



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 **nespecifického 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 **vybrané zásadní strukturní znaky**, které jsou odpovědné za konkrétní mechanismy působení

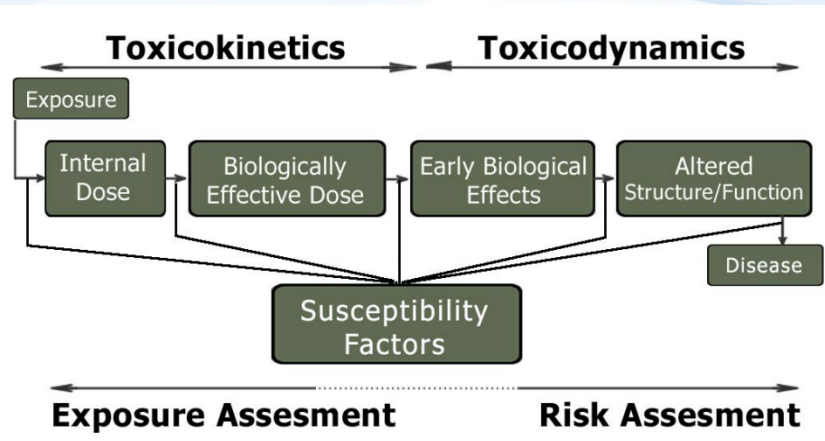


TOXIKODYNAMIKA

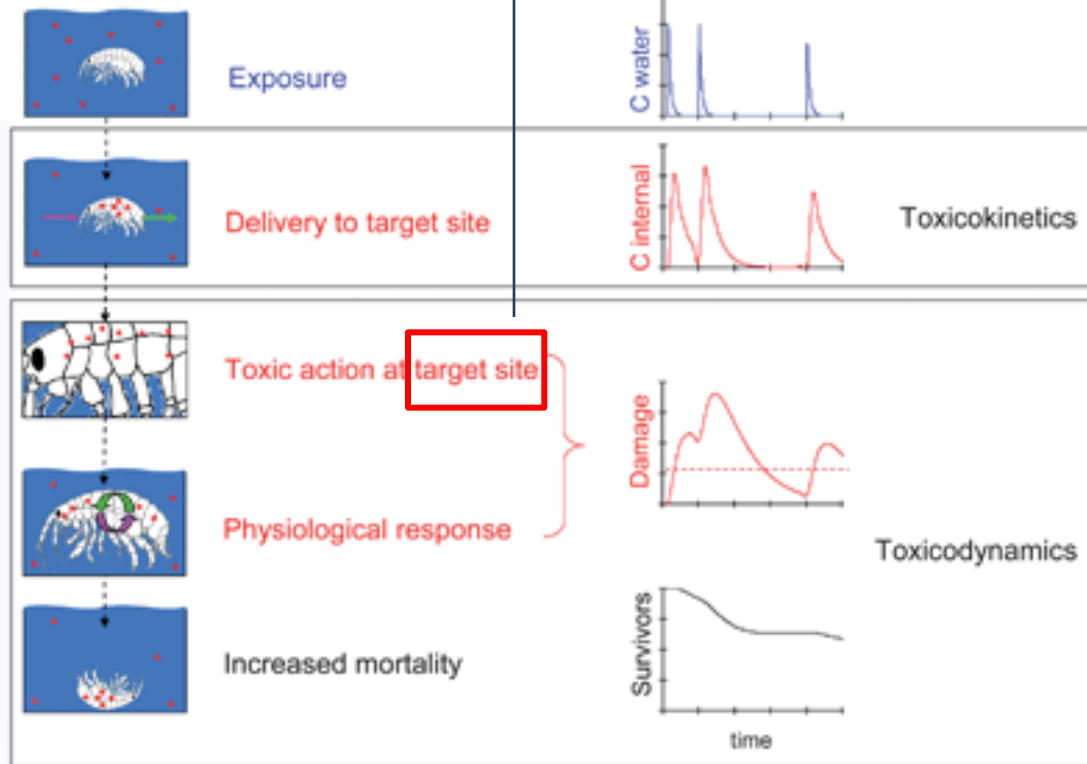
- *základní principy* -



ToxicoDYNAMIKA



Cílová místa = biologické makromolekuly
(DNA/RNA, proteiny, membránové P-lipidy)



MoA →



... and measurable **EFFECTS** →

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**
Primární jsou vždy chemické **interakce mezi dvěma chemickými látkami**

„RECEPTORY“ = cílové struktury = základní (makro)molekuly:

Proteiny

STRUKTURNÍ (tubulin apod.)

ENZYMY

TRANSPORTÉRY (v membráně, hemoglobin)

PROTEINOVÉ RECEPTORY

(v membráně i v cytoplasmě)

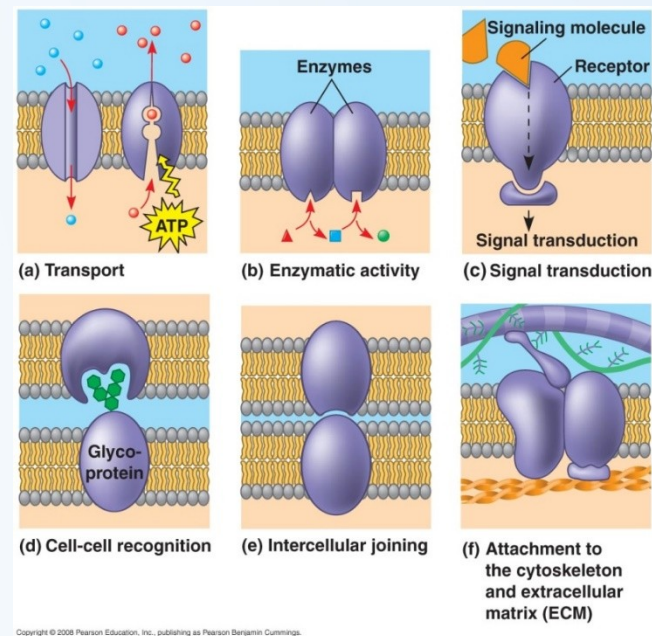
Nukleové kyseliny

Fosfolipidy

(Sacharidy – menší význam v eko/toxikologii)

Malé molekuly (antioxidanty, ATP, hormony + **voda**)

Ilustrace – příklady
funkcí proteinů
(jen jedna
podskupina -
membránové)



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

- DNA v jádře a v mitochondriích, mRNA a další Nukl.kyseliny

- ... a další



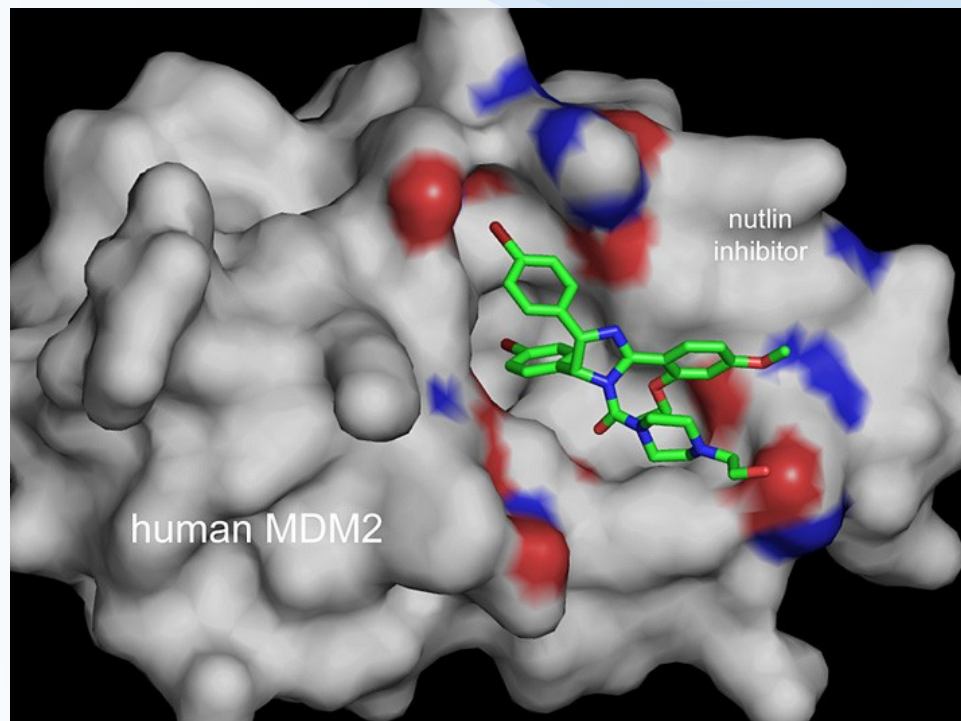
Typy interakcí („vazby“) mezi toxikantem a receptorem

