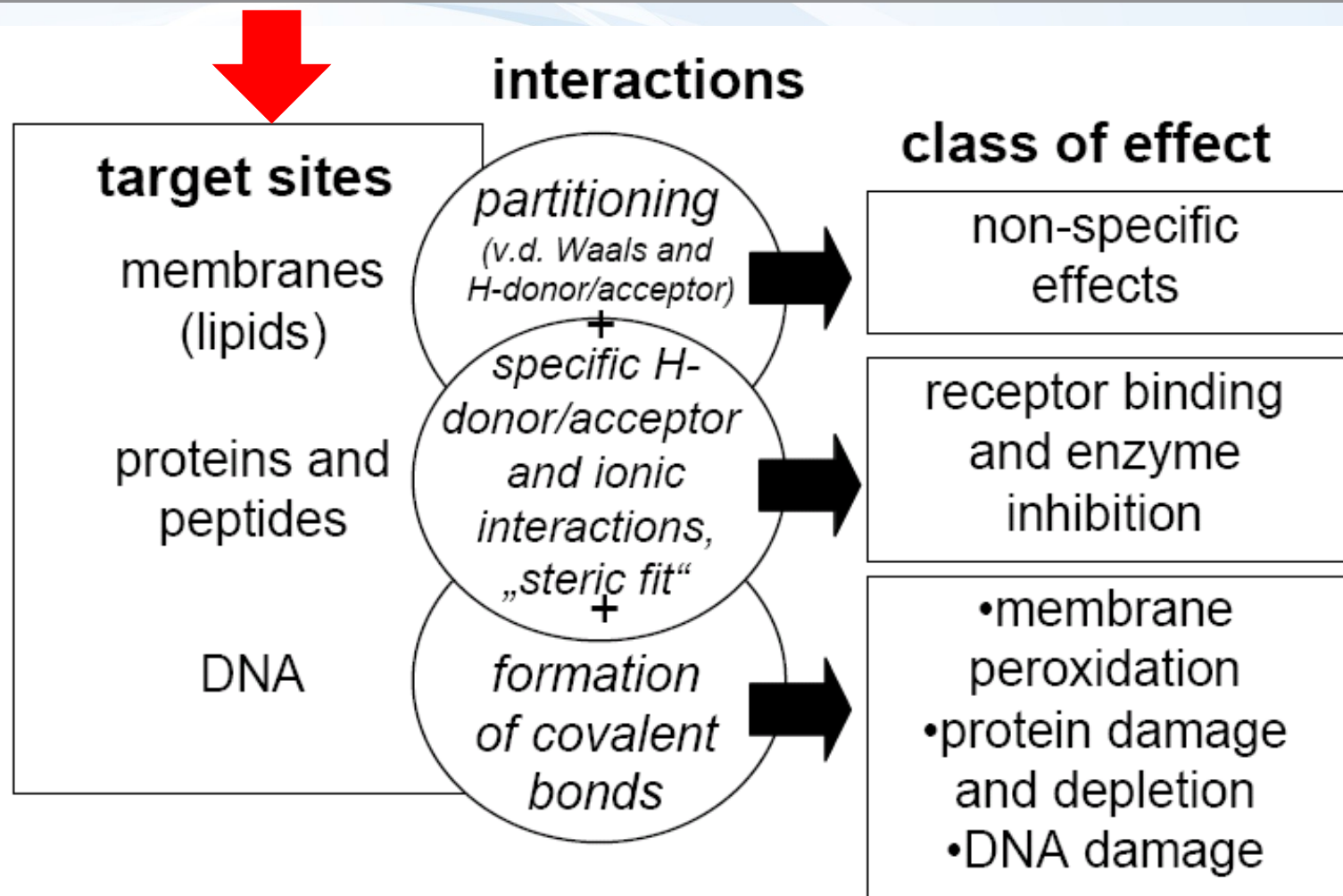
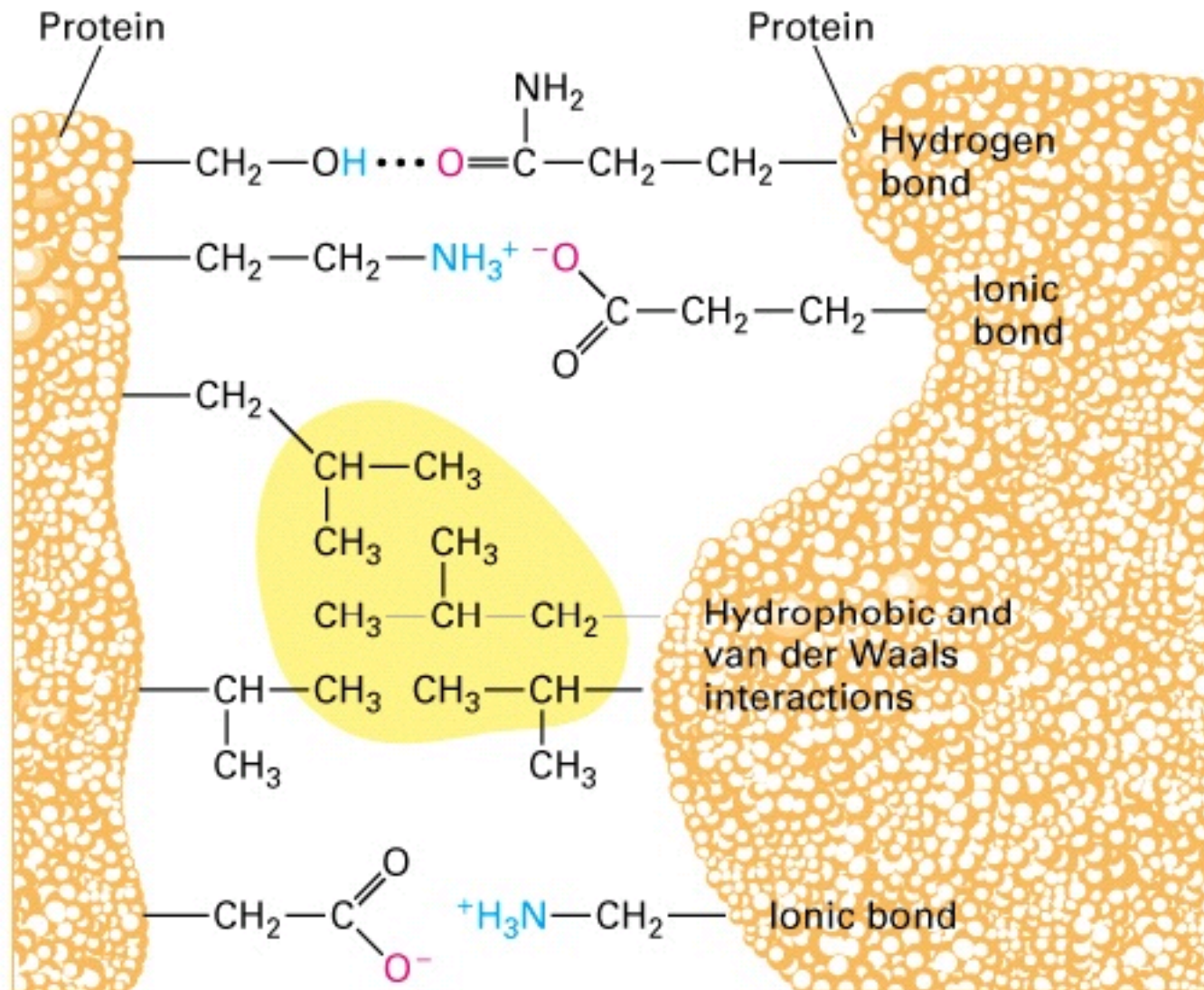


Figure 2 Rationale behind the classification of chemicals according to mechanism: target sites and type of interaction.



Typy interakcí mezi látkami

(příklad – interakce mezi proteiny)



Copyright (c) by W. H. Freeman and Company



Rychlost a síla interakce

Rychlost a síla interakce závisí na:

- koncentraci obou interagujících látek

(určující je zpravidla koncentrace toxikantu - ta je dána toxokinetikou)

→ **AFINITA** vazby „ligand-receptor“

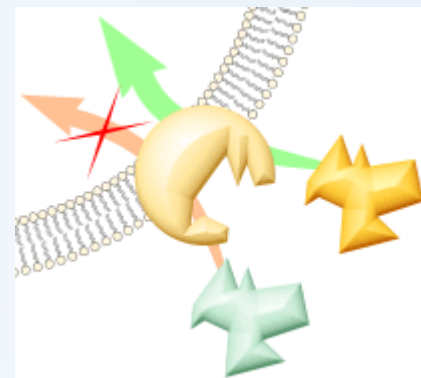
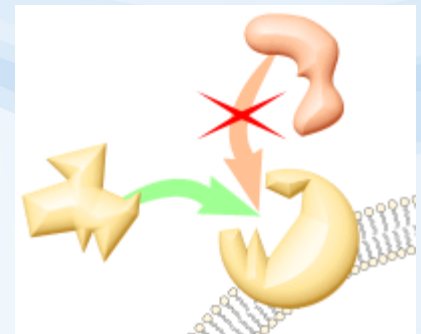
: Hodnocení - disociační konstanty:

K_d (pro účinné látky cca v rozmezí 10^{-8} M až 10^{-3} M)

(koncentrace která stačí k navázání z 50%
na příslušný receptor)

Afinita - vyjadřuje se často jako převrácená hodnota ($1/K_d$)

→ Toxicita (efekt) je pak dán schopností **ÚČINNOSTÍ (efficacy)**
látky vyvolat příslušný efekt



TOXIKODYNAMIKA - základní principy -

Jedná látka může reagovat s více „receptory“ !!!

Která interakce bude preferována (která se projeví toxicky) ?
Významné faktory

Koncentrace vs. rychlost toxického projevu interakce

*dioxin: vysoké dávky → akutní chlorakne, smrt,
nízké dávky, dlouhodobě → karcinogenita, imunosuprese ...*

Prostorové umístění a kontakt s receptory

embryo vs. dospělec

insekticid: vysoká dávka - akutní toxicita -> žábry / smrt

nízká dávka je distribuována v těle a působí chronicky -> imunotoxicita

Kd - jednotlivých interakcí

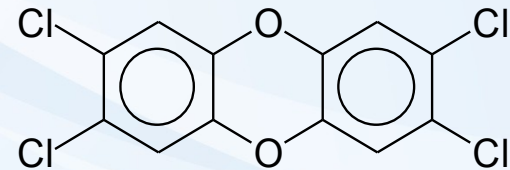
organofosfát: specifická inhibice AcChE, velmi nízké Kd

→ specifické působení



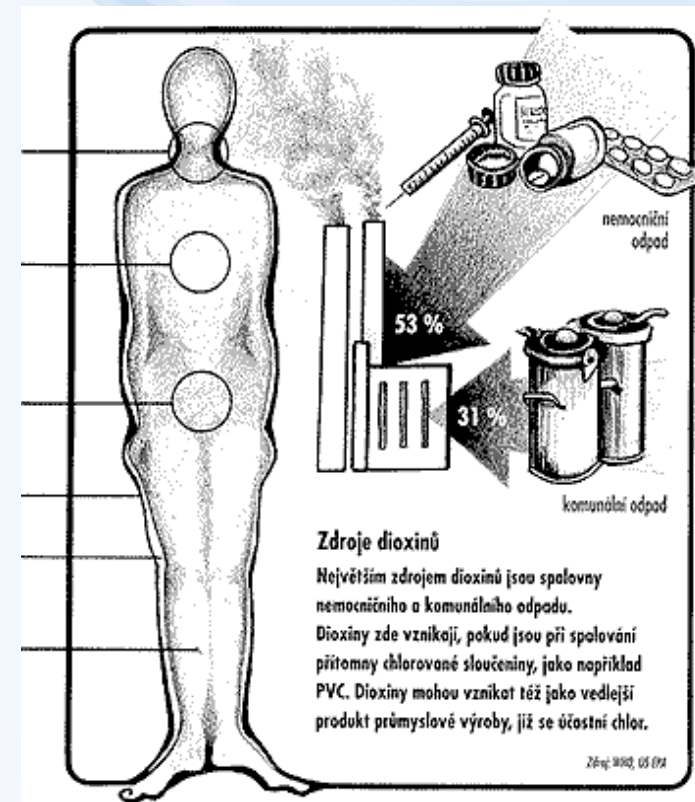
TOXIKODYNAMIKA - základní principy -

Látka může reagovat s více receptory !!!

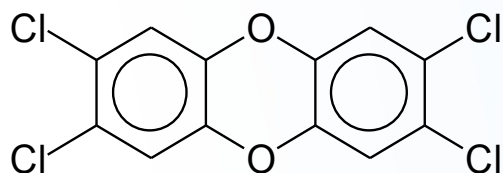


Příklad - 2,3,7,8-TCDD

- indukce AhR (thymus, játra K_d 10^{-12} - 10^{-15} M)
-> nádor/měsíce – roky (karcinogenita, imunotoxicita)
- indukce estrogenity (pohlavní orgány K_d 10^{-9} - 10^{-12} M)
-> reprodukční poruchy/měsíce - roky
- narkotická toxicita (10^{-6} M)
-> akutní rychlá intoxikace



Akutní (!) toxicita TCDD a ostatních látek (potkan LD50 mg/kg ž.v.)



Chemical	LD ₅₀ Value (mg/kg ž.v.)
TCDD (a form of dioxin)	0.01
Tetrodotoxin (globefish toxin)	0.01
Saxitoxin (shellfish poison)	0.8
Carbofuran (a pesticide)	10
Phosphamidon (an insecticide)	24
Nicotine	50
Caffeine	200
DDT (an insecticide)	200
2,4-D (an herbicide)	370
Mirex (an insecticide)	740
Acetylsalicylic acid (aspirin)	1,700
Malathion (an insecticide)	2,000
Sodium chloride (table salt)	3,750
Glyphosate (an herbicide)	4,300
Ethanol (drinking alcohol)	13,700
Sucrose (table sugar)	30,000
Botulotoxin (enzym)	0,00000003

Toxikodynamika - otázky

Jaké makromolekuly jsou cílem toxických látek?

Jaké existují interakce mezi toxickými látkami a makromolekulami?

Jaký typ interakce bude nejpravděpodobnější mezi

* hexachlorhexanem ... a hemoglobinem? ... a fosfolipidem?

* formaldehydem ... a tubulinem? ... a nukleovou kyselinou?

Co je to toxikodynamická disociační konstanta?

Ke které makromolekule má TCDD vyšší afinitu? U které interakce bude vyšší K_d ?

K receptoru AhR nebo k hemoglobinu?

Co je agonista? Co je antagonist?

Účinky látek na molekulární úrovni: mechanismy působení



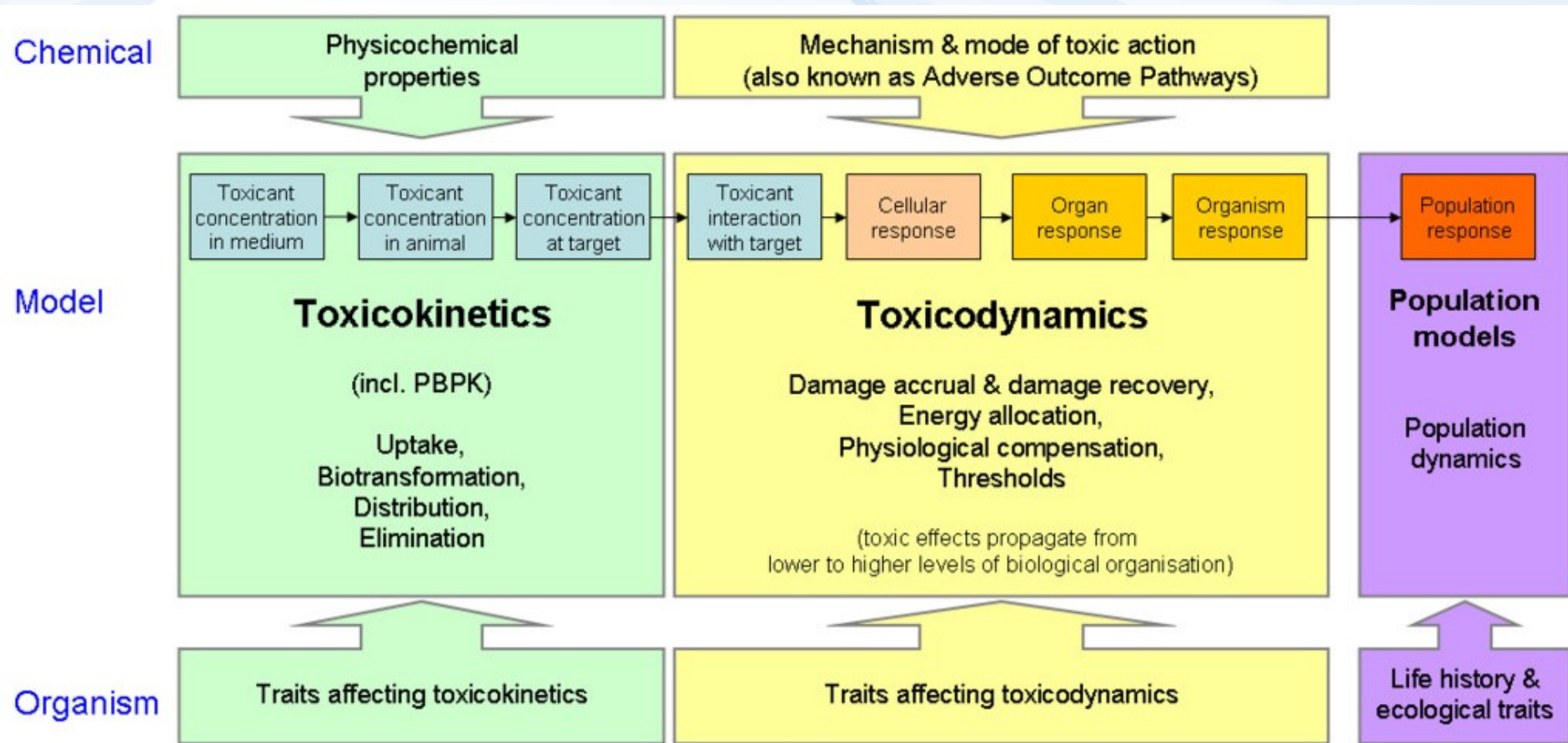
Co by si student(ka) měl(a) odnést ?