-nekovalentní (viz příklad na následujícím snímku)
(reverzibilní)

vodíkové můstky
hydrofobní interakce
iontové interakce
van der Waalsovy interakce

-kovalentní
(zpravidla ireverzibilní)

- př. *inhibice acetylcholinesterázy organofosfátem...*
- *př. vazba na nukleotid*



Interakce mezi „receptory“ a malými molekulami (toxikanty)

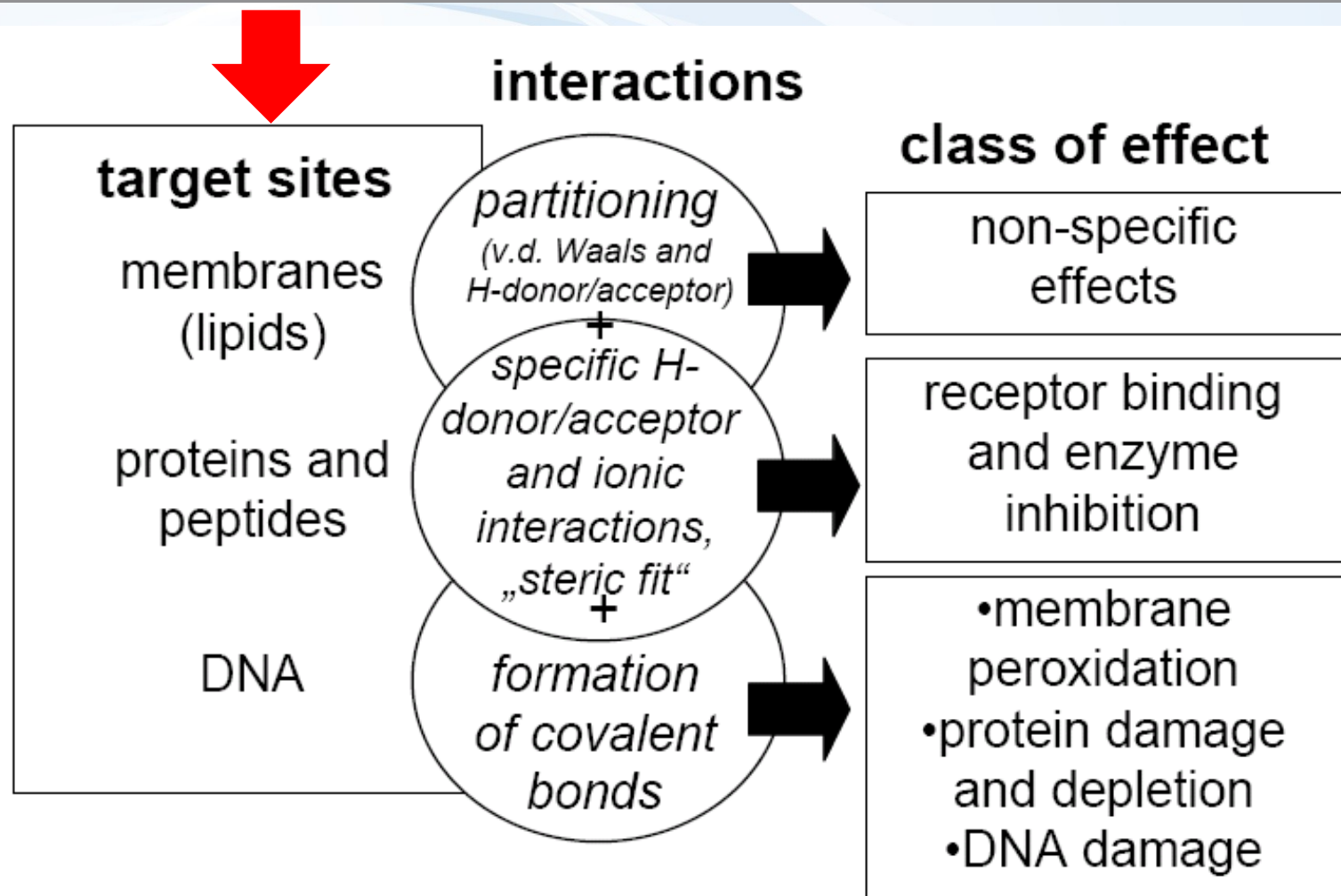


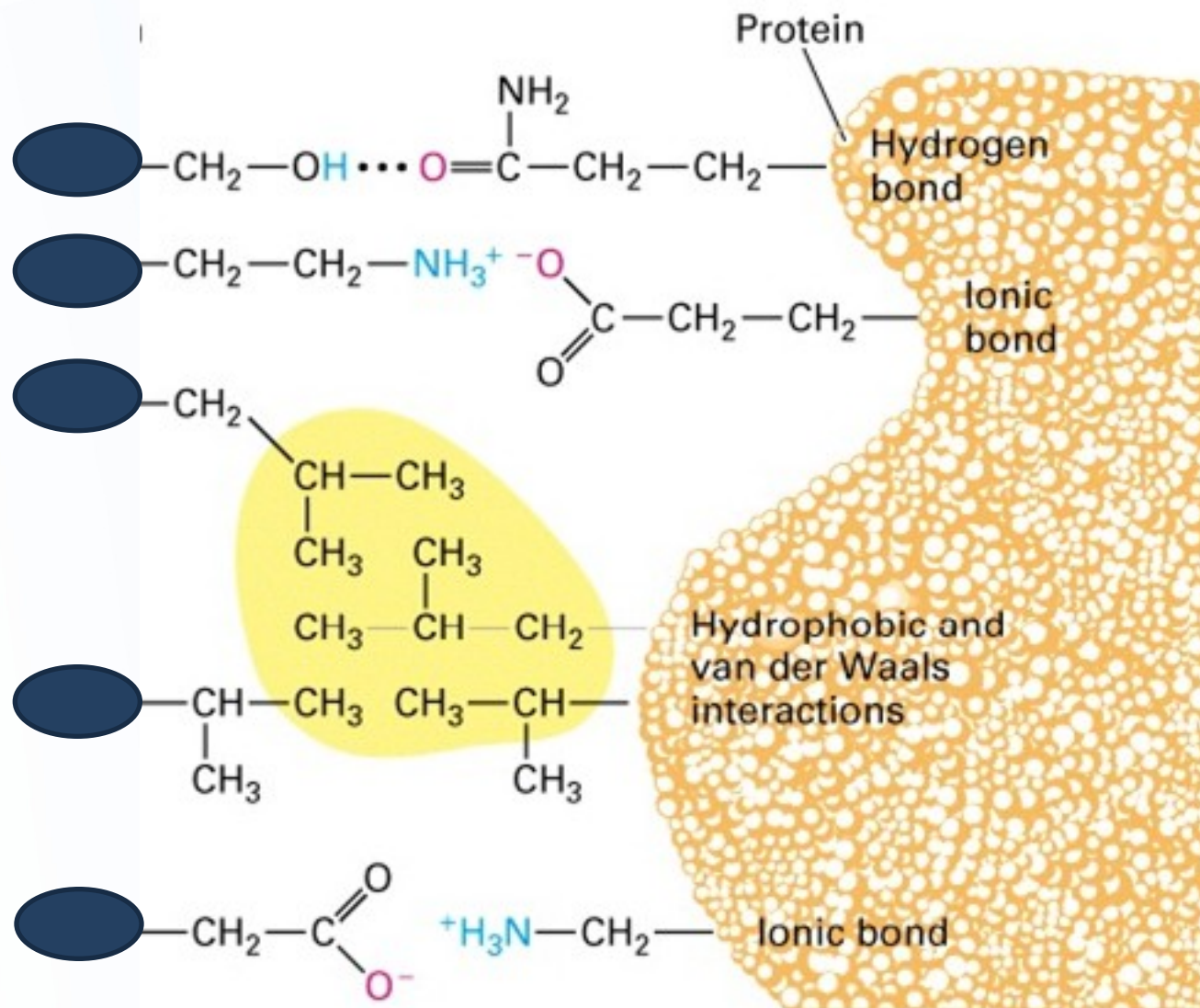
Figure 2 Rationale behind the classification of chemicals according to mechanism: target sites and type of interaction.



Typy interakcí mezi chemickými látkami

(příklad – interakce s proteinem)

Malé molekuly s různou strukturou - nesou funkční skupiny jako např. OH, NH₃ atd.

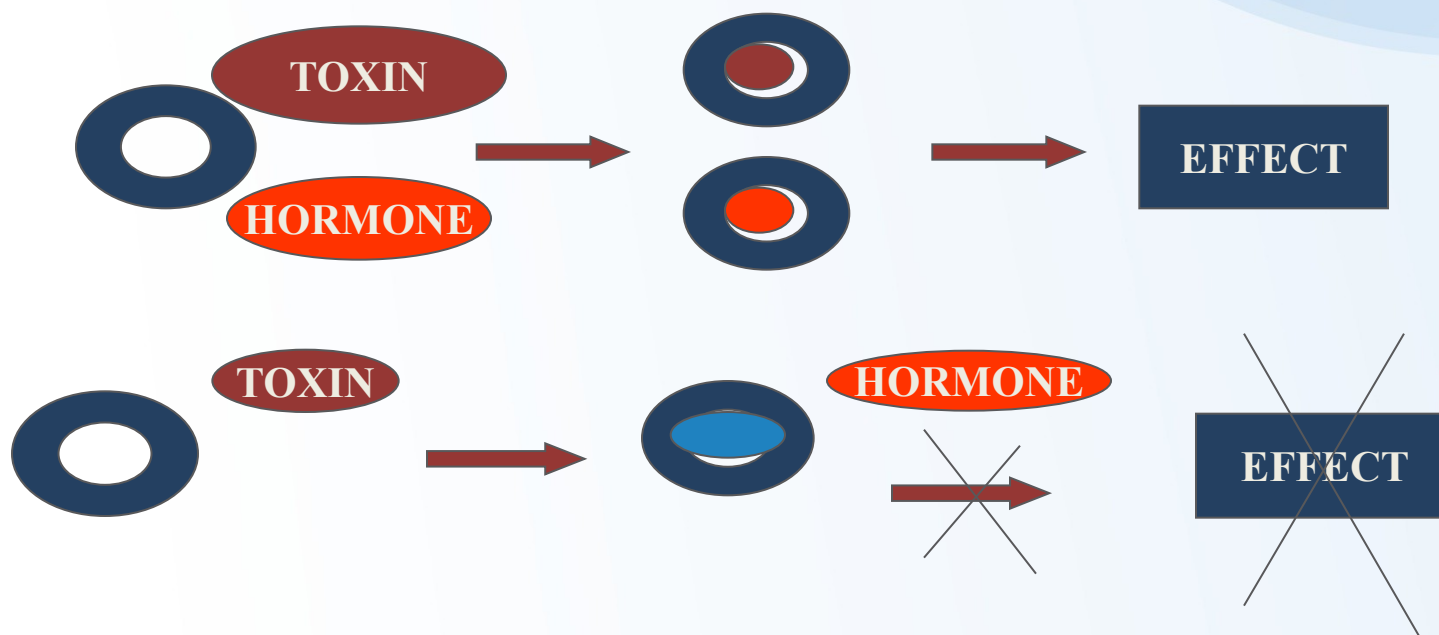


Copyright (c) by W. H. Freeman and Company



Interakce toxických látek s proteinovými cíli („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*)



Síla a účinnost interakce

Rychlost a síla interakce závisí na řadě parametrů, zejména:

- **Koncentrace** obou interagujících látek
 - ale určující je zpravidla **koncentrace toxikantu**: vyšší koncentrace než koncentrace receptorů (koncentrace látky je výsledkem toxokinetiky)

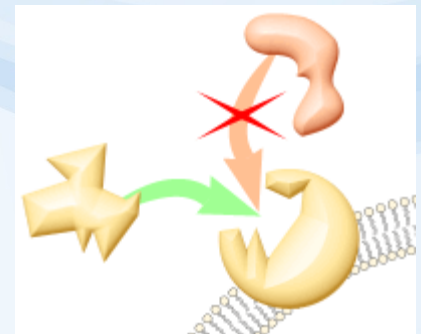
→ **Afinita** vazby „ligand-receptor“

: Chemická povaha interakce (iontové, kovalentní, hydrofobní atd),
popis afinity: disociační konstanty:

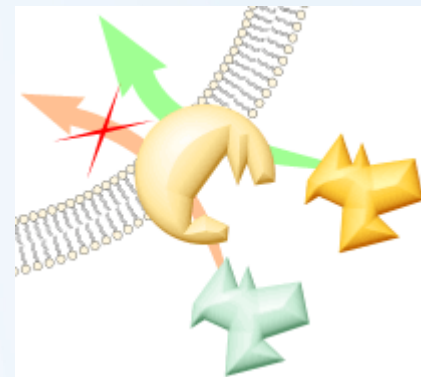
K_d (pro biologicky aktivní látky cca v rozmezí 10^{-8} M až 10^{-3} M)

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

: Vyjadřuje se často jako převrácená hodnota ($1/K_d$)



→ Toxicita (efekt) je pak dán **Účinností (efficacy) látky**
látky vyvolat příslušný efekt
(vysoká afinita (navázání) ještě nemusí receptor aktivovat:
agonisté vs antagonisté ...)



TOXIKODYNAMIKA - základní principy -

Jedná látka reaguje s mnoha různými cílovými strukturami („receptory“) v organismu !

Co určuje, která z mnoha „interakcí“ se projeví toxicky ?

Významné faktory ovlivňující projev chemicko-biologické interakce:

Koncentrace vs. rychlost toxického projevu interakce

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

Prostorové umístění a možnost kontaktu látky s receptory

embryo vs. dospělec

*insekticid: vysoká dávka - akutní toxicita -> žábry / smrt
nízká dávka je distribuována v těle a působí chronicky -> imunotoxicita*

Kd jednotlivých (různých) interakcí

organofosfát: specifická inhibice AcChE, velmi nízké Kd → specifické působení



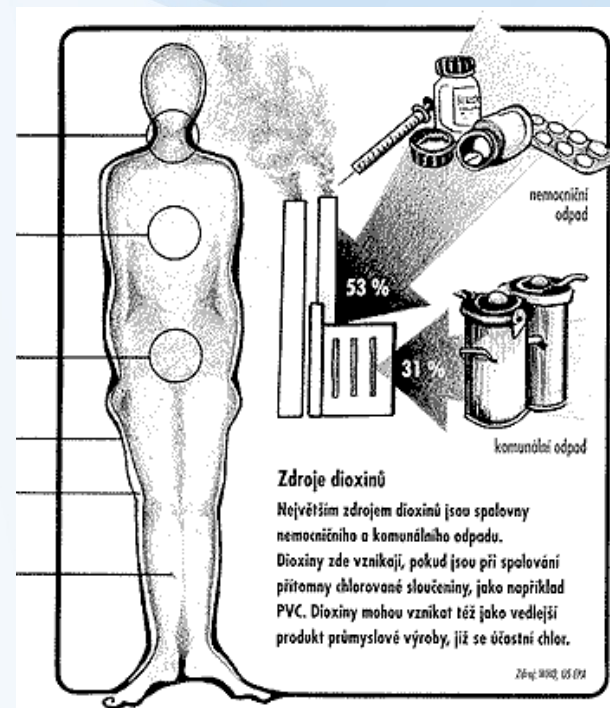
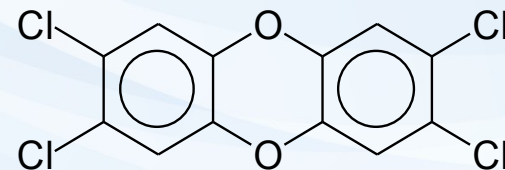
Příklad TCDD

interakce s mnoha receptory → mnoho různých projevů

Jedna látka reaguje s více „receptory“

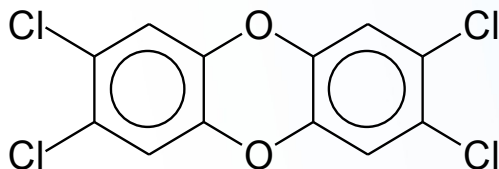
2,3,7,8-TCDD

- narkotická toxicita (**membrána**)
($K_d 10^{-6} M$) → akutní rychlá intoxikace – „chlorakné“
- modulace **estrogenity (ER)**
(pohlavní orgány $K_d 10^{-9} - 10^{-12} M$)
→ reprodukční poruchy/měsíce - roky
- indukce **AhR** (thymus, játra $K_d 10^{-12} - 10^{-15} M$)
→ nádor/měsíce – roky (karcinogenita, imunotoxicita)



Akutní (24h) toxicita TCDD vs další příklady

(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! Jedna makromolekula
→ opakovaná katalýza mnoha reakcí)*