- 1) ZNÁT a dokázat vysvětlit hlavní Molekulární a Biochemické mechanismy toxicity
- 2) Dokázat přiřadit ke každému mechanismu toxicity některé z významných environmentálních toxikantů
- 3) Vysvětlit, jak se jednotlivé BIOCHEMICKÉ MECHANISMY toxicity projeví na vyšších úrovních
(příklad – inhibice receptoru pro hormon → projev: porušení reprodukce)



Připomenutí:

mechanistický koncept od molekuly k populacím
(V literatuře: „Adverse Outcome Pathway“)



→ Arrows indicate a causal relationship

See also: Ashauer & Escher *JEM* (2010), Rubach *et al. IEAM* (2011), Jager *et al. ES&T* (2011), Ashauer *et al. ET&C* (2011)

Základní **typy** ekotoxicity **organických látek**

- 1) Všechny organické látky mají toxické efekty **pro membránové fosfolipidy**
= **nepolární narkotická toxicita** (bazální toxicita, membránová toxicita)
projevy při relativně vysokých koncentracích, závisí na logKow (viz dále)



Základní **typy** ekotoxicity **organických látek**

1) **Všechny organické látky** mají toxické efekty **pro membránové fosfolipidy**

= **nepolární narkotická toxicita** (bazální toxicita, membránová toxicita)

projevy při relativně vysokých koncentracích, závisí na logKow (viz dále)

2) Kromě základní toxicity, mohou **polárnější látky** přímo působit

na **membránové proteiny** = **polární narkotická toxicita**

projevy při nižších koncentracích než by odpovídalo logKow



Základní **typy** ekotoxicity **organických látek**

1) **Všechny organické látky** mají toxické efekty **pro membránové fosfolipidy**

= **nepolární narkotická toxicita** (bazální toxicita, membránová toxicita)

projevy při relativně vysokých koncentracích, závisí na logKow (viz dále)

2) Kromě základní toxicity, mohou polárnější látky přímo působit

na membránové proteiny = **polární narkotická toxicita**

projevy při nižších koncentracích než by odpovídalo logKow

3) Kromě obou nahoře uvedených mechanismů, mohou látky, které jsou reaktivní

napadat reaktivně makromolekuly a působit tzv. **reaktivní toxicitu**

- projevy ještě při nižších koncentracích než odpovídá narkóze

- toxické látky spíše elektrofilny, vyhledávají nukleofilní zbytky = „elektrony-bohatá místa“

(nukleotidy, SH-, NH₂- a další skupiny – nukleové kyseliny, proteiny, fosfolipidy)



Základní **typy** ekotoxicity **organických látek**

1) **Všechny organické látky** mají toxické efekty **pro membránové fosfolipidy**
= **nepolární narkotická toxicita** (bazální toxicita, membránová toxicita)
projevy při relativně vysokých koncentracích, závisí na logKow (viz dále)

2) Kromě základní toxicity, mohou **polárnější látky** přímo působit **na membránové proteiny** = **polární narkotická toxicita**
projevy při nižších koncentracích než by odpovídalo logKow

3) Kromě obou nahoře uvedených mechanismů, mohou **látky, které jsou reaktivní**
napadat reaktivně makromolekuly a působit tzv. **reaktivní toxicitu**
- projevy ještě při nižších koncentracích než odpovídá narkóze
- toxické látky spíše elektrofilny, vyhledávají nukleofilní zbytky = „elektrony-bohatá místa“
(nukleotidy, SH-, NH₂- a další skupiny – nukleové kyseliny, proteiny, fosfolipidy)

4) Jen některé vybrané skupiny látek vykazují **specifické typy toxicity**
-inhibice enzymů (př. Insekticidy, léky), interakce s receptory (estrogeny, dioxinová toxicita ...)
- projevy při velmi nízkých koncentracích, mohou mít chronické projevy

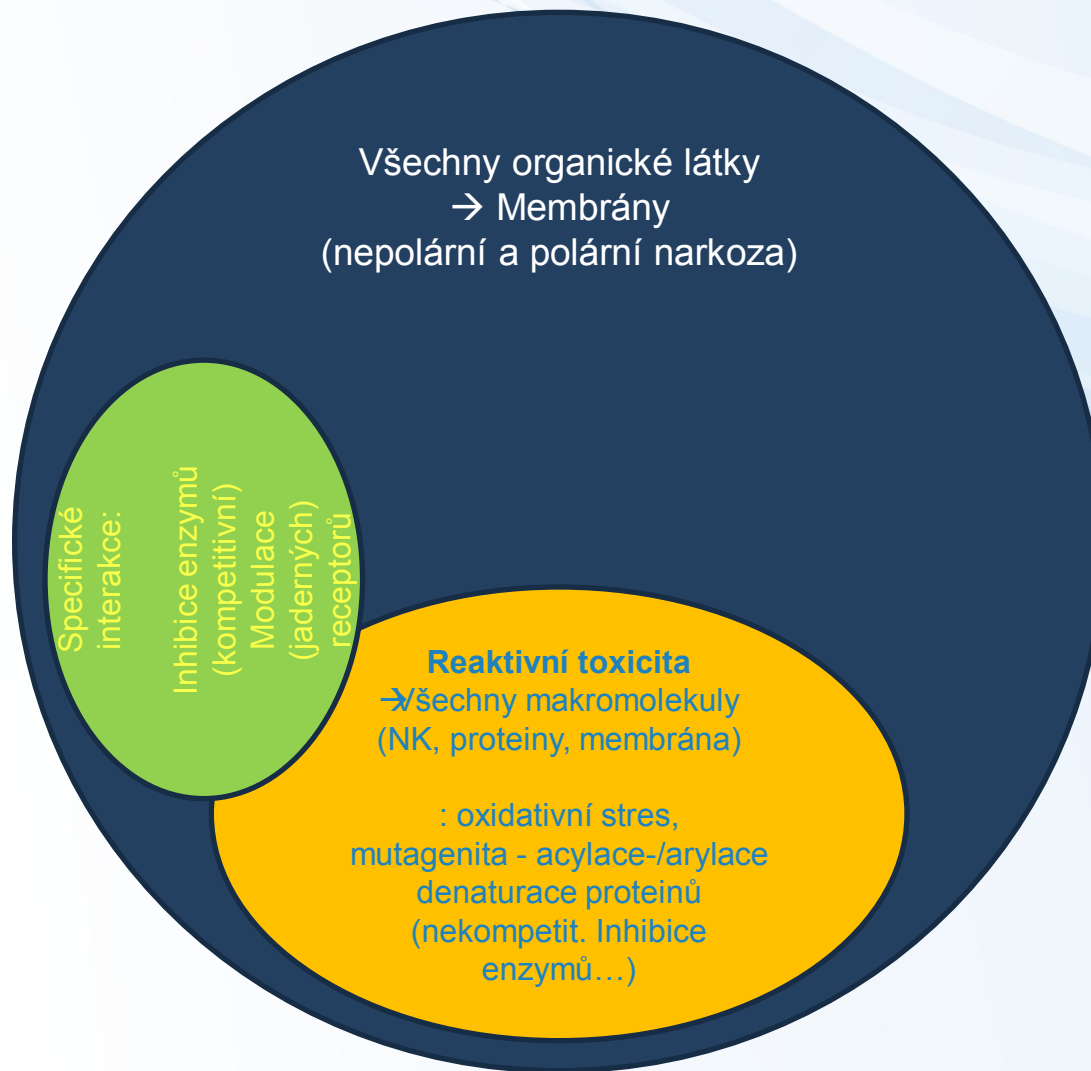
1-3 = nespecifické typy toxicity (u velkých skupin látek, nemají specifický cíl, reakce se všemi makromolekulami),

4 – specifická toxicita (účinky na určité cíle, proteiny nebo NK)

→ Viz také dříve: *toxikodynamika*



Základní **typy** ekotoxicity **organických látek**



Membránová toxicita



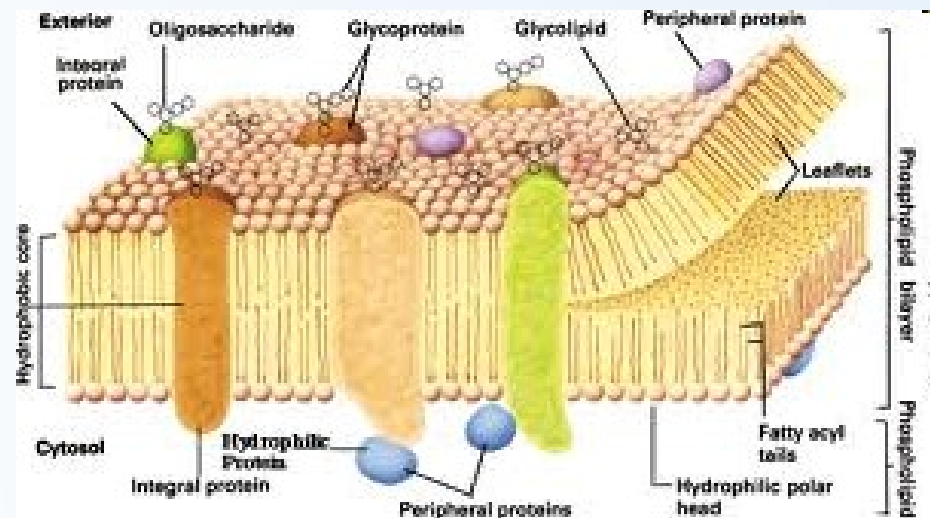
Mechanismus 1: Interakce s membránou

Narušení membrány

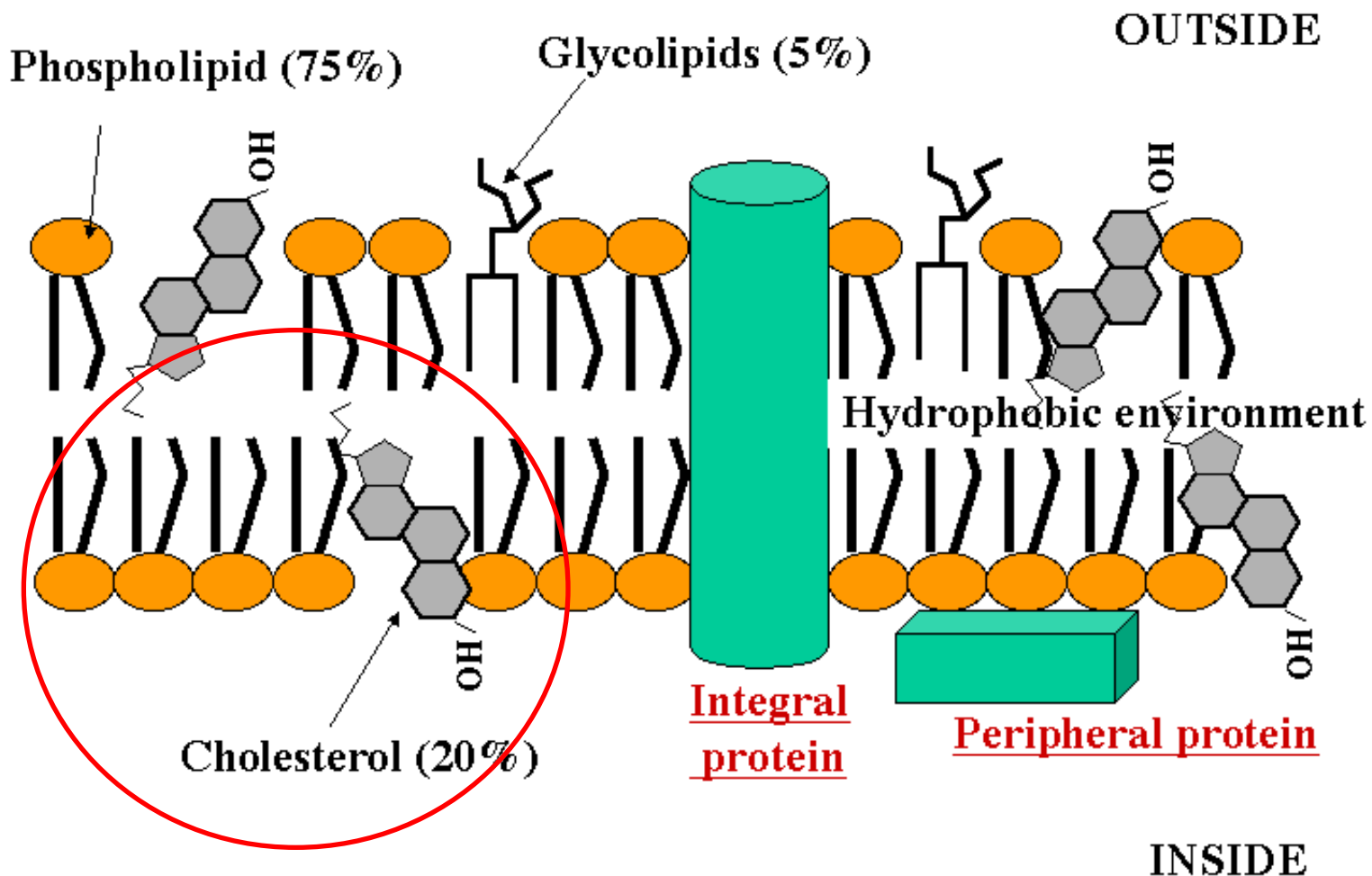
- základní toxicita (baseline toxicity) = narkoza (narcosis)
(*nejde o narkozu farmakologickou, kde se uvažuje velmi specifické působení na receptory na membránách*)

Zásadní význam v ekotoxicitě většiny organických polutantů

- efekty závislé na **HYDROFOBICITĚ (Kow / logP)**
- při vyšších koncentracích akumulace látek v membránách
→ narušení zásadních životních funkcí
(přenos nervových signálů, tvorba ATP atd atd)



Plasma membrane



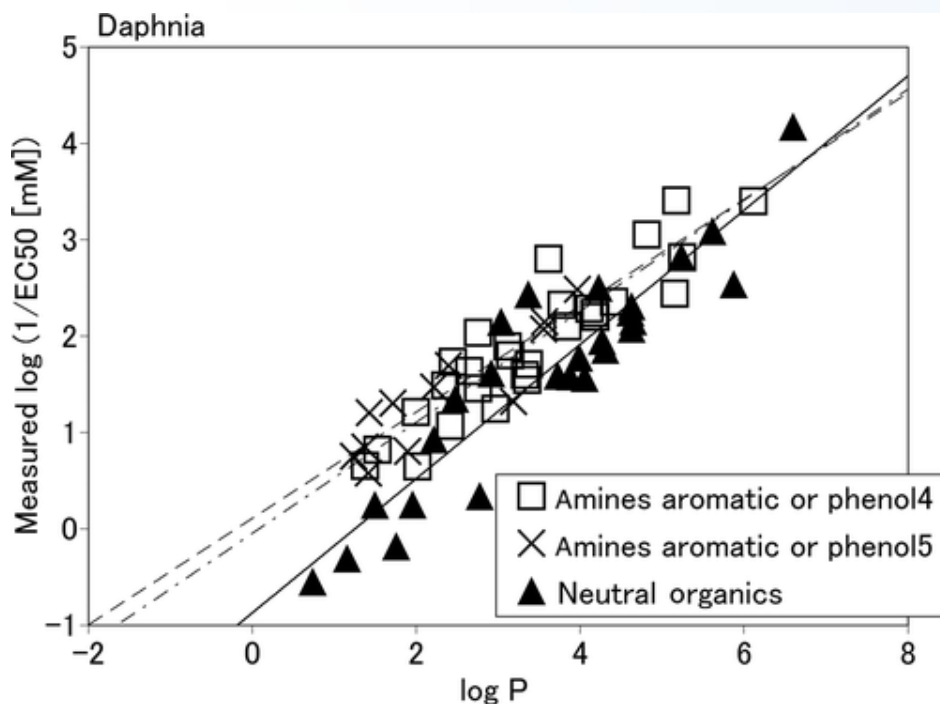
Poznámka: cholesterol - strukturně „velikostí“ obdobný jako jiné organické látky (PAHs, neutrální toxikanty...)

Narkotická (membránová toxicita)

→ důsledky a projevy

AKUTNÍ EKOTOXICITA

Přímá korelace mezi $\log P$ a EC_{50} u vodních organismů (*Daphnia*, ryby, planktonní řasy ...)