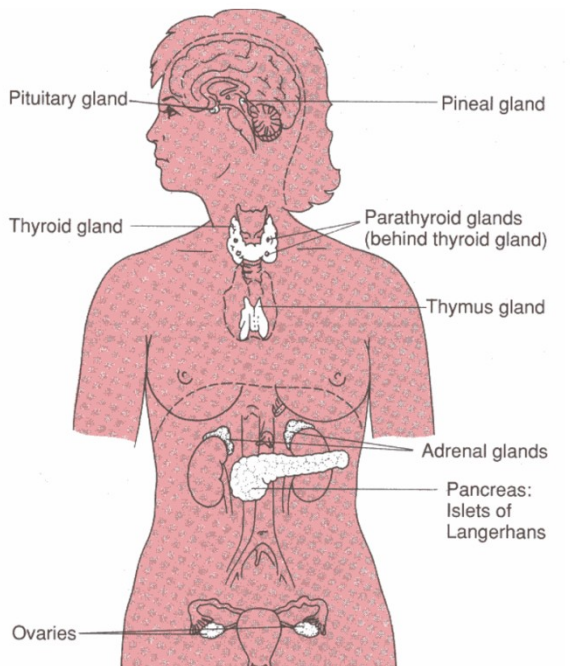
0,00000003



Různé typy (kategorie) mechanismů toxicity

- **Druhově-specifické mechanismy, příklady**
 - Toxicita pro fotosyntézu (rostliny) vs. teratogenita (obratlovci)
 - Endokrinní disrupce
 - Rozdílné řízení (a hormony) u bezobratlých a obratlovců
→ podobně látky → různé mechanismy toxicity

Growth in humans *several hormones*



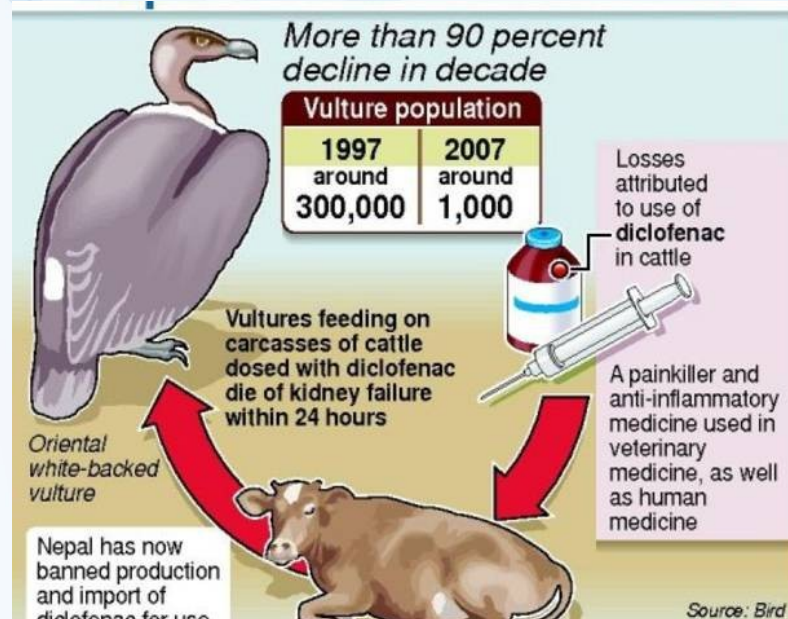
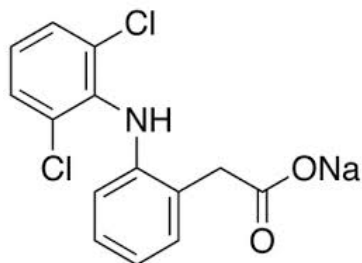
Growth in invertebrates ecdysis (moulting) - *ecdysteroids*



Různé typy (kategorie) mechanismů toxicity

- Orgánově specifické mechanismy (a účinky)

- hepatotoxicita; neurotoxicita; **nefrototoxicita**; hemotoxicita; imunotoxicita
- toxicita pro reprodukční orgány;



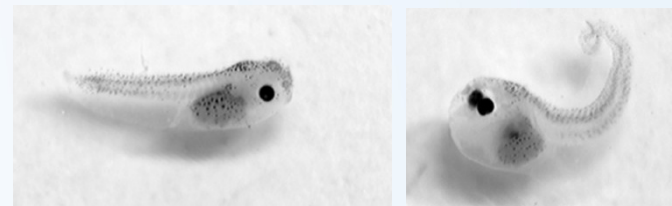
Vývojová (Developmental) toxicita

- embryotoxicita/teratogenita: toxicita pro buněčné procesy diferenciacie

Thalidomid

Toxiny sinic

(účinky na embrya obojživelníků)



Úvod do toxikodynamiky - 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 z následujících dvou má TCDD vyšší afinitu - k receptoru AhR nebo k hemoglobinu? U které interakce (dioxin-protein) bude vyšší K_d ?

Co je agonista? Co je antagonist?



Účinky látek na molekulární úrovni: mechanismy působení



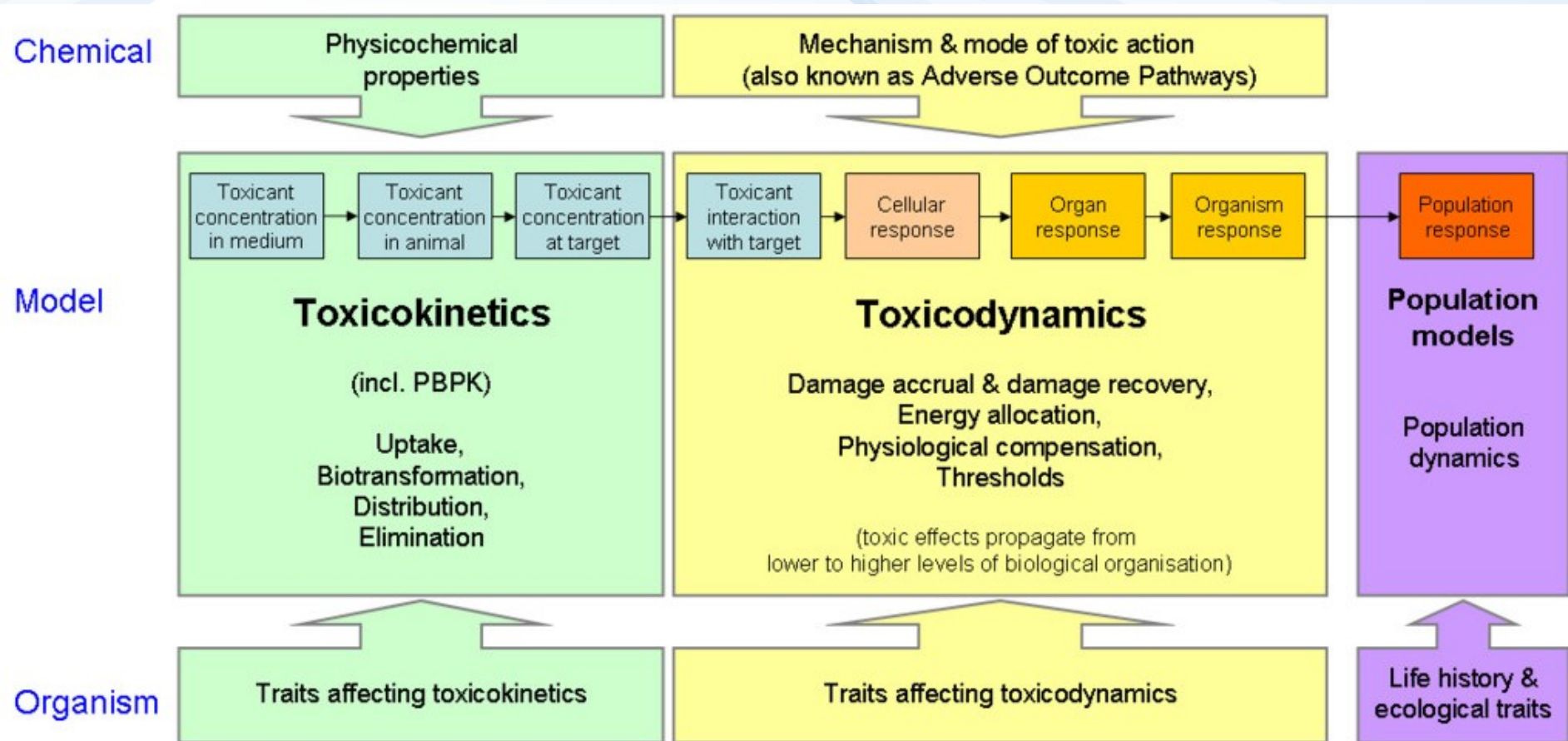
Co by si student(ka) měl(a) odnést ?