Obrázek:

Neutrální organické látky
→Nepolární narkoza

Aminy, fenoly
→Polární narkoza
(při stejném $\log P$ je pozorována vyšší toxicita – tj. vyšší hodnoty $1/EC_{50}$ než u neutrálních látek)



Mutagenita a genotoxicita



- Mutagenita a genotoxicita -

DNA - klíčová molekula života

- pečlivá kontrola struktury (a funkce)

DNA všech organismů často mutuje:

- základ přirozené variability, adaptací, evoluce

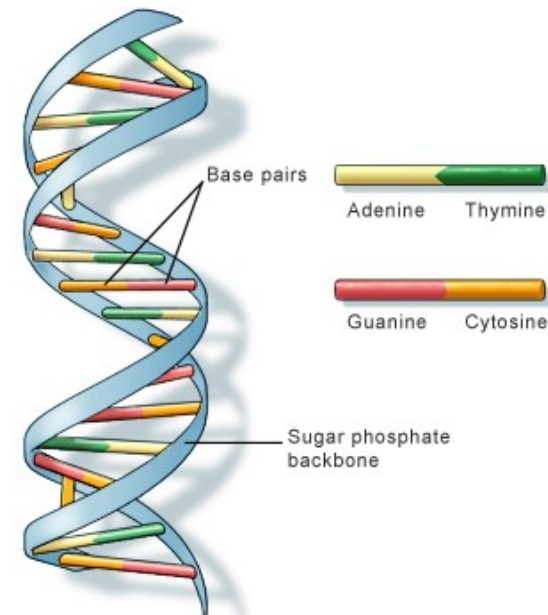
Naprostá většina případných mutací je opravena

Neopravitelné změny

→ 99.9% řízená smrt buňky (apoptóza)

→ minimum změn zůstane zachováno

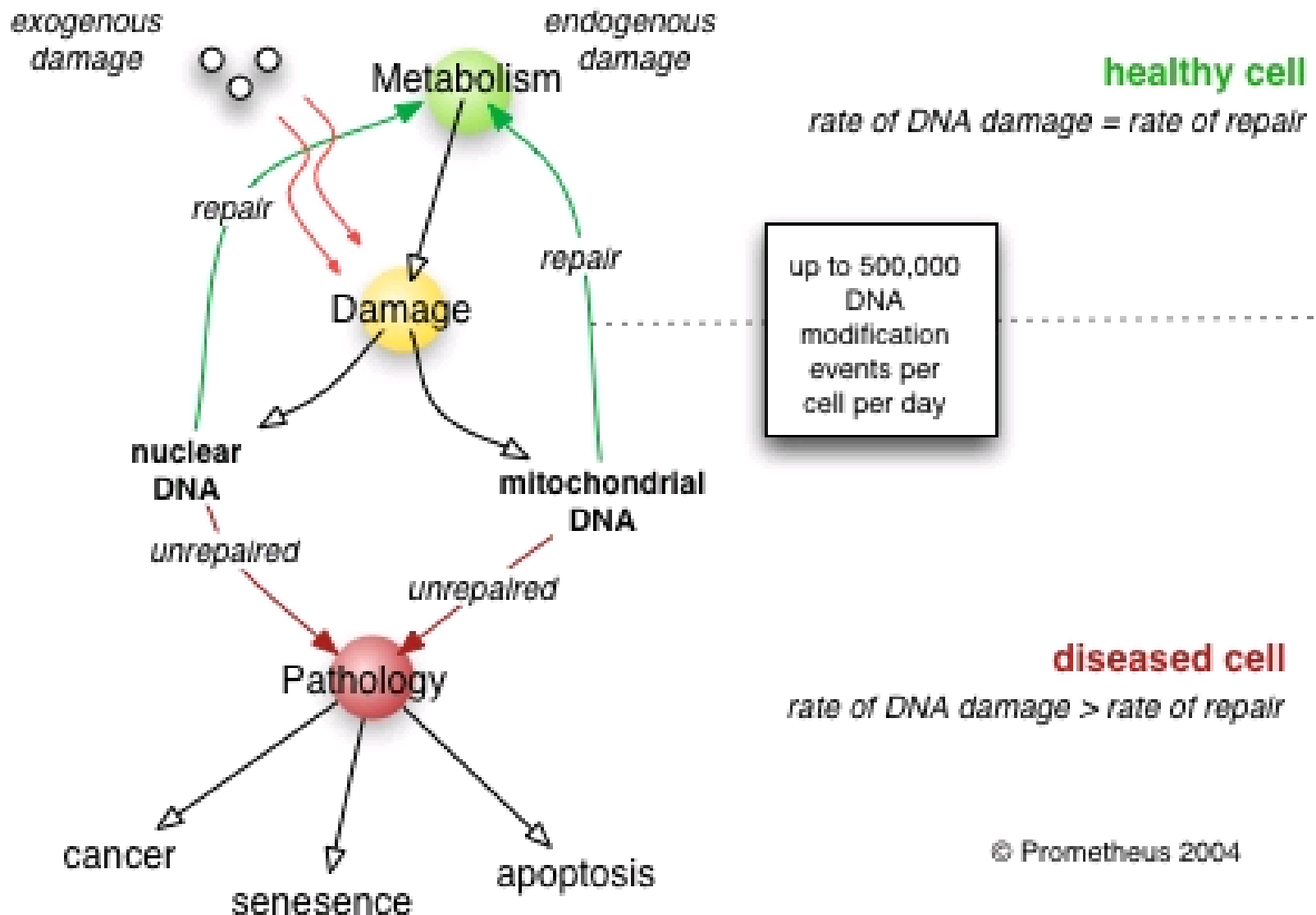
→ projevy (adaptace, evoluce ... genotoxicita)



U.S. National Library of Medicine



- Mutagenita a genotoxicita -



© Prometheus 2004



- Mutagenita a genotoxicita -

Chemické látky mohou indukovat poškození DNA

mutageny = látky způsobující mutace
(změny/alterace na DNA a chromosomech)

genotoxiny = látky poškozující DNA

klastogeny = látky vyvolávající chromosomální zlomy

- terminologie není jednotná / přechody ...



Mutagenita a genotoxicita – TYPY MUTACÍ 1

1) Bodové mutace (interakce toxikantu s nukleotidem)

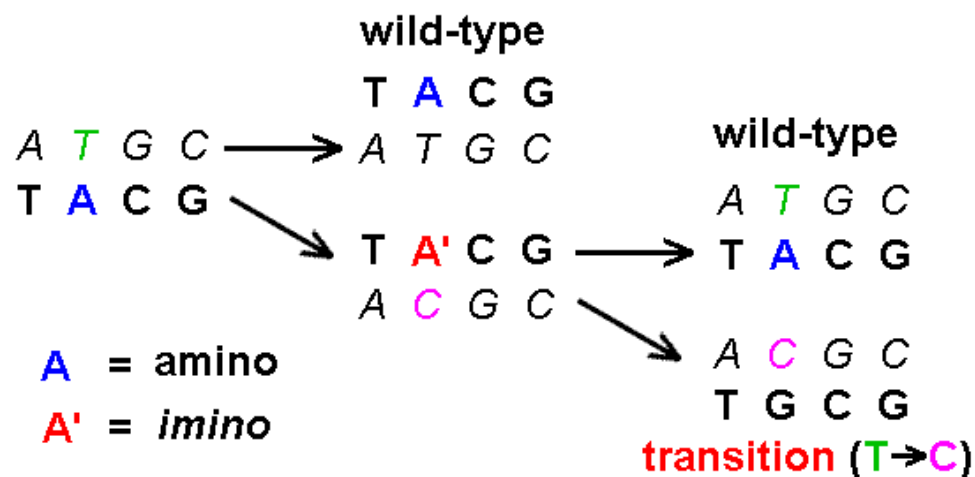
: záměny

změna jednoho tripletu, jedné aminokyseliny → “úprava” funkce enzymu
NEBO nefunkční enzym → apoptoza

: delece, adice

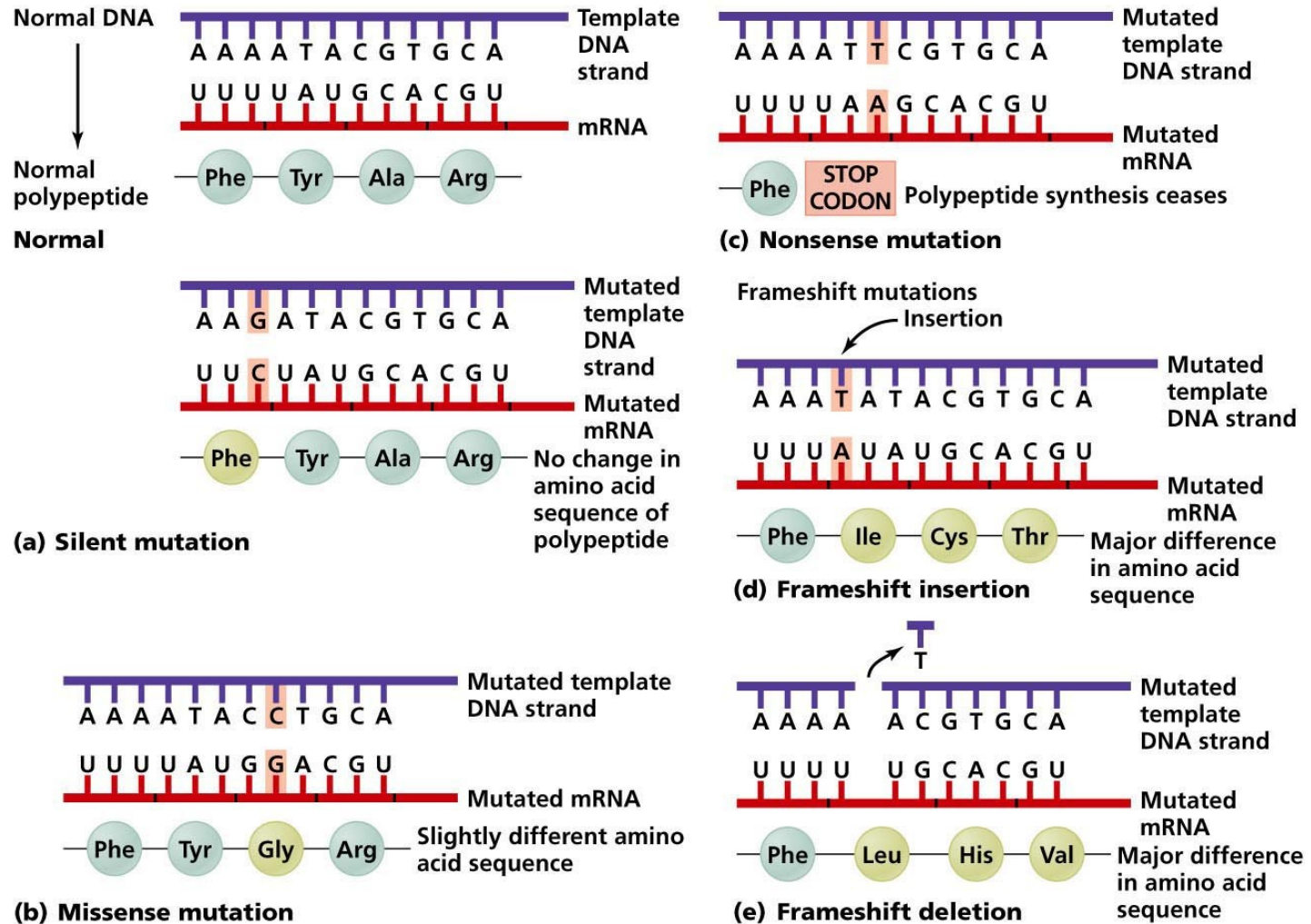
zpravidla **změna čtecího rámce** → vždy nefunkční enzym → smrt apoptozou

Záměna T (Purin) → C (Pyrimidin)



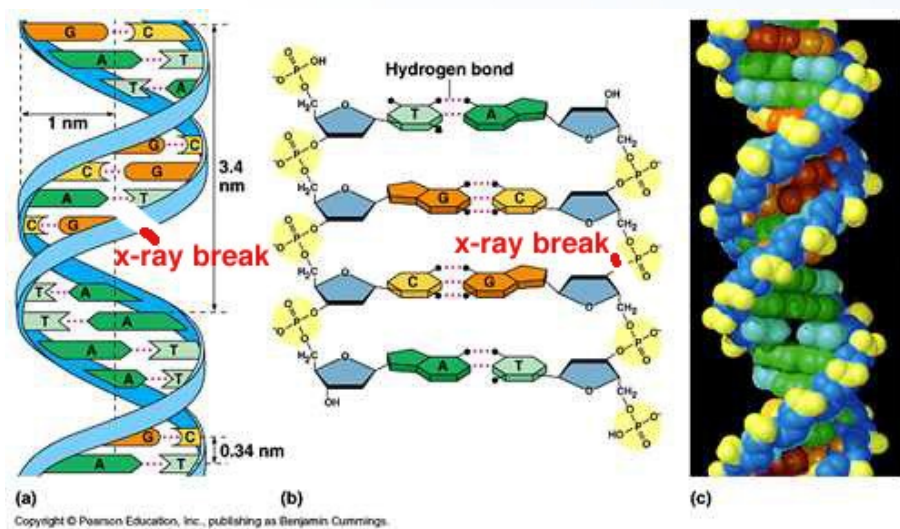
Důsledky bodových mutací

- (a) Tiché mutace – i po změně koduje stejnou aminokyselinu (amk)
- (b) Změna smyslu – jiný triplet: změna kodování jedné amk
- (c) Nesmyslná mutace – např. triplet koduje „STOPL
- (d – e) Změna čtecího rámce – změna tripletů pro mnoho amk od mutace dále

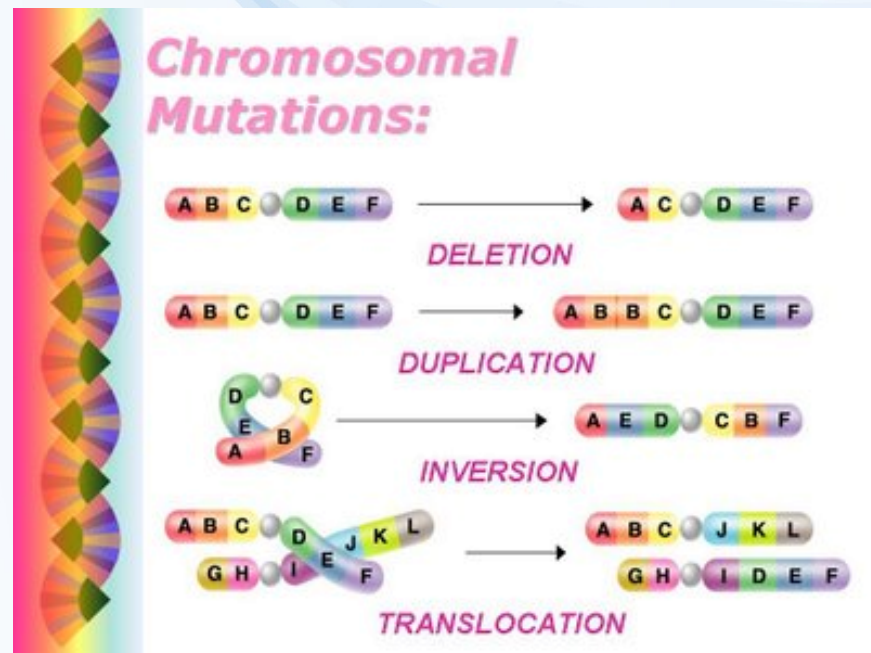


Mutagenita a genotoxicita – TYPY MUTACÍ 2

2) Zlomy + chromozomové mutace (toxikant interaguje s “páteří” DNA – cukr-fosfátový řetězec)



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



Mutageny – hlavní skupiny / příklady

1) Ionizující záření

- * přímá interakce s DNA (zlomy)
- * nepřímo → štěpení vody → ROS (viz také dále)

2) elektrofilní malé molekuly

- * deriváty kyslíku, vody (m.j. také po ozáření)
(viz také dále – “oxidativní stres”)
- * vyhledávají nukleofilní/bazická místa ... např. v NK

3) další reaktivní látky - alkylující, acylující nebo arylující látky

→ kovalentní adukty s nukleotidy v DNA

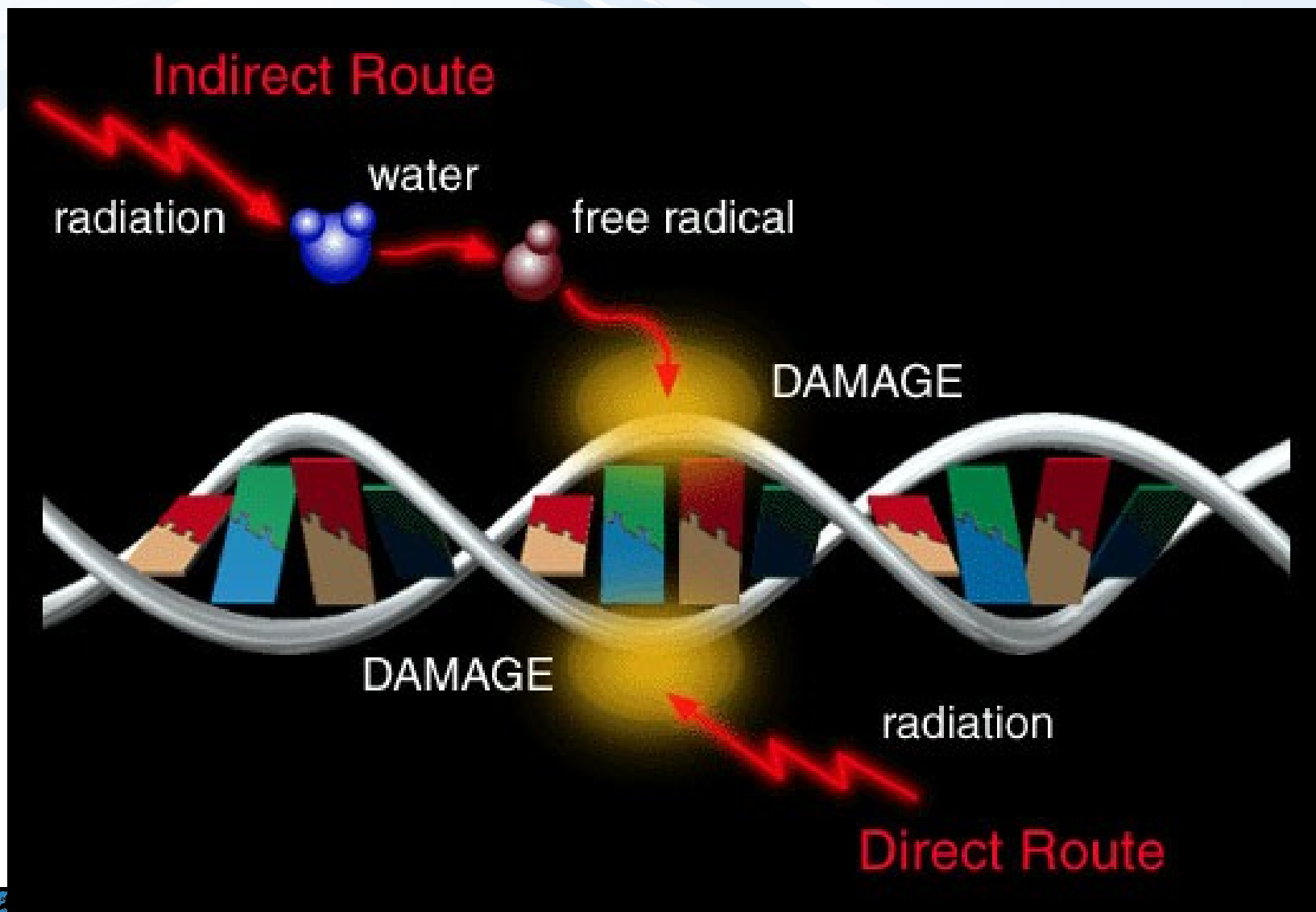
→ 1+2+3: „nespecifické“ reaktivní mechanismy

4) interkalátory DNA → cross-linking řetězců DNA

→ 4: „specifický“ mechanismus genotoxicity
(jen látky s definovanou strukturou, velikostí...)



Mutagenita – ionizující záření



Mutagenita – volné radikály / oxidační stres

Produkty vznikající z vody a kyslíku

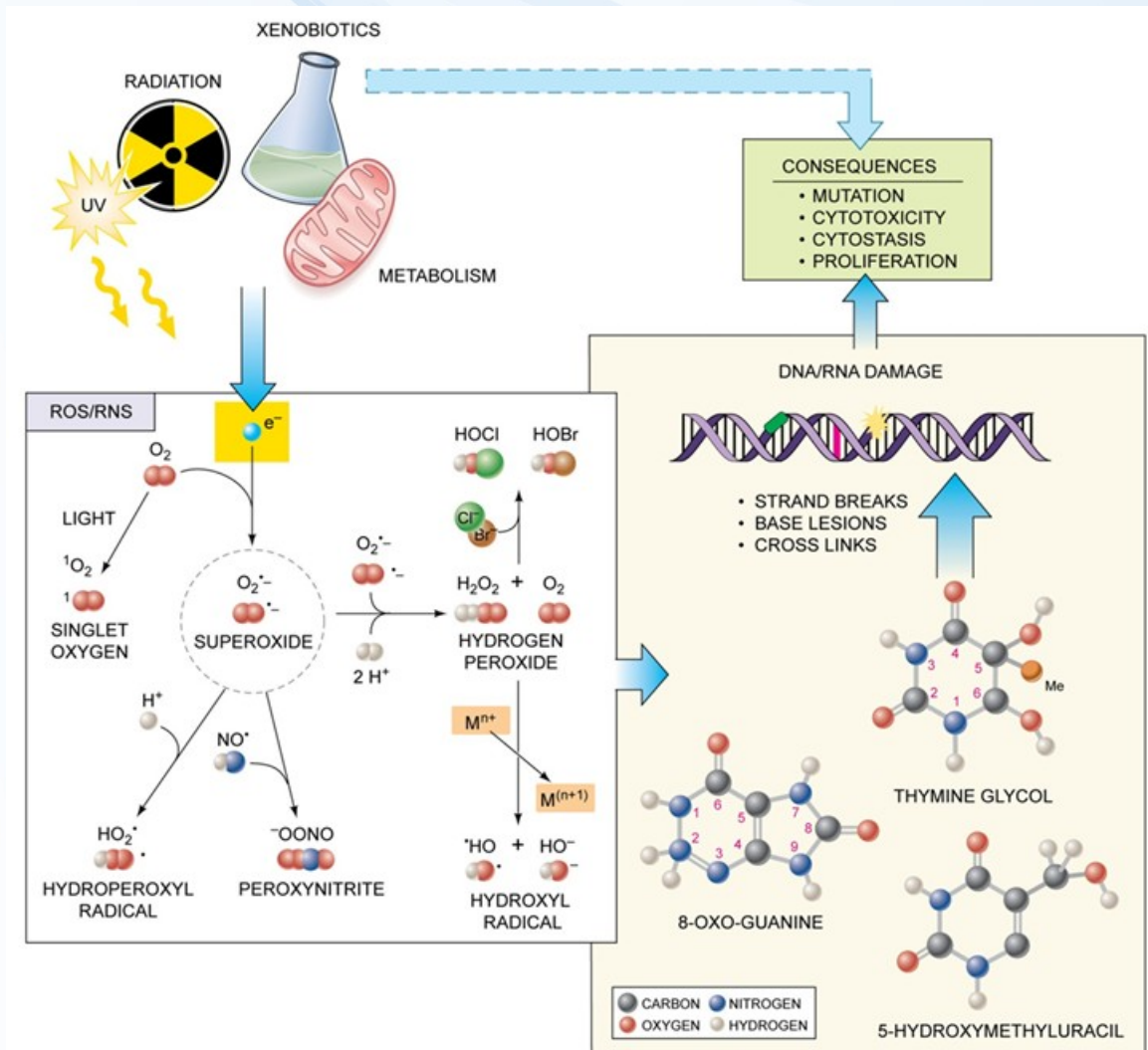
Voda - chemikálie s nejvyšší koncentrací,

Kyslík – silné oxidační činidlo

→ ROS

reactive oxygen species

viz dále – mechanismus “oxidativní stres”



Mutagenita – reaktivní látky (alkylace / arylace)

Kontaminanty, jejich metabolity, toxiny

PAHs

Plísňové toxiny atd.

Reaktivní organické toxikanty

epoxidy, episulfidy, laktony, aminy

chinony

azo-látky (heterocyklické PAHs)

aromatické nitro-látky (NO₂-PAHs)

Adukty (arylace) po aktivaci CYP

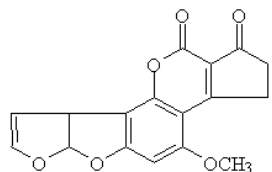
Aflatoxin B1 (po aktivaci CYP)

BaP (po aktivaci CYP)

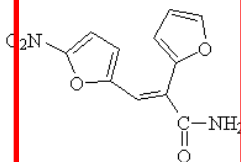
Alkylace

Nitrosomočovina

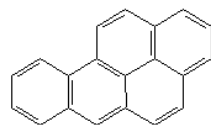
Cyklofosfamid



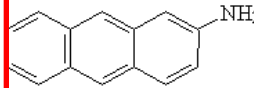
Aflatoxin B1 312.27



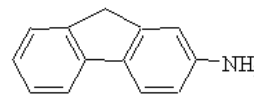
AF-2 (furylfuramide) 248.15



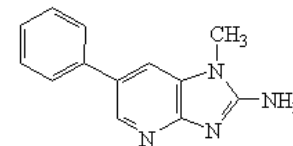
benzo[a]pyrene
(B[a]P) 252.31



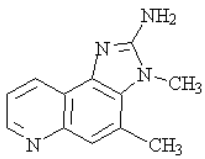
2-aminoanthracene
(2-AA) 193.24



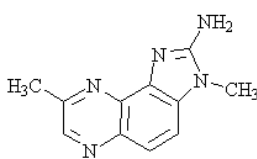
2-aminofluorene
(2-AF) 181.23



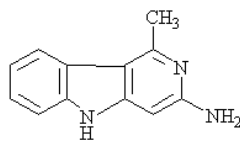
PhIP 224.26



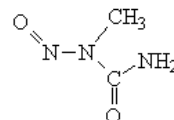
MeIQ 212.25



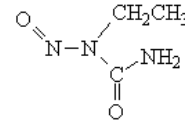
MeIQx 213.24



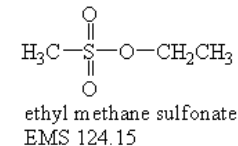
Trp-P-2 197.23



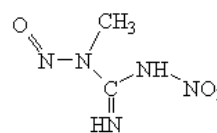
MNU 103.08



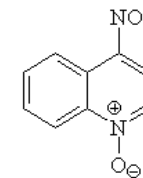
ENU 117.10



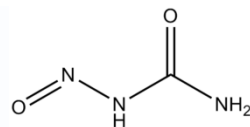
ethyl methane sulfonate
EMS 124.15



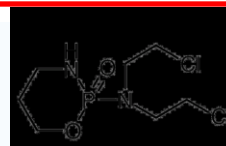
N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
(MNNG) 147.09



4-nitroquinoline-1-oxide
(NQO) 190.15



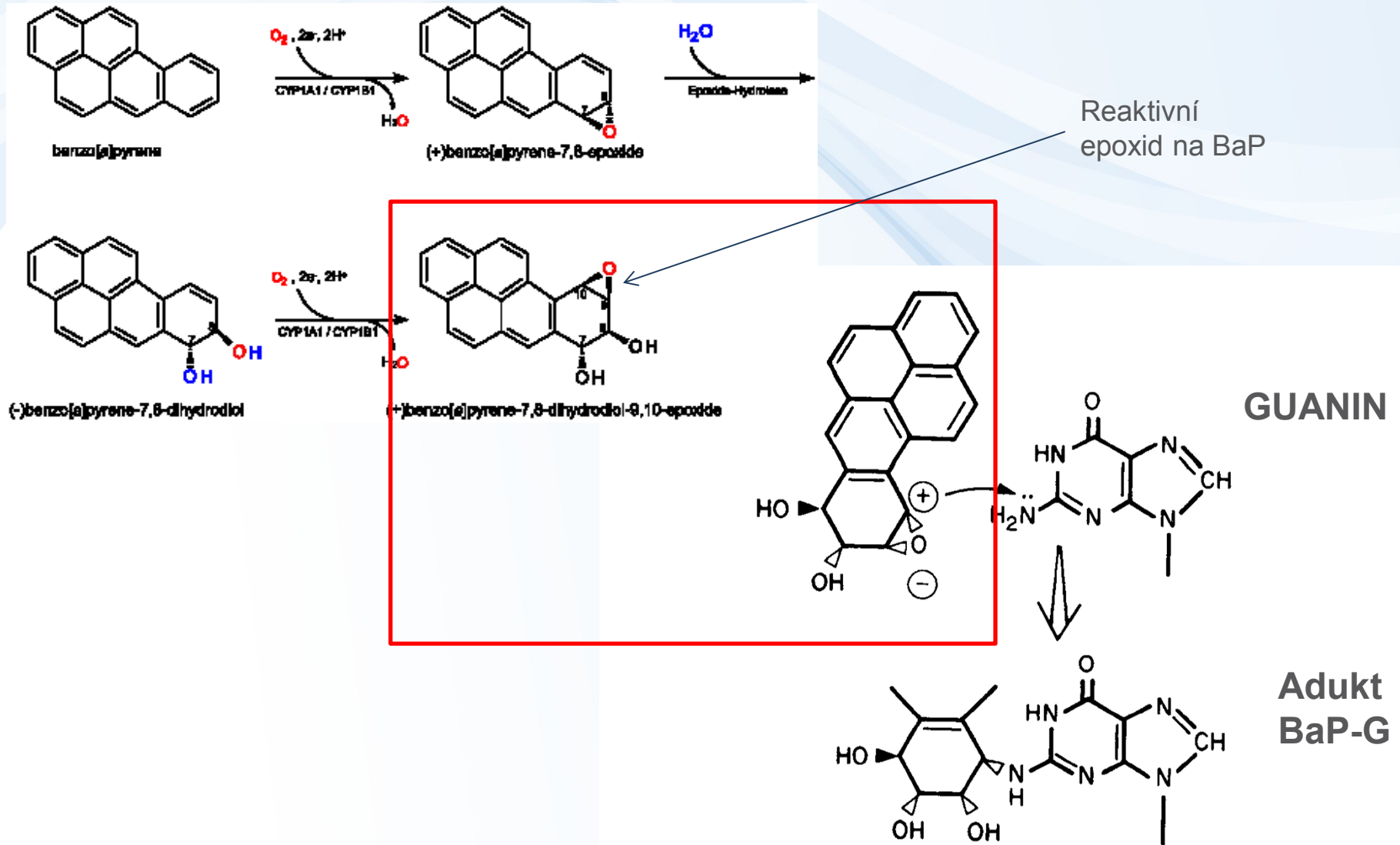
Nitromocovina



Cyklofosfamid



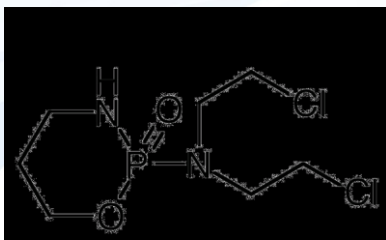
Mutagenita benzo[a]pyren – “arylace” (vznik aduktu) po aktivaci CYP450



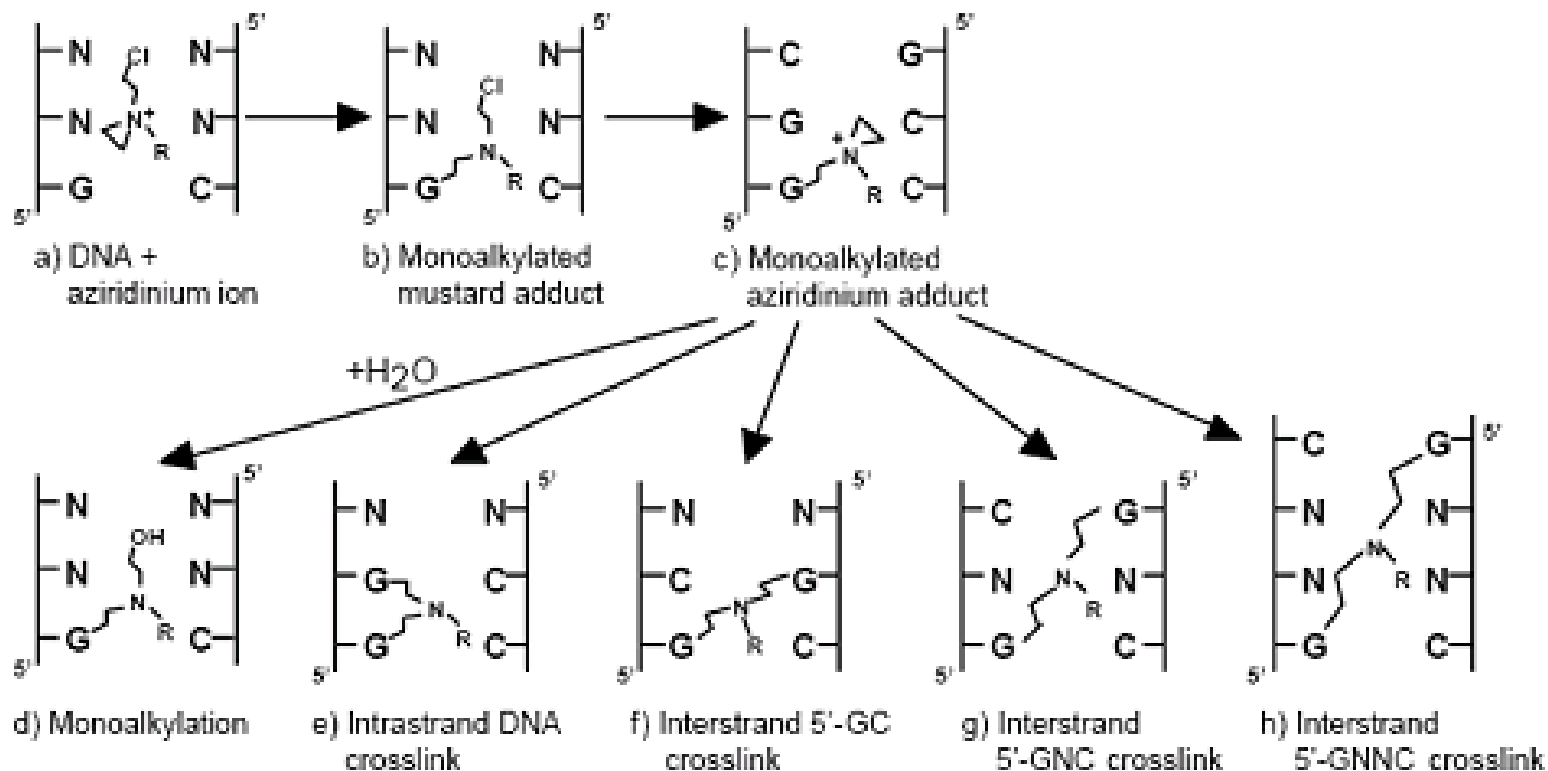
Scheme 5.5. Interaction of 7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide of benzo[a]pyrene with the amino group of guanine.