- 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) Cizorodé 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) Cizorodé 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) Cizorodé 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) Cizorodé organické látky mají toxické efekty **pro membránové fosfolipidy**
= nepolární narkotická toxicita (bazální toxicita, membránová toxicita)
projevy při relativně vysokých koncentracích, závisí na $\log K_{ow}$ (viz dále)
- 2) Kromě základní toxicity, mohou polárnější látky přímo působit **na membránové proteiny** = **polární narkotická toxicita**
projevy při nižších koncentracích než by odpovídalo $\log K_{ow}$
- 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**

Organické
látky →

Všechny organické látky
→ Membrány
(nepolární a polární narkoza)

Specifické
interakce:

Inhibice enzymů
(kompetitivní)
Modulace
(jaderných)
receptorů

Reaktivní toxicita

→ Všechny makromolekuly
(NK, proteiny, membrána)

: oxidativní stres,
mutagenita - acylace-/arylace
denaturace proteinů
(nekompetit. Inhibice
enzymů...)

Kovy →

: jiné procesy než u org.látek

: oxidace/redukce

→ toxicita



Membránová toxicita



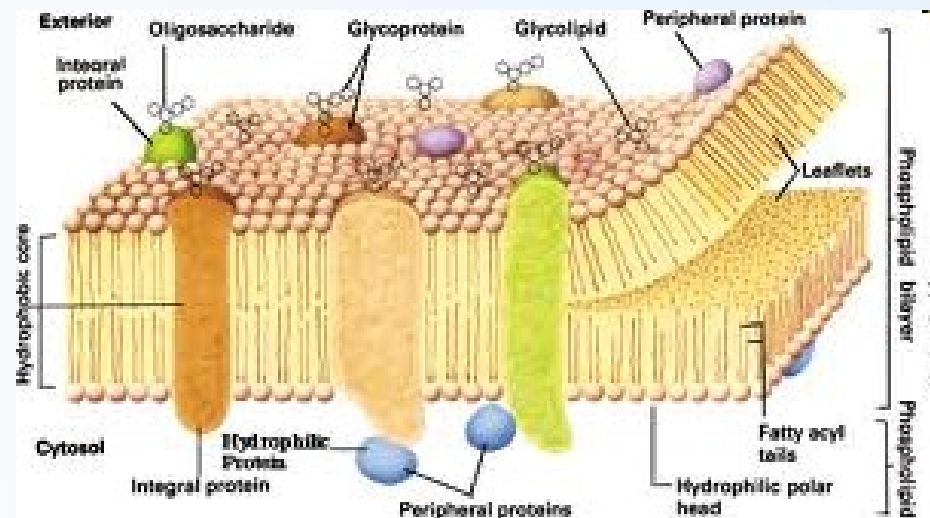
Mechanismus 1: Interakce s membránou

Narušení membrány

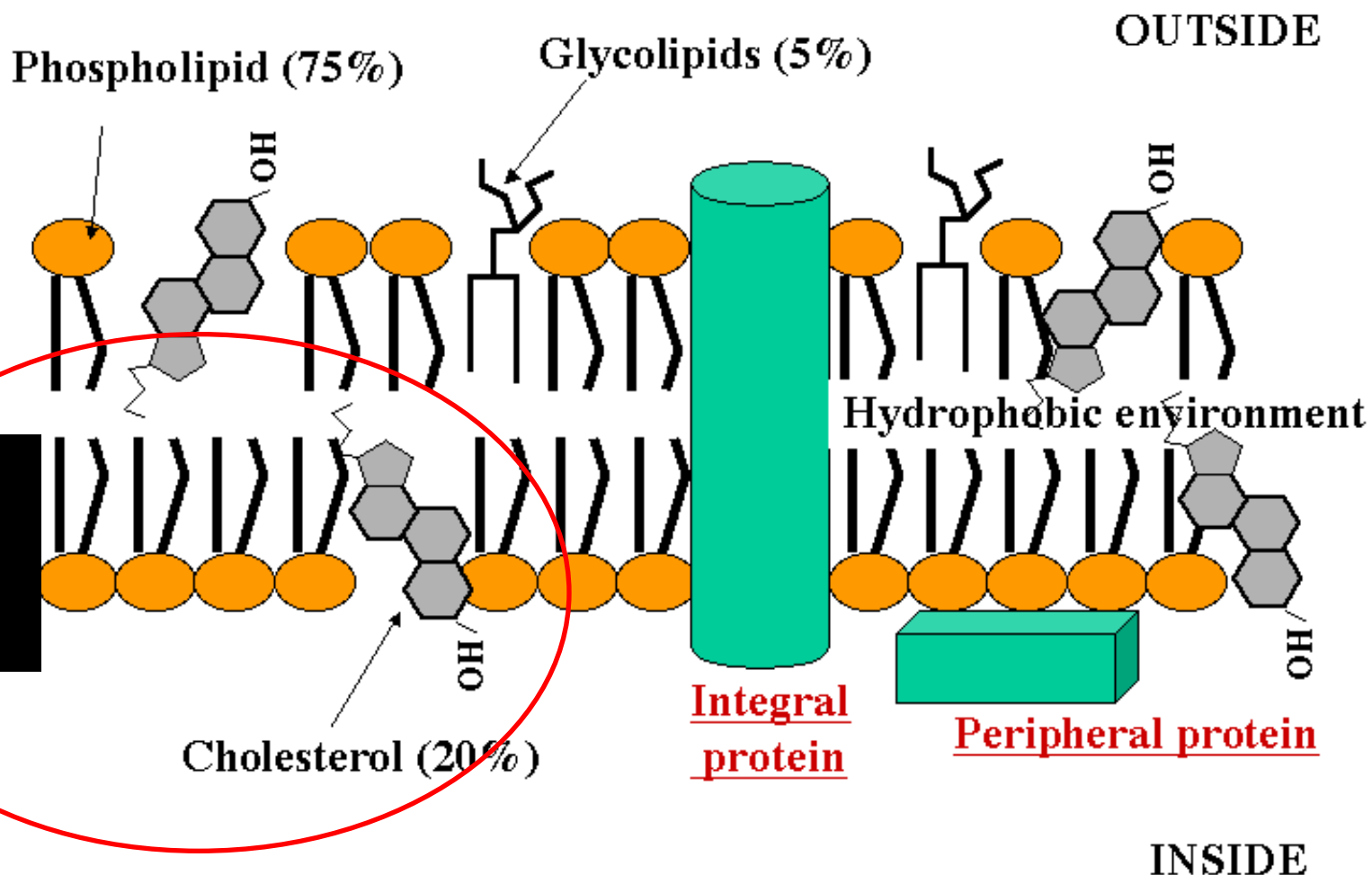
- základní toxicita (baseline toxicity) = narkoza (narcosis)
(*nejde o narkozu farmakologickou, kde se uvažuje velmi specifické působení na receptory na membránách*)

Zásadní význam v ekotoxicitě většiny organických polutantů

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



Plasma membrane



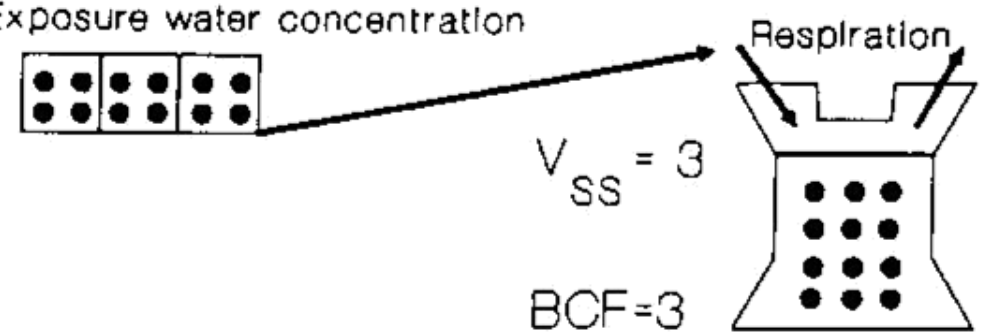
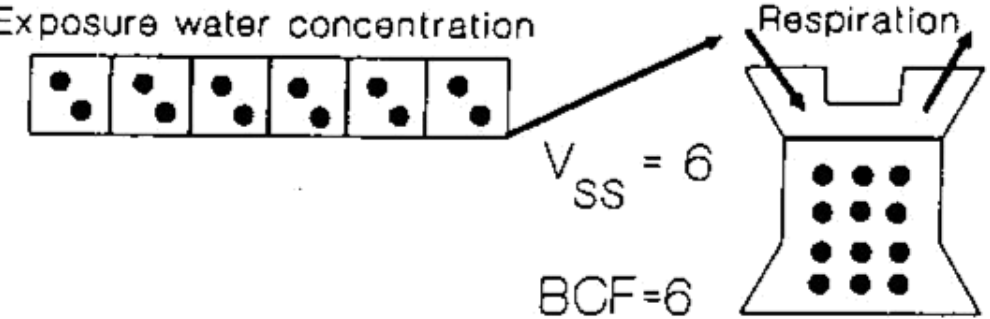
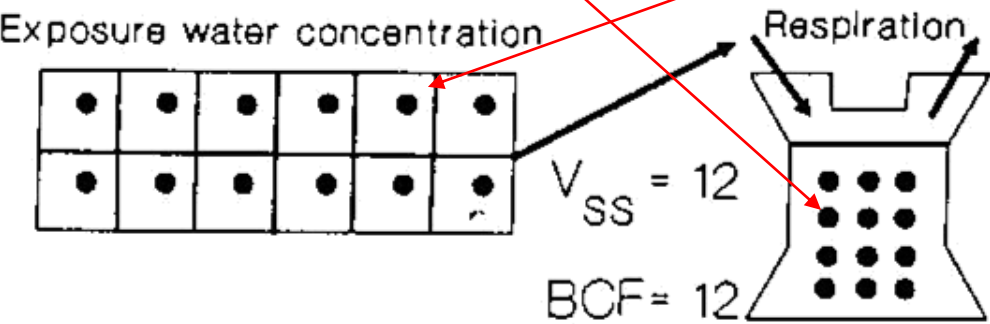
Poznámka: cholesterol - strukturně „velikostí“ obdobný jako jiné organické látky (PAHs, neutrální toxikanty...)