„Alkylace“ – cyklofosfamid

(protinádorové cytostatikum, prokázaný mutagen)



→ adukty + cross-linky mezi řetězci



Interkalační činidla

Využití v experimentální biologii – značení DNA (ethidium bromid)

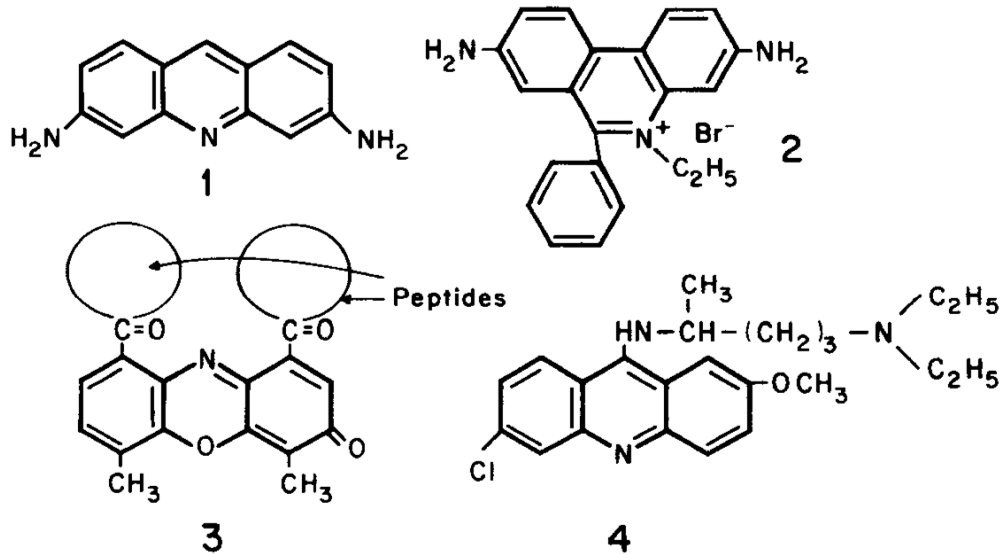
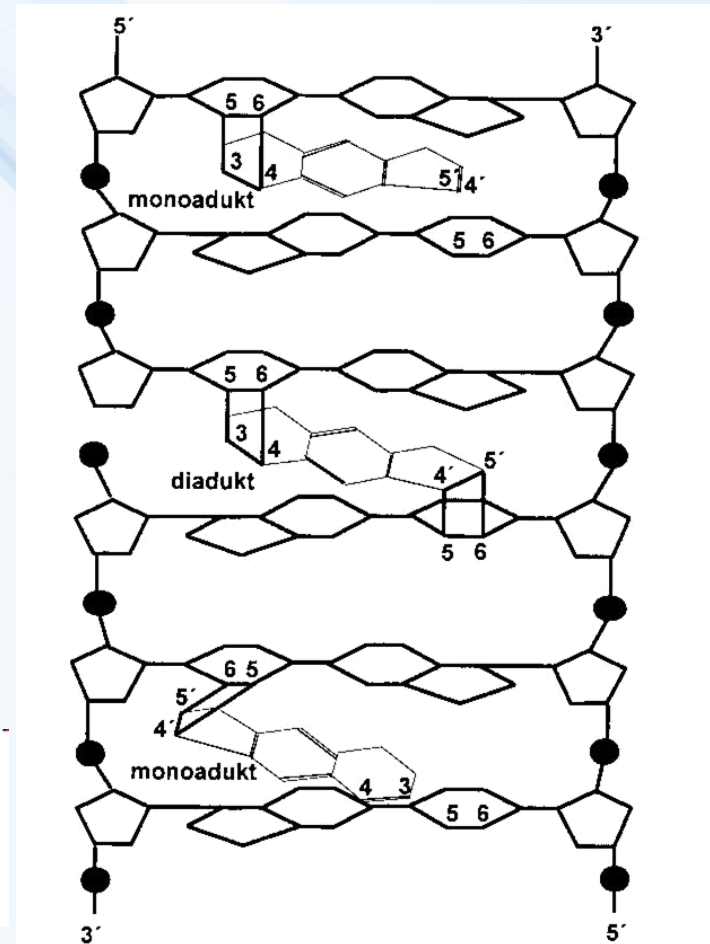
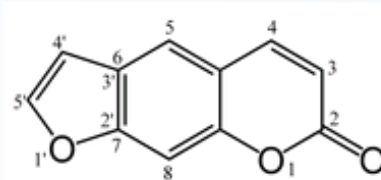


Chart 5.8. Examples of intercalating agents. Key: 1, acriflavine; 2, ethidium bromide; 3, actinomycin; 4, quinacrine.



Interkalace: **psoralen**

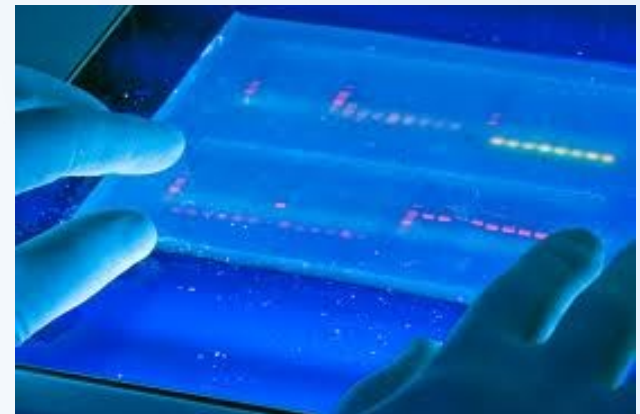
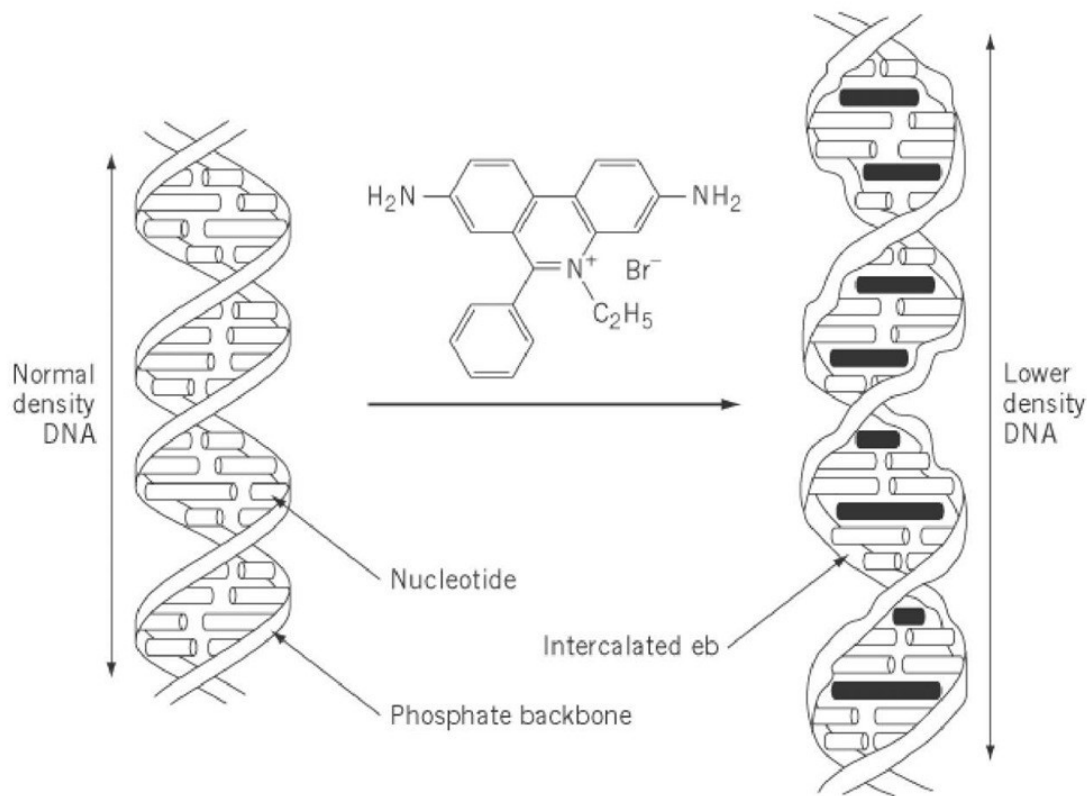


Ethidium bromide

INTERKALACE DO DNA

Example 1 – ETHIDIUMBROMIDE

- experimental dye – visualization of DNA
- intercalation → sharing of electrons with bases → high fluorescence



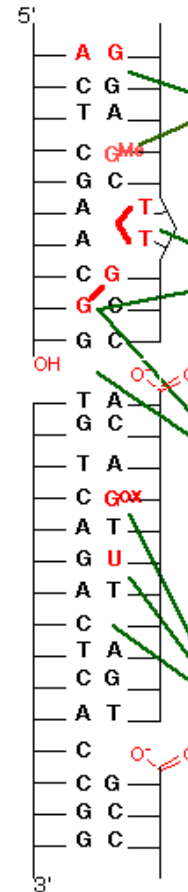
REPARAČNÍ MECHANISMY DNA

V organismu existuje rozsáhlý soubor reparačních nástrojů (*specifické pro různé typy změn*)

Reparační enzymové aparáty:

- mnoho je exprimováno **konstitutivně** (*nízké úrovň, stálá kontrola DNA*)
- některé jsou inducibilní **změnami v DNA** (mutace) (*např. SOS repair – využití jako biomarkery poškození NK*)

DNA DAMAGE



DNA REPAIR SYSTEM

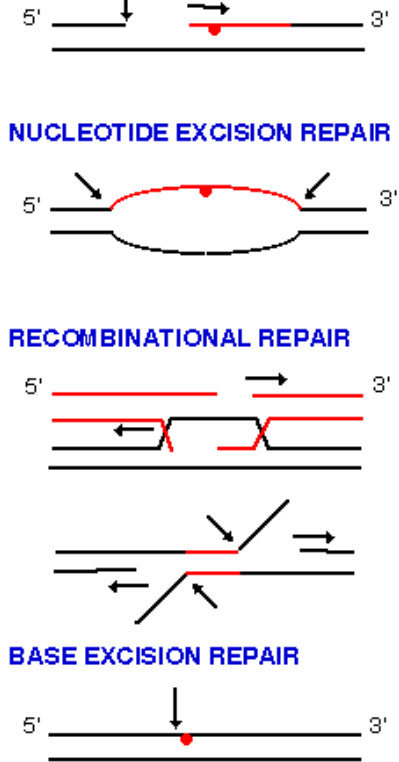
DIRECT REVERSAL

MISMATCH REPAIR

NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR

RECOMBINATIONAL REPAIR

BASE EXCISION REPAIR



Důsledky mutací / genotoxicity

1) Důsledky u lidí a zvířat

Mutace tělních buněk (somatické mutace)

→ první krok **karcinogeneze a dalších patologií**
(karcinogeneze, teratogenita: viz další přednášky)

Mutace pohlavních buněk

→ přenos mutací na další generace (evoluce?)

2) Důsledky pro ekosystémy

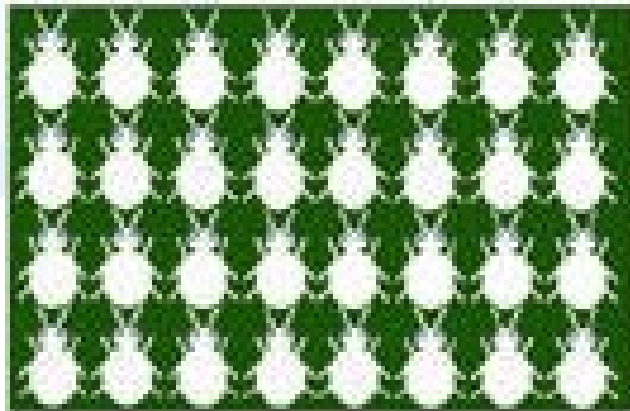
> změny genomu/genofondu přírodních organismů
> **adaptace** na změny v prostředí → **evoluce**

Příklady:

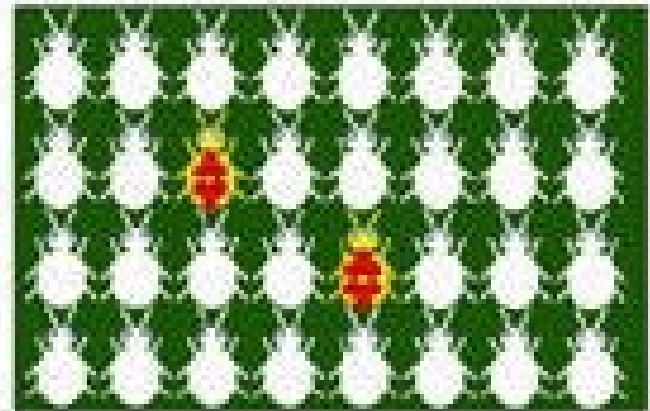
Pesticidy → vznik rezistentního hmyzu

Antibiotika → ATB-rezistentní bakterie

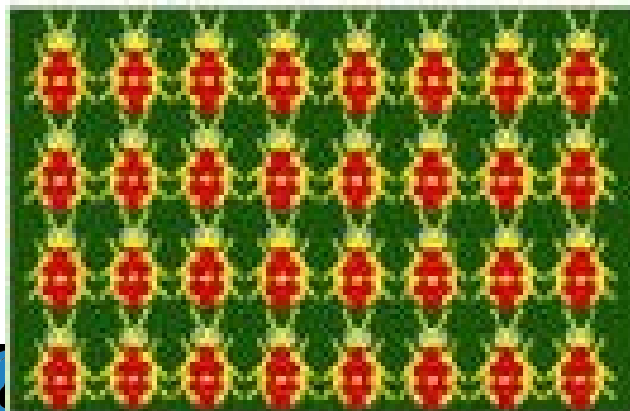
Mutace – základ evoluce populací



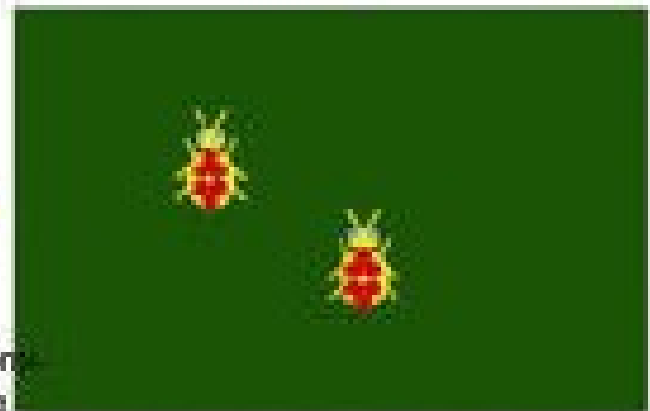
The first individuals with reduced susceptibility to a given insecticide appear as a result of a random mutation



All susceptible individuals are killed by the insecticide, leaving only resistant insects in the population



Resistant individuals multiply, eventually becoming numerous enough to cause economically significant damage



Inhibice enzymových aktivit

Inhibice enzymových aktivit

Řada (eko)toxikantů působí jako specifické inhibitory řady enzymů
inhibice reverzibilní (nekovalentní)
ireverzibilní (kovalentní)

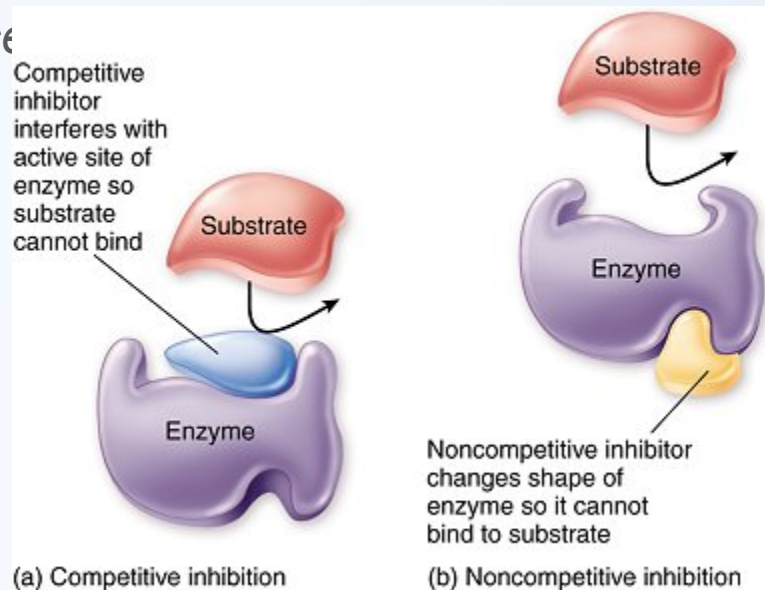
inhibice **kompetitivní**

(v aktivním místě, na úrovni substrátu: viz příklady dále)

inhibice **nekompetitivní/alosterické**

(kovalentní vazby na jiném místě

→ nespecifická změna struktury/funkce)