Princip narkotické toxicity (volume of distribution principle)

Látky z různou hydrofobicitou (BCF 3-6-12) vyvolají toxicitu když dosáhnou stejné koncentrace v membráně (12 molekul/jednotkový objem).

Pro více hydrofobní látky (BCF12) stačí nižší vnější koncentrace („1 molekula/objem“) aby látka vstoupila do organismu a akumulovala se v membránách až dosáhne „toxické“ koncentrace v organismu. Pro látky s nižší BCF je třeba větší vnější koncentrace. (Látky s vyšší BCF se jeví jako toxičtější - stačí nižší vnější koncentrace)



BCF – bioconcentration factor

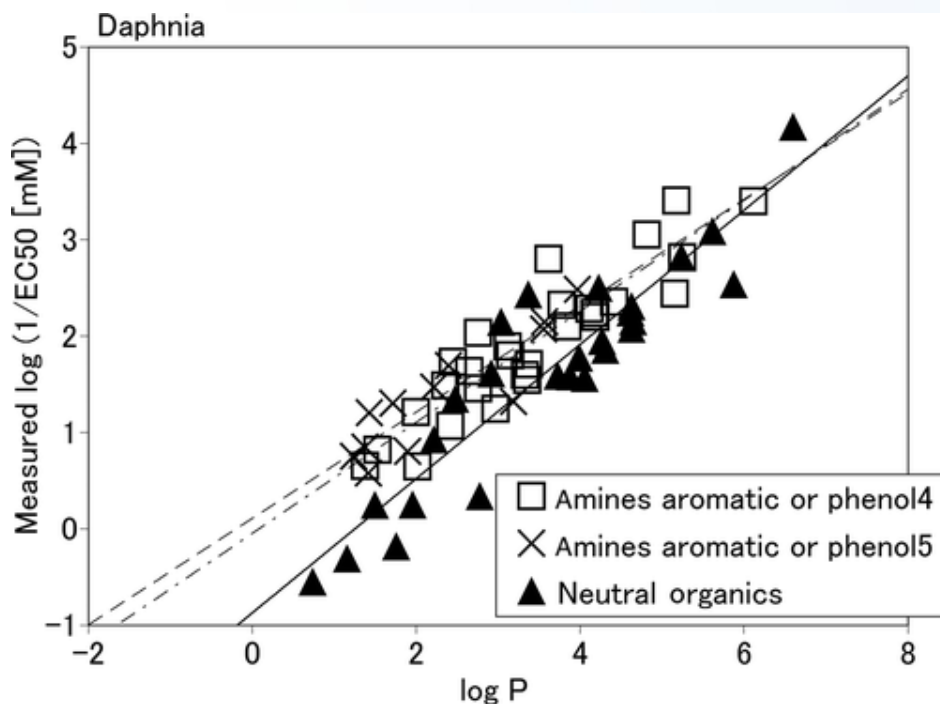
- * Depends on hydrophobicity (i.e. K_{ow})
- * Higher BCF → lower concentration is sufficient for bioconcentration to the same “tissue concentration” → lower external concentration (IC50) will induce toxic effect
- * Confirmed by chemical analyses (same molar concentrations of different compounds accumulated in membranes)

Narkotická (membránová toxicita)

→ důsledky a projevy

AKUTNÍ EKOTOXICITA

Prokázána lineární **korelace mezi $\log K_{ow}$ (=logP) a EC_{50}** u vodních organismů (např. *Daphnia*, ryby, planktonní řasy ...)



Obrázek:

Neutrální organické látky
→ Nepolární narkoza

Aminy (NH₂), fenoly (OH)
→ Polární narkoza
(při stejném $\log P$ je pozorována vyšší toxicita – tj. vyšší hodnoty $1/EC_{50}$ než u neutrálních látek)

Mutagenita a genotoxicita



DNA jako cíl toxikantů

- Základní molekula pro život
- Struktura a funkce jsou pečlivě kontrolovány
- Změny jsou rychle opravovány
- ... nevratné změny
→ fyziologická buněčná smrt: apoptóza

Mutagenese → MUTACE

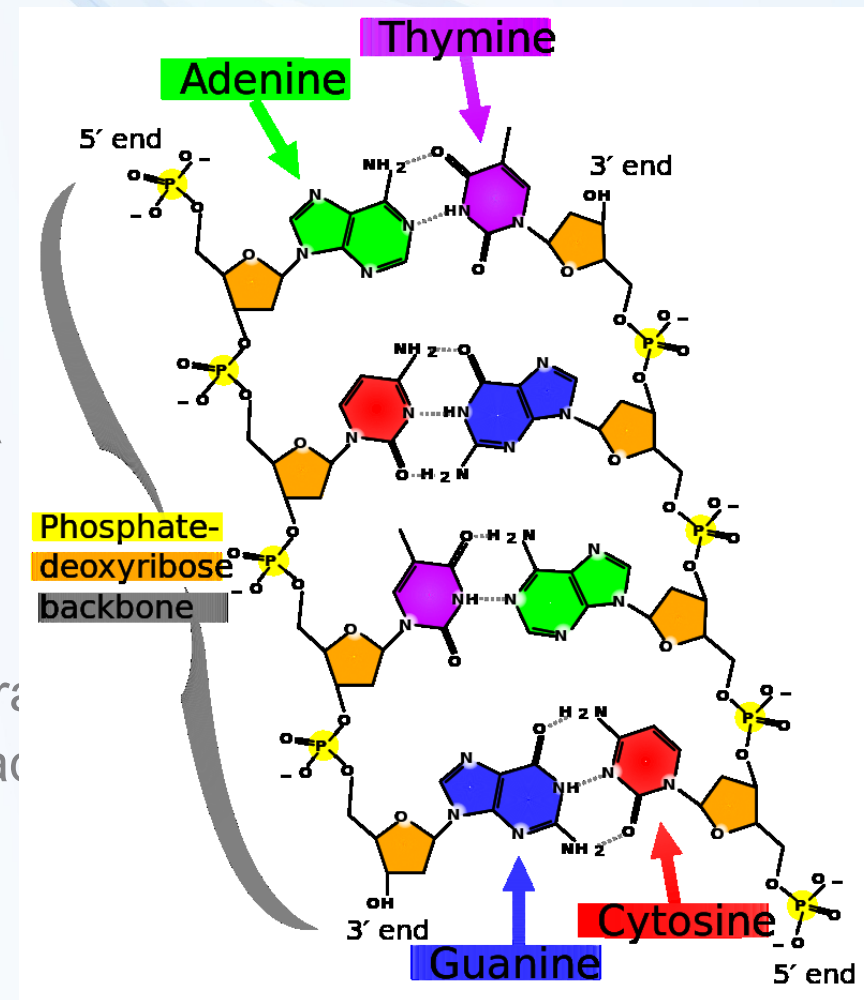
- biologická rozmanitost a evoluce
- změny struktury a kodování DNA

Mutace probíhají

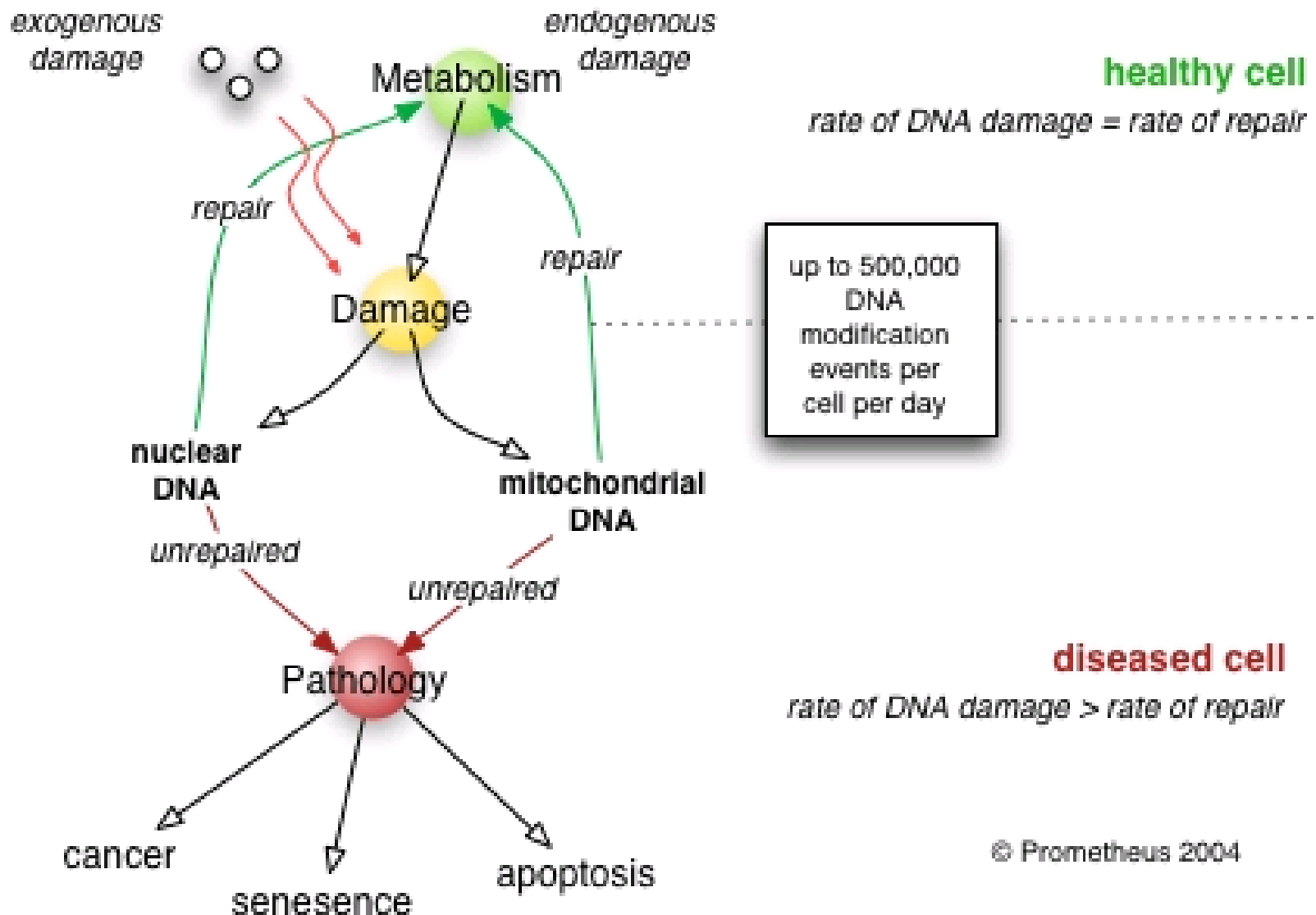
... přirozeně

miliardy událostí denně / většina opravena

... indukované stresem → toxické dopady



- Mutagenita a genotoxicita -



© Prometheus 2004



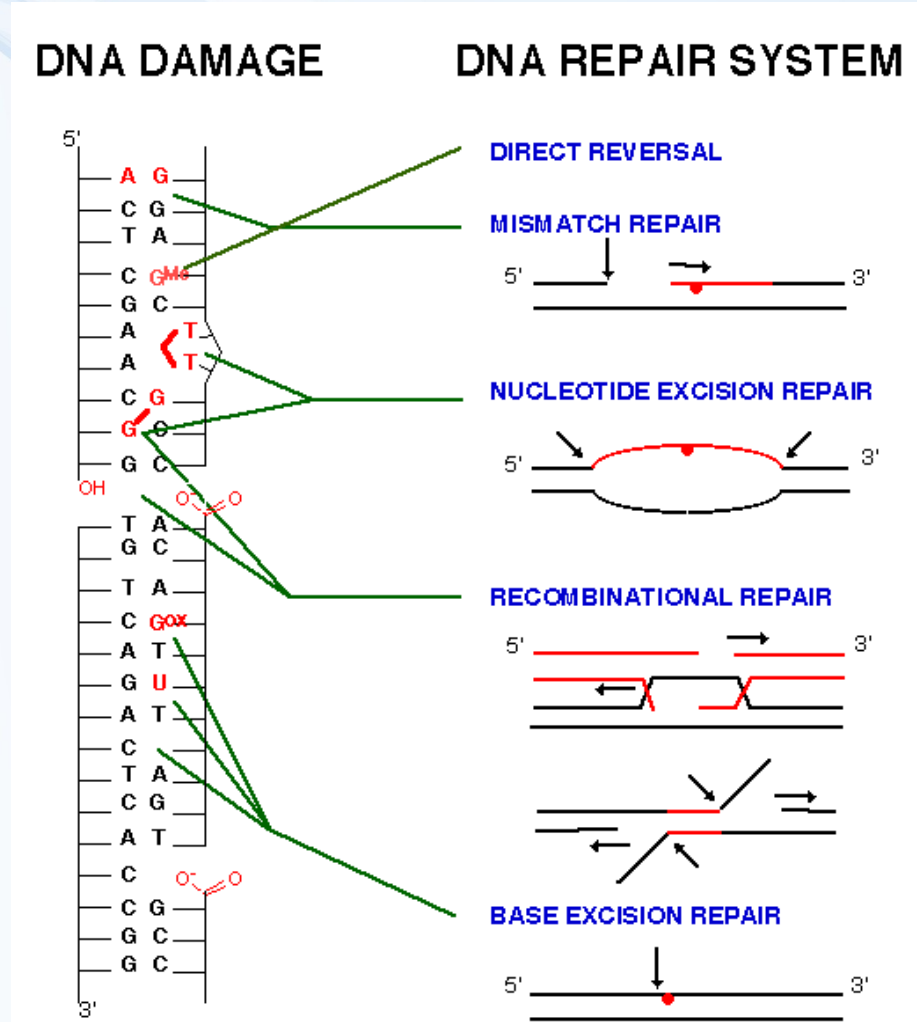
REPARAČNÍ MECHANISMY DNA

V organismu je trvale aktivní komplexní aparát **reparačních systémů**

(specifické komplexy enzymů pro různé typy změn na DNA)

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)



- 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

Pozn. terminologie není jednotná / přechody ...



- Mutagenita a genotoxicita – TYPY MUTACÍ -

1) Bodové mutace

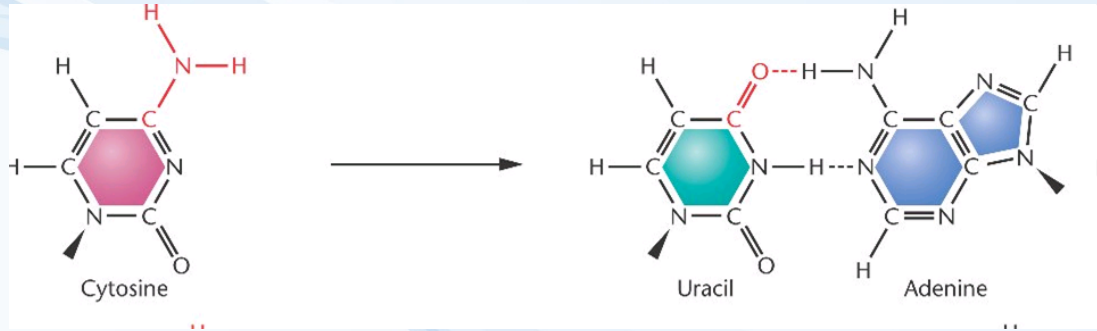
interakce toxikantu s nukleotidem
např. oxidace / deaminace

: záměny

změna v tripletu (jedna aminokyselina) → “úprava” funkce enzymu (NEBO nefunkční enzym → apoptóza)