Specifické inhibice enzymů – příklad AcCholE

Acetylcholinesteráza

- klíčový enzym v přenosu nervových signálů (mezi neurony, mezi neuronem a svalem)
- Inhibice Ach (**organofosfátové pesticidy, karbamáty ...**) → křeče, udušení

Acetylcholine signaling at synapse



- Acetylcholine (ACh)
- ACh Receptor
- Signal transmission

ACh Esterase STOPS signaling process

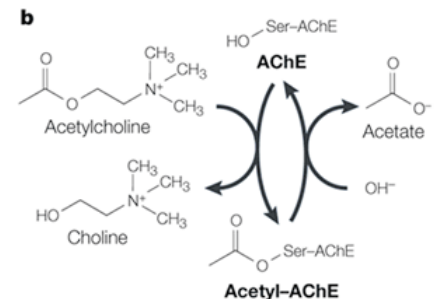
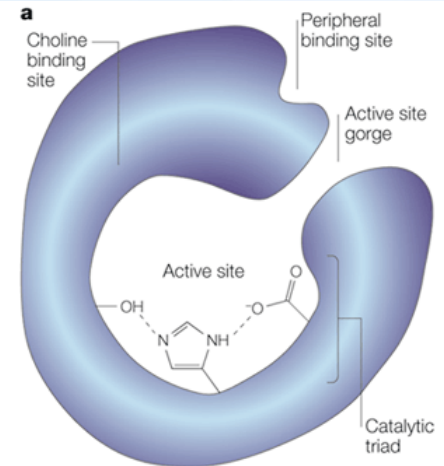


- ACh
- ACh Receptor
- Signal transmission
- ★ ACh Esterase

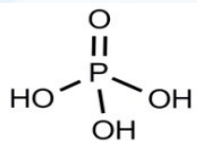
OP's inhibit ACh Esterase



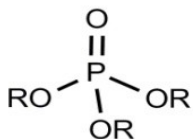
- ACh
- ACh Receptor
- Signal transmission
- ★ ACh Esterase
- ▲ Organophosphate pesticide (OP)



Příklady – organofosfátové inhibitory AcCholE

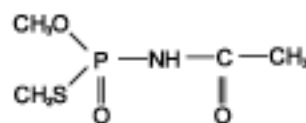


Phosphoric acid

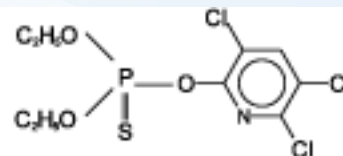


'Organophosphate'

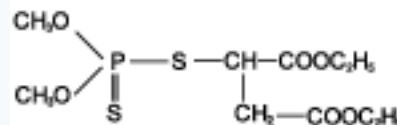
Organofosfátové insekticidy



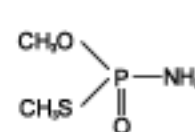
Accphate



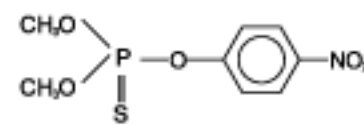
Chlorpyrifos



Malathion

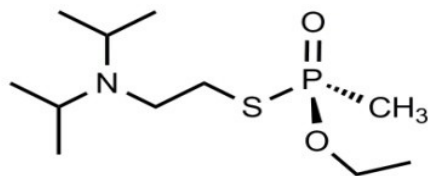


Methamidophos



Parathion-methyl

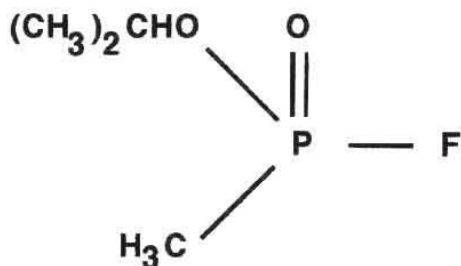
Nervové plyny



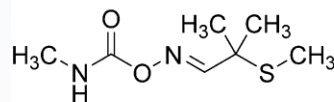
VX

SARIN / GB NERVE AGENT

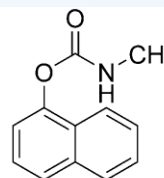
Isopropoxymethylphosphoryl Fluoride



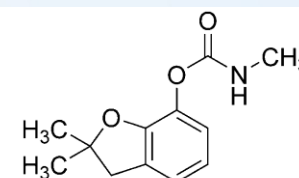
Insekticidy - karbamáty



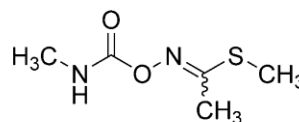
Aldicarb



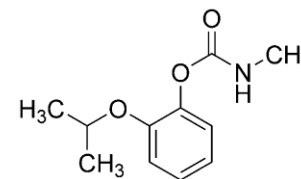
Carbaryl



Carbofuran



Methomyl



Propoxur

Specifické inhibice enzymů - příklady

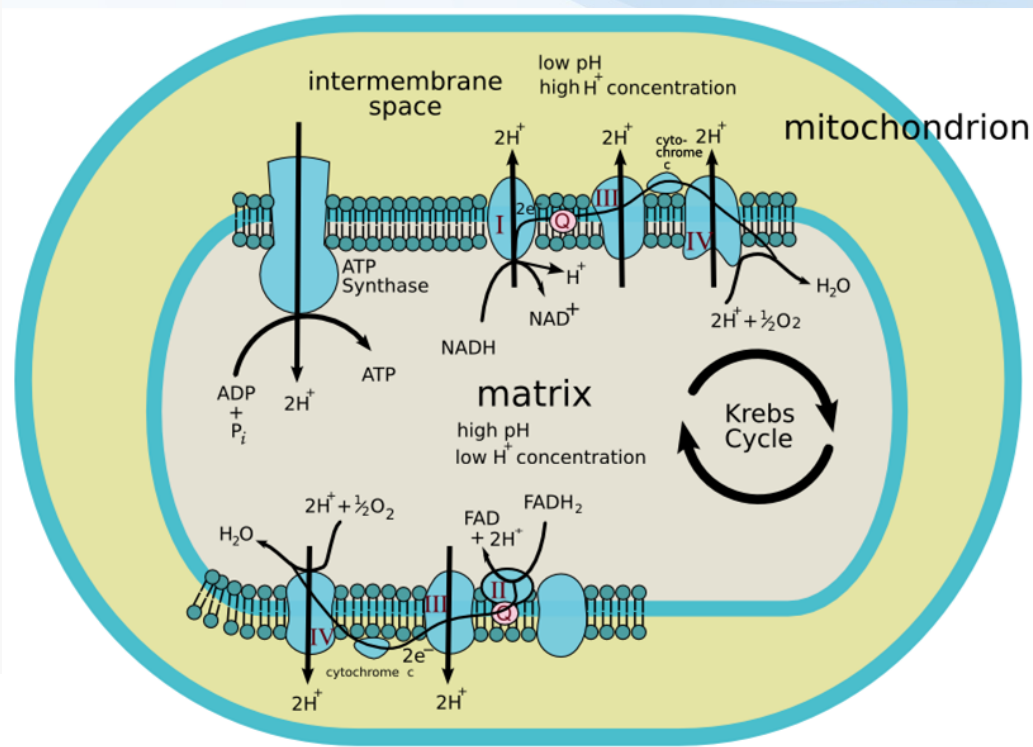
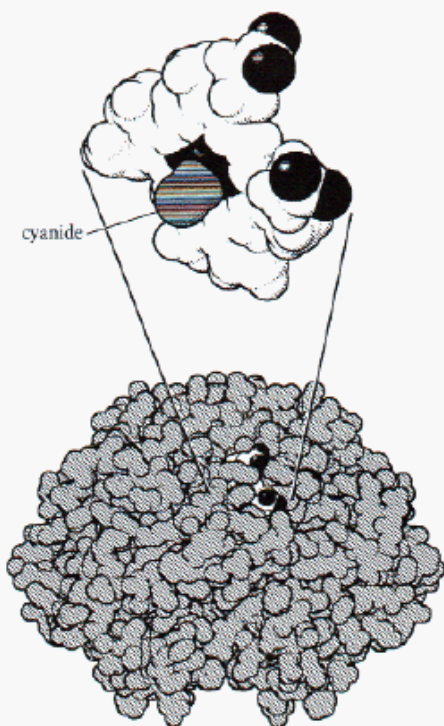
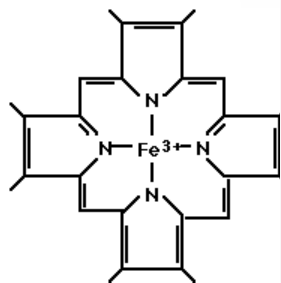
inhibice enzymů respiračních řetězců

- Respirace & tvorba ATP - klíčový metabolický proces

- **Kyanid** ($C\equiv N$), **CO** vazba na hemový komplex

→ nejrychlejší toxicita – mitochondrie

→ také v hemoglobinu, CYP450 atd.



Nespecifické mechanismy (reaktivní): denaturace

Účinky látek na sekundární a terciární strukturu proteinů (včetně enzymů)

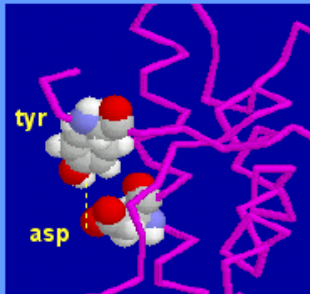
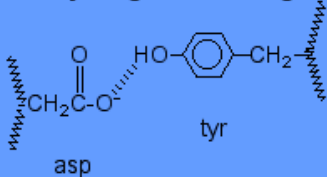
Narušení H-můstků
Iontové vazby

alkoholy, aminy
kyseliny (COOH), zásady (aminy)
toxické (těžké) kovy - Hg^{+2} , Pb^{+2} , Cd^{+2} , Ag^{+1} TI^{+1} ,
toxické kovy (reakce se sírou HS-)

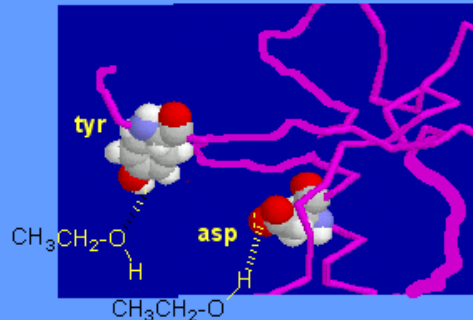
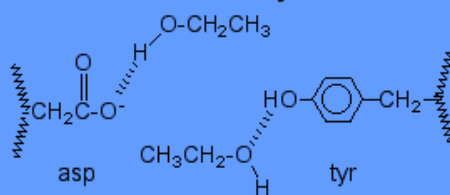
S-S můstky

Detaily (domácí úkol): <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/568denaturation.html>

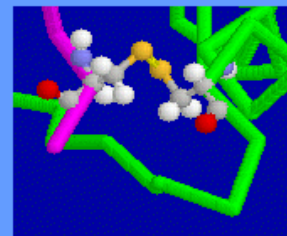
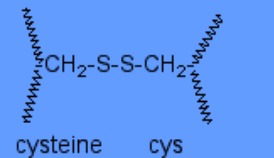
Tertiary Structure - Hydrogen Bonding



Denaturation by Alcohol



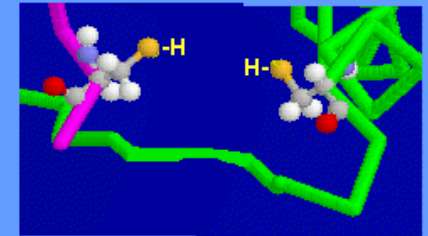
Tertiary Structure - Disulfide Bonds



Join two chains

Denaturation by Reducing Agents

+ (2 H)
reducing
agent



Změny redox-potenciálu

Oxidativní stres



Změny redox potenciálu / oxidativní stres

Redox-potenciál

- v buňce se přirozeně udržuje určitý stav redox-potenciálu
- rovnováha **oxidanty/antioxidanty**

- narušení rovnováhy → **oxidační stres**

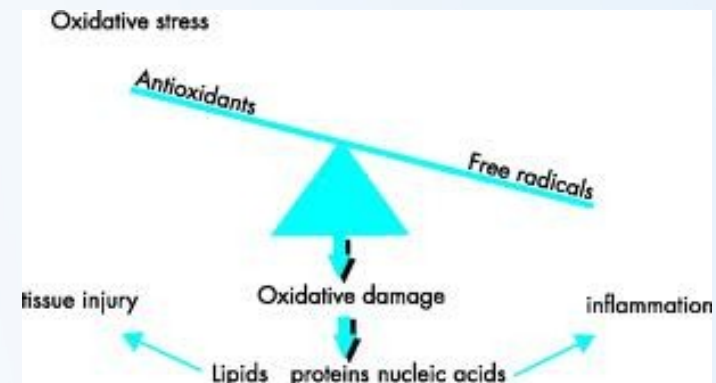
- Antioxidanty:

endogenní syntéza – **glutathion (!)**

dietární beta-karoten, **kys. askorbová (vitamin C)**

- Zdroje “pro-oxidantů” (viz dále)

- přirozené procesy (metabolismus)
- záření
- xenobiotika (přímá reaktivita, reaktivita po aktivaci)



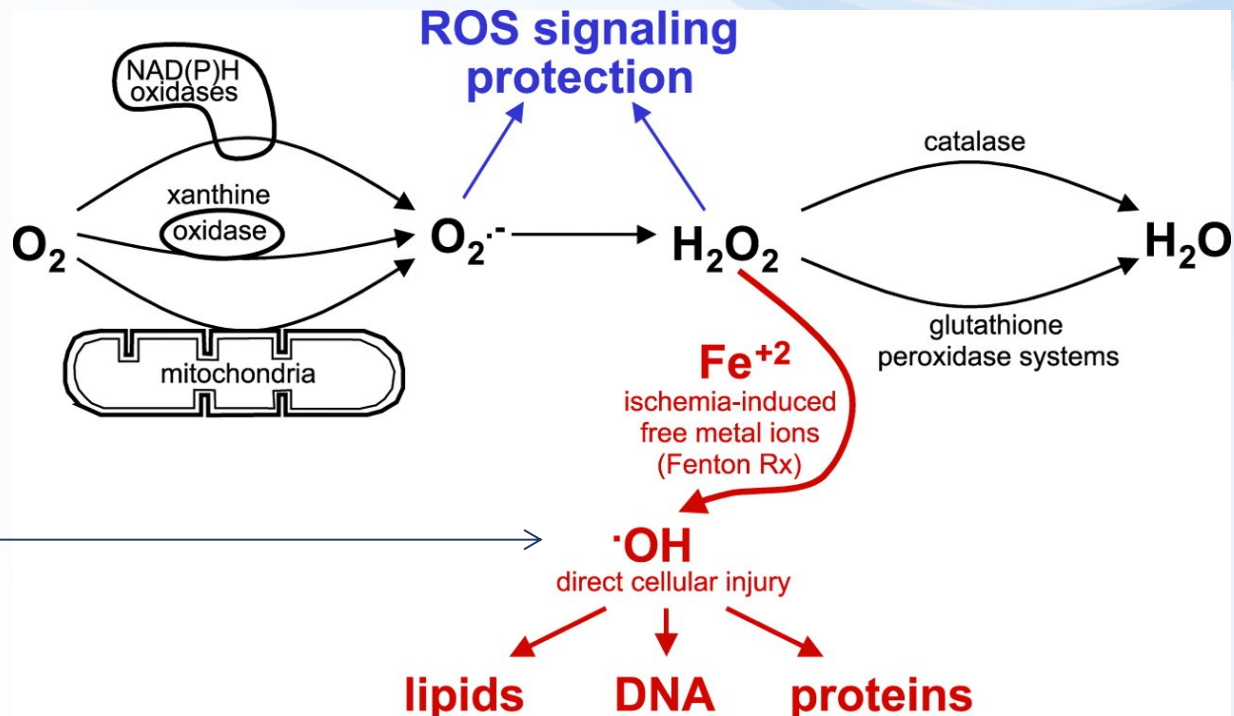
METABOLISMUS a oxidativní stres

Metabolismus - mitochondrie

kyslík = terminální akceptor elektronů

fyziologicky: $O_2 + \text{glukoza} \rightarrow \text{voda} + CO_2$

patologie: $O_2 \rightarrow \text{ROS (reactive oxygen species)}$



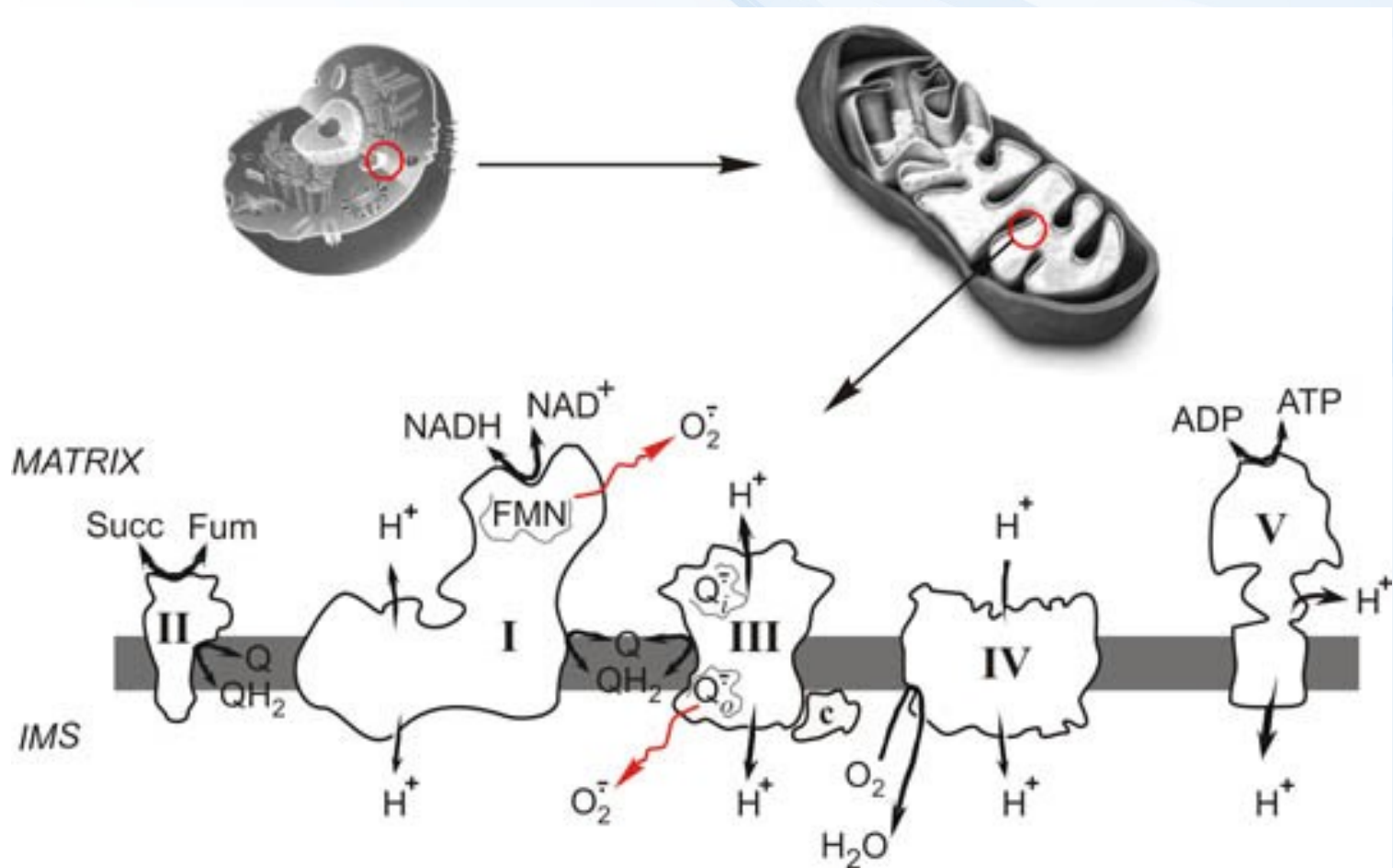
Hlavní ROS

- Superoxid ($O_2^{\cdot -}$)
- Peroxid vodíku (H_2O_2)
- Hydroxylový radikál ($OH \cdot$)
→ poškození molekul



Respirační řetězec v mitochondriích

- zdroj elektronů → zdroj ROS



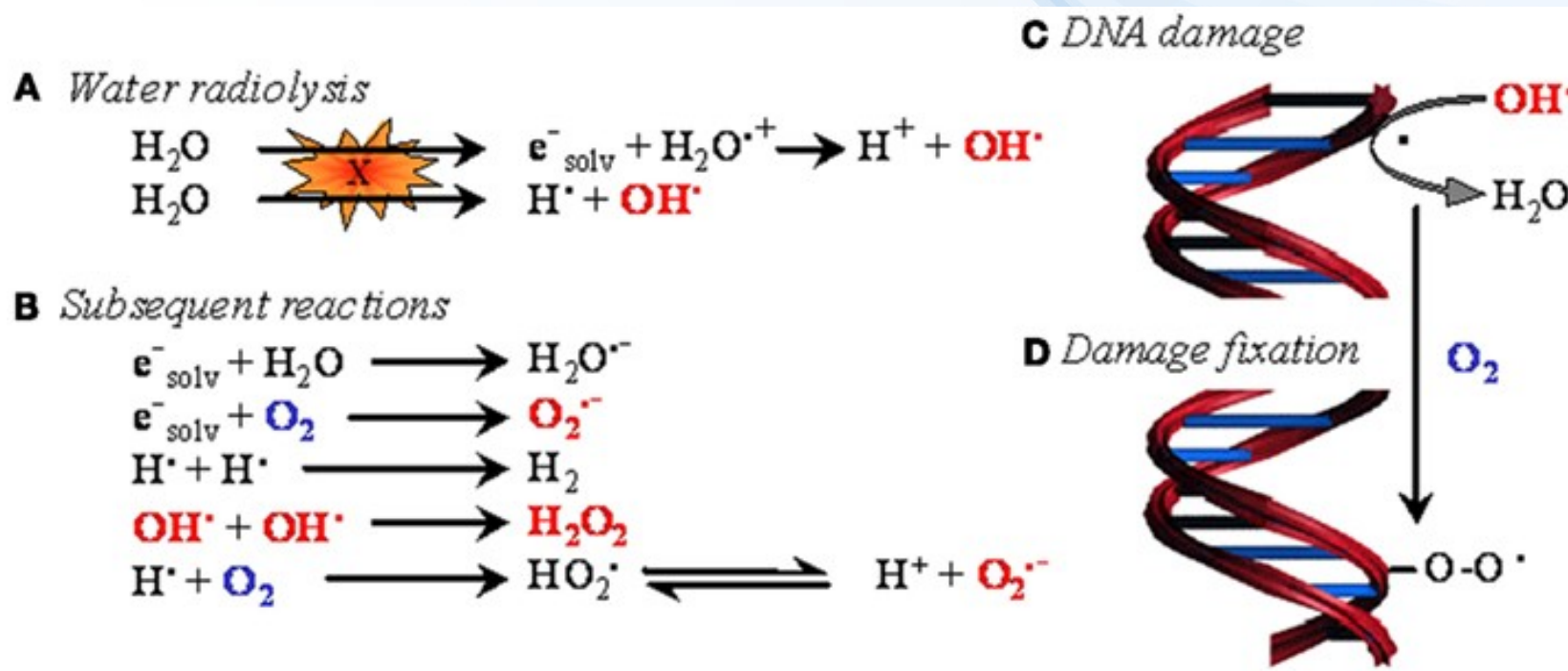
Další zdroje „oxidantů“ v buňce - záření

Ionizující záření

reakce s vodou v buňkách

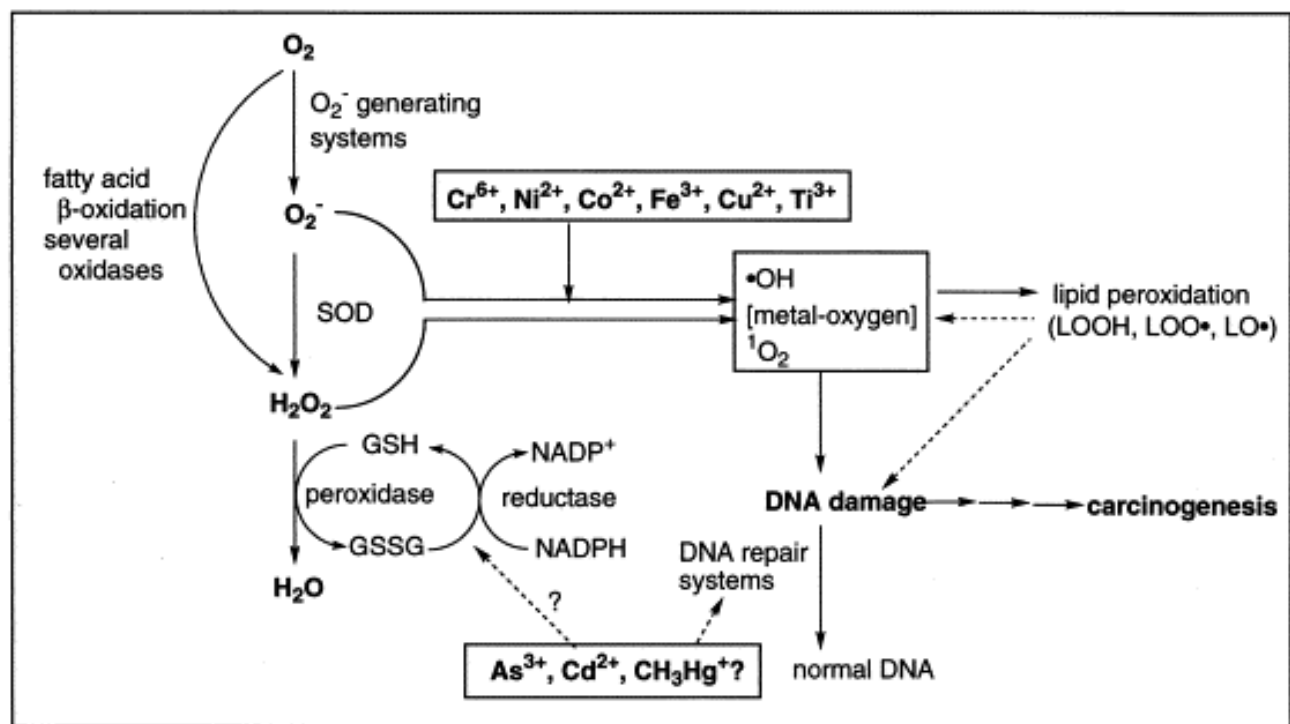
→ produkce ROS (OH-radikál)

→ základní mechanismus toxicity způsobené zářením !



XENOBIOTIKA A OXIDAČNÍ STRES

- přímo reaktivní látky (např. epoxidy a další ...)
- metabolity vznikající při transformacích a detoxifikaci
 - Reakce s “antioxidanty” → narušení redox rovnováhy
- toxické kovy (Fentonova reakce – katalýza rozkladu $H_2O_2 \rightarrow OH^*$)
- redoxní cyklátory – např. chinony
 - indukce radikálů (viz příklad dole: kovy → ROS)



Oxidativní stres = narušení rovnováhy oxidanty/antioxidanty

Oxidační stres vzniká:

→ Zvýšením koncentrací oxidantů

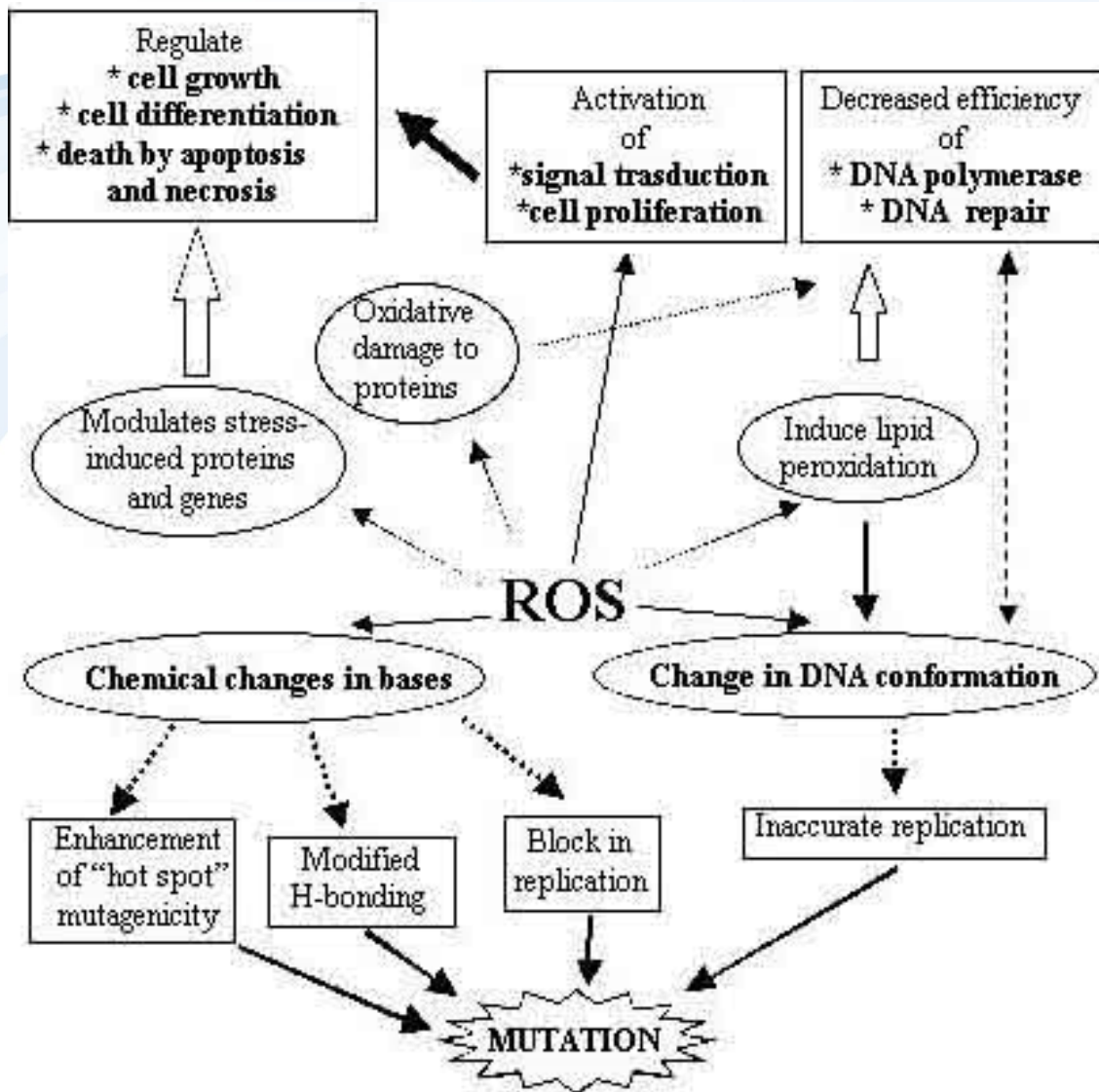
a/nebo

→ Odstraněním antioxidantů

- velmi obecný mechanismus vyvolaný toxickými látkami
- důsledky: chronické efekty – **nemoci, rakovina, stárnutí ...**

Pozn: Druhý extrém narušení rovnováhy:

? Snížení koncentrací oxidantů - málo prostudováno (anoxie - častý stav v nádorech)

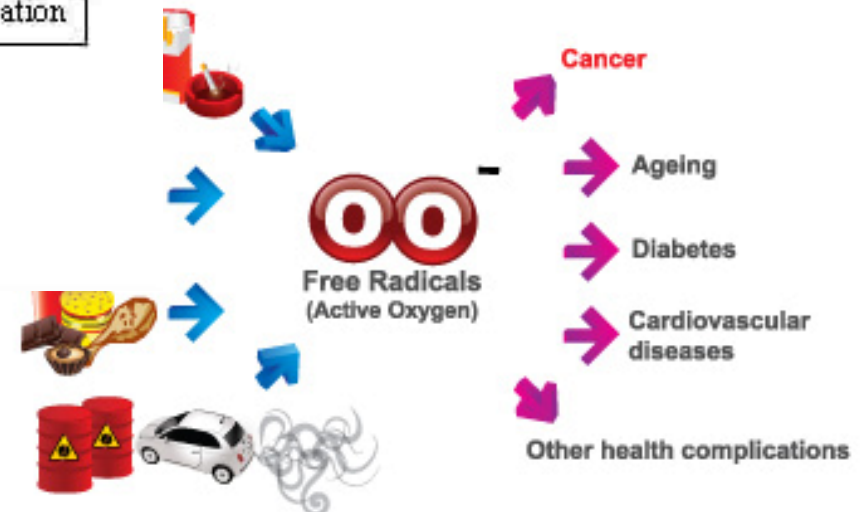


ROS a oxidace na molekulární úrovni

- DNA
- proteiny
- fosfolipidy

Důsledky:

→ Přímá toxicita, stárnutí, nemoci



Další specifické mechanismy

- intracelulární receptory
- specifické modulace gradientů na membránách



Kompetice toxických látek s přirozenými ligandy

Interakce chemických látek s receptory pro přirozené ligandy
= reakce **s proteinovými receptory**

PROTEINOVÉ RECEPTORY

A) Membránové receptory

- přirozené ligandy

- velké hormony (inzulin):

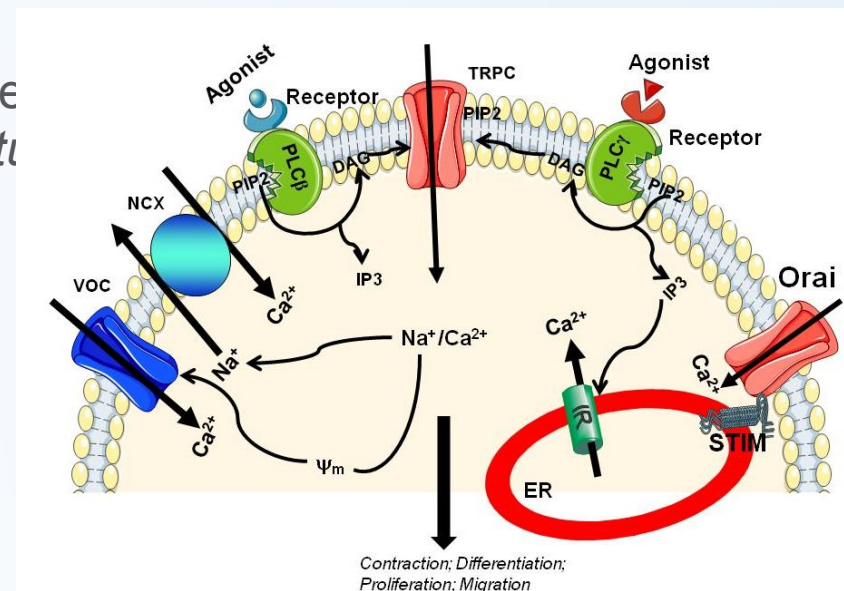
menší význam toxických látek

- malé signální molekuly (neurotransmitery)
strukturně blízké malým mk toxikantů
(spíše farmakologie)

B) Intracelulární receptory

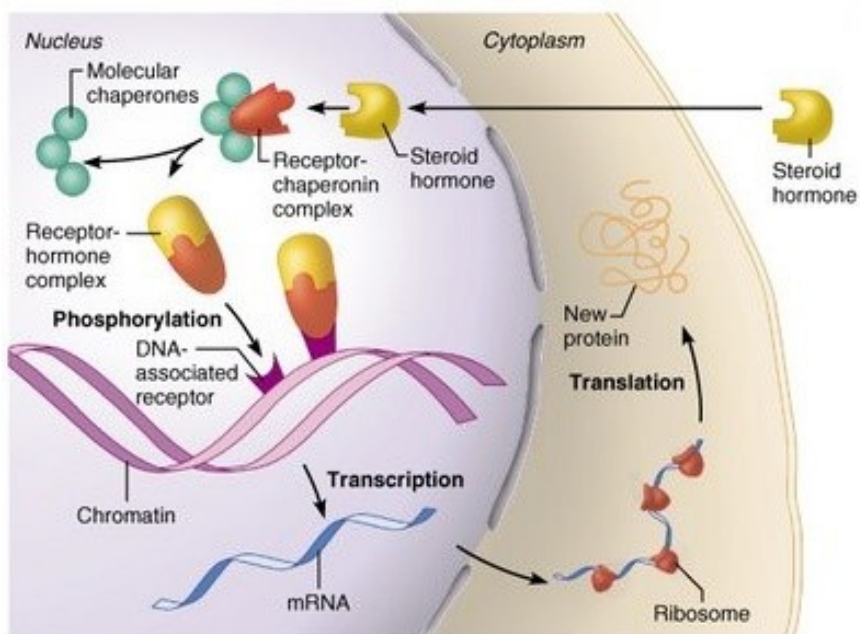
Velký význam v ekotoxicitě

→ viz dále



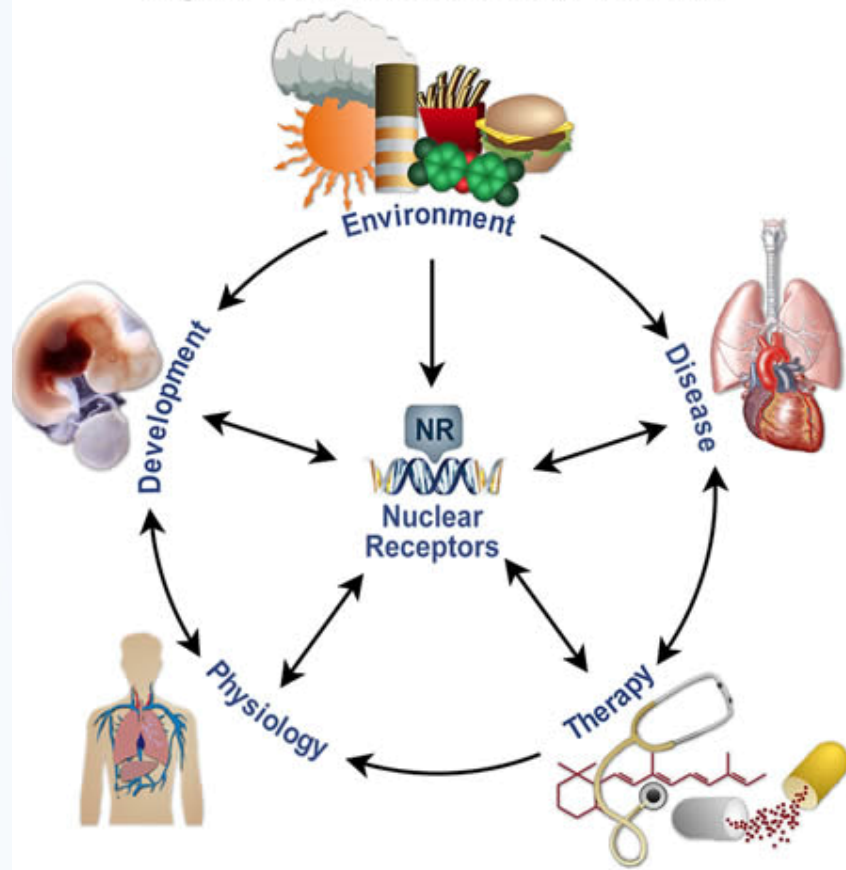
Intracelulární (nukleární) receptory

Nukleární receptory
- přímo interagují s DNA
(transkripční faktory)

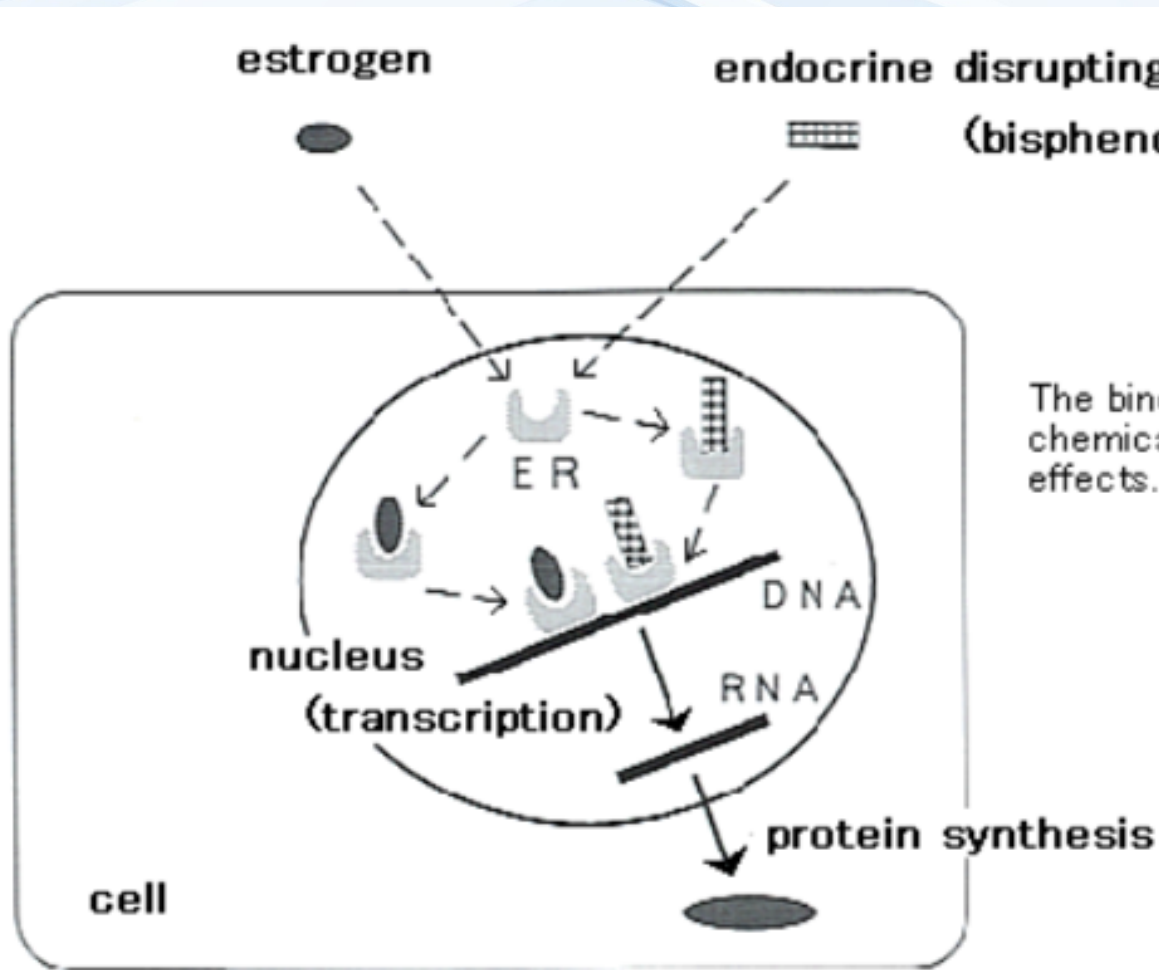


Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Figure 1. Nuclear Receptors:
Ligand Dependent Transcription Factors

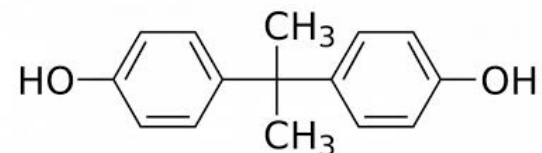


Toxické látky interferují s ligandy nukleárních receptorů

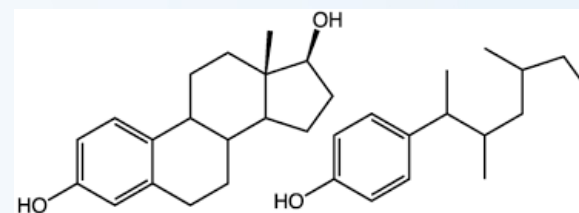


The binding of endocrine disrupting chemicals to ER results in estrogenic effects.

Bisfenol-a



Estradiol (přirozený hormon) a větvený nonylfenol



ER (estrogenní receptor)
= nukleární receptor

Intracelulární (jaderné) receptory - velký význam v ekotoxikologii !

Ligandy nukleárních receptorů – řada nízkomolekulárních hormonů
estrogeny, androgeny, thyroïdní hormony ...

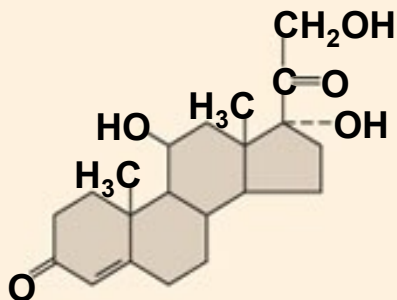
Organické toxické látky: strukturní podobnost s hormony (!)

→ Specifické mechanismy a účinky (*efekty při nízkých koncentracích*)

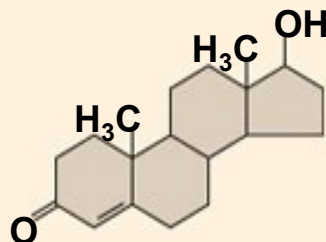
Důsledky: chronická toxicita velmi významných polutantů

- **persistentní látky** - PCBs, PCDDs/Fs, DDT,
- **ftaláty a další aditiva (bisfenol A)**
- **detergenty (nonylfenol)**
- nové typy pesticidů atd.

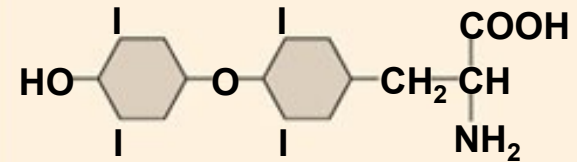
Cortisol (Hydrocortisone)



Testosterone



Thyroxine



Nukleární receptory významné v ekotoxicitě

AhR – receptor pro aromatické uhlovodíky (arylhydrocarbon receptor)

ER – estrogenní receptor

(také AR – androgenní receptor a další: prostudováno méně)

Aktivace AhR :

- není znám přirozený ligand, nejsilnějším ligandem TCDD (!)
- aktivace AhR vyvolává →
 - indukce detoxikačních enzymů (CYP1A1)
 - **hyperfosforylace regulačních enzymů**
 - proliferace (! nádory), apoptóza (*imunotoxicita*) ...

Aktivace ER

- přirozeným ligandem ER jsou estrogeny (17beta-estradiol atp.)
- efekty jsou závislé na typu buněk
 - proliferace (nádory), produkce hormonů, změny aktivit ...
- nefyziologická hyperaktivace ER
 - **xenoestrogenita** (významný proces *endokrinní disrupce*)

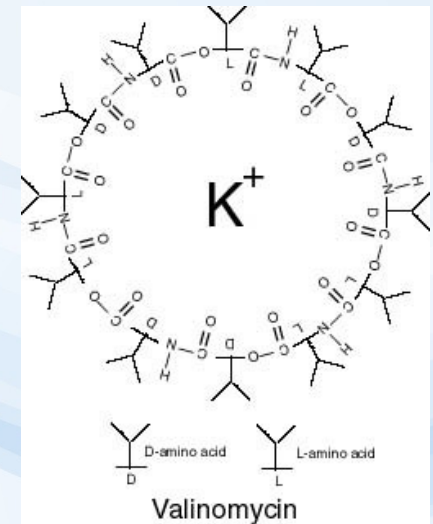


Změny gradientů na membránách – IONOFORY

- v buňce se přirozeně udržují gradienty iontů
(*plazmatická membrána, ER, mitochondrie*)

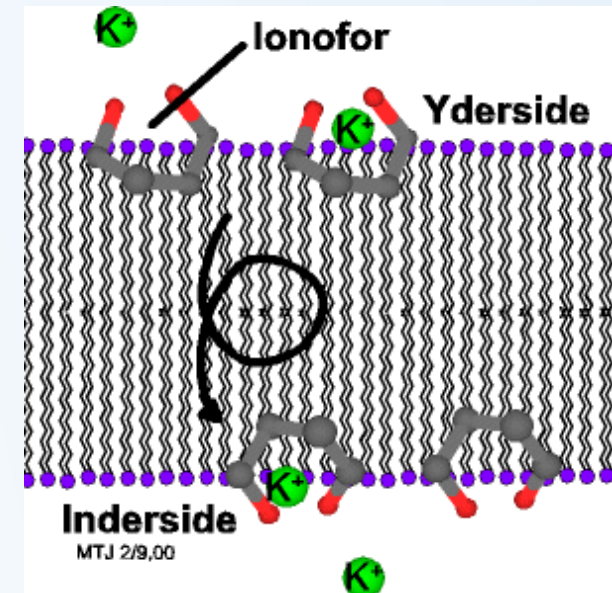
Význam gradientů:

- zajištění semipermeability
- zajištění správného signálování (Na^+/K^+ , Ca^{2+})
- gradienty H^+ pro tvorbu ATP



Toxické látky narušující gradienty

- **ionofory** - usnadněný přenos iontů (např. antibiotika)
- **další mechanismy** – viz dříve
 - rozpojování toku elektronů z respiračních řetězců (chinony)
 - blokace přenosu v respiračních řetězcích (kyanidy)



Shrnutí

Přehled mechanismů:

ke každému znát principy, důsledky, příklady chemických látek

Základní typy toxicity

Nespecifická toxicita

- nepolární narkotická toxicita (bazální toxicita)
- polární narkotická toxicita
- toxicita vyvolaná reaktivními látkami

Specifická toxicita

- inhibice enzymů, interakce s receptory apod.

Konkrétní příklady

- narušení přirozené fluidity membrány
- interakce látek s DNA
- inhibice enzymových aktivit
- narušení redox-potenciálu
- narušení gradientů na membránách
- kompetice se substráty / přirozenými ligandy



Příkladové otázky

- Co se rozumí pod pojmem receptor v toxikodynamice? Uveďte příklady
- Jaké molekulární interakce nastávají mezi toxickou látkou a cílovým místem? Popište princip hydrofobní interakce (atp.)
- Co je to agonista a antagonist? Co je to specifická a nespecifická inhibice enzymu?
- Vysvětlete na jakých vlastnostech látky závisí nepolární narkoza, genotoxicita atp.
- Popište co to je oxidativní stres, jak vzniká, jaké jsou jeho důsledky?
- Co je to acetylcholinesteráza? Jakou má funkci v organismu? Jaké jsou důsledky její inhibice? Jaké látky ji inhibují?
- Co je to estrogenní receptor? Vysvětlete proč je v toxicitě významnější než např. receptor pro inzulin?
- Jaké jsou důsledky mutagenity u člověka? Jaké jsou důsledky mutagenity u přírodních organismů?