: delece, adice

zpravidla změna čtecího rámce → vždy nefunkční enzym → smrt apoptozou



Insertion

5'	AUG	CGA	UUA	UAC	GGG	3'
	Met	Arg	Leu	Tyr	Gly	

↓

5'	AUG	CGA	UUA	UUA	CGG	G	3'
	Met	Arg	Leu	Leu	Arg		

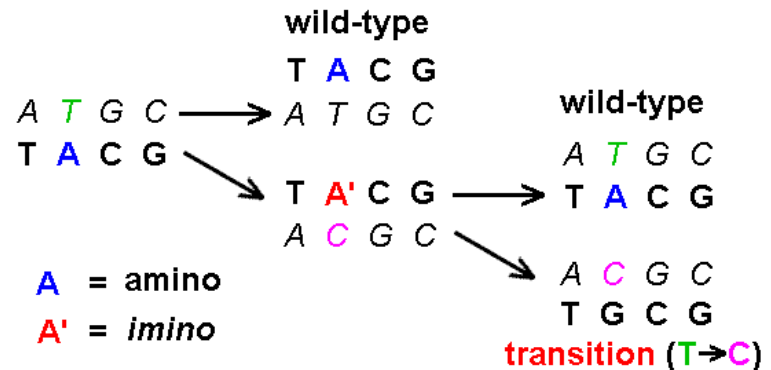
Deletion

5'	AUG	CGA	UUA	UAC	GGG	AAA	3'
	Met	Arg	Leu	Tyr	Gly	Lys	

↓

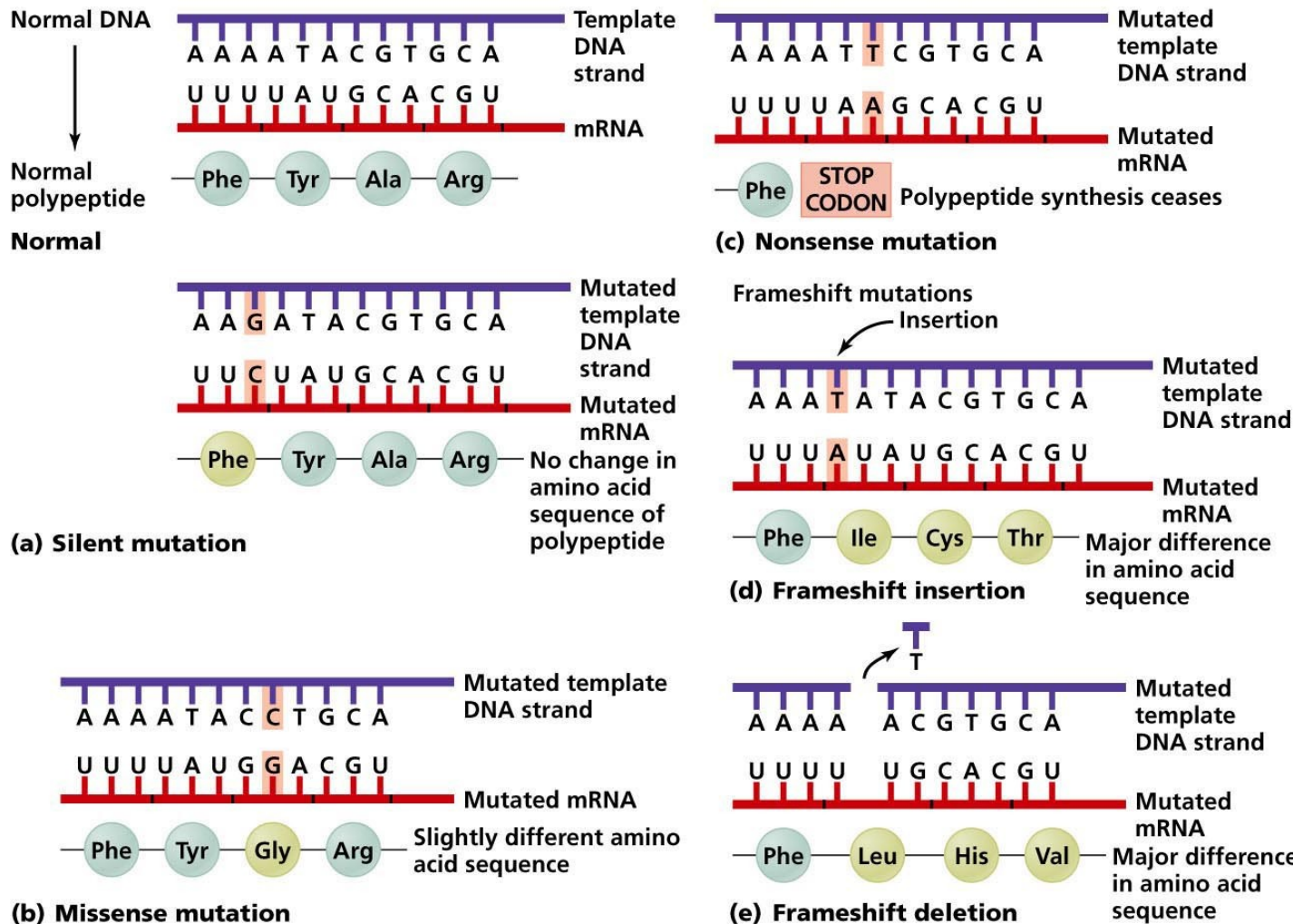
5'	AUG	CGA	UUA	UAG	GGA	AA	3'
	Met	Arg	Leu	Stop			

Záměna T (Purin) → C (Pyrimidin)



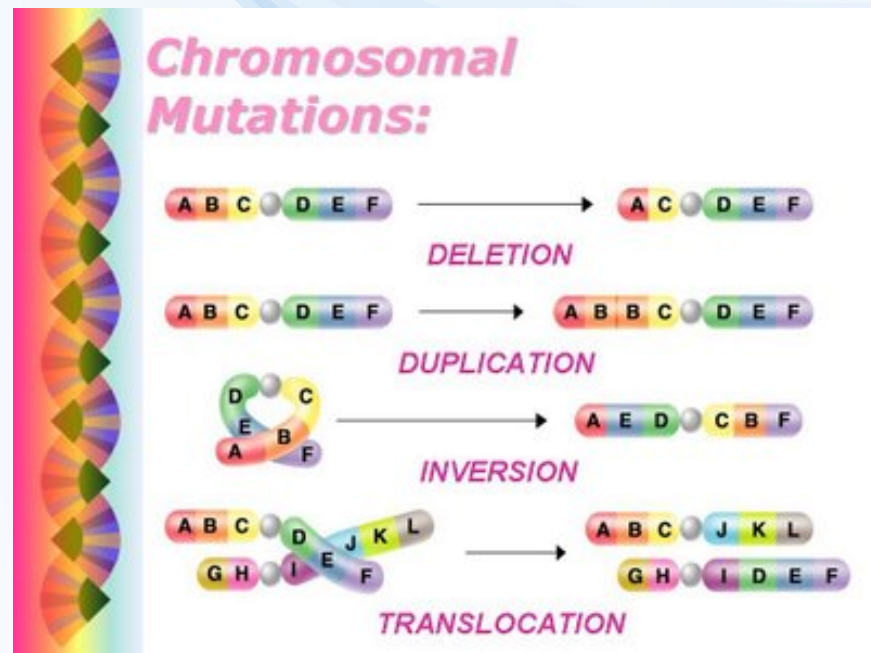
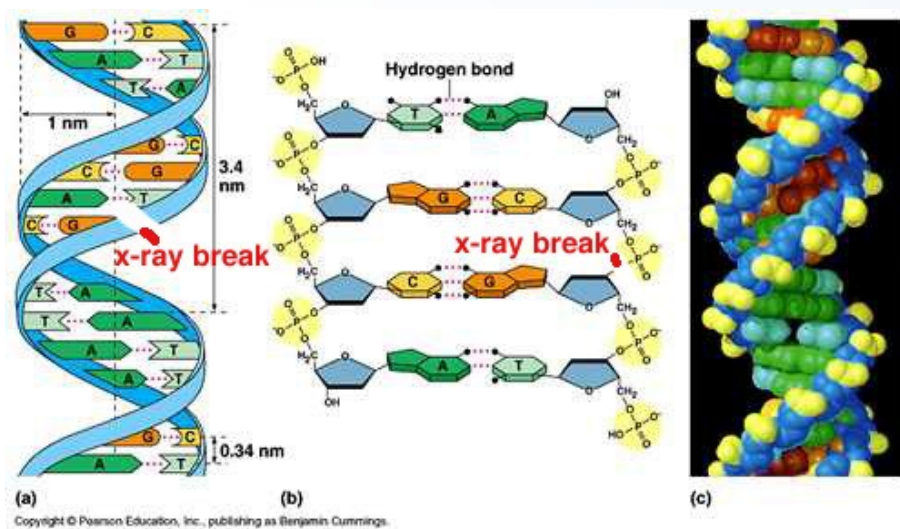
Důsledky bodových mutací

- (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)



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...)



Jaké látky (stresory) vyvolávají mutace? MUTAGENY

Fyzikální faktory

Ionizující záření

- přímá interakce s DNA
- nepřímé poškození DNA po interakci s vodou (nejčastější!)
 - tvorba OH*
 - (hydroxylový radikál a následně dalších ROS: viz oxidativní stres)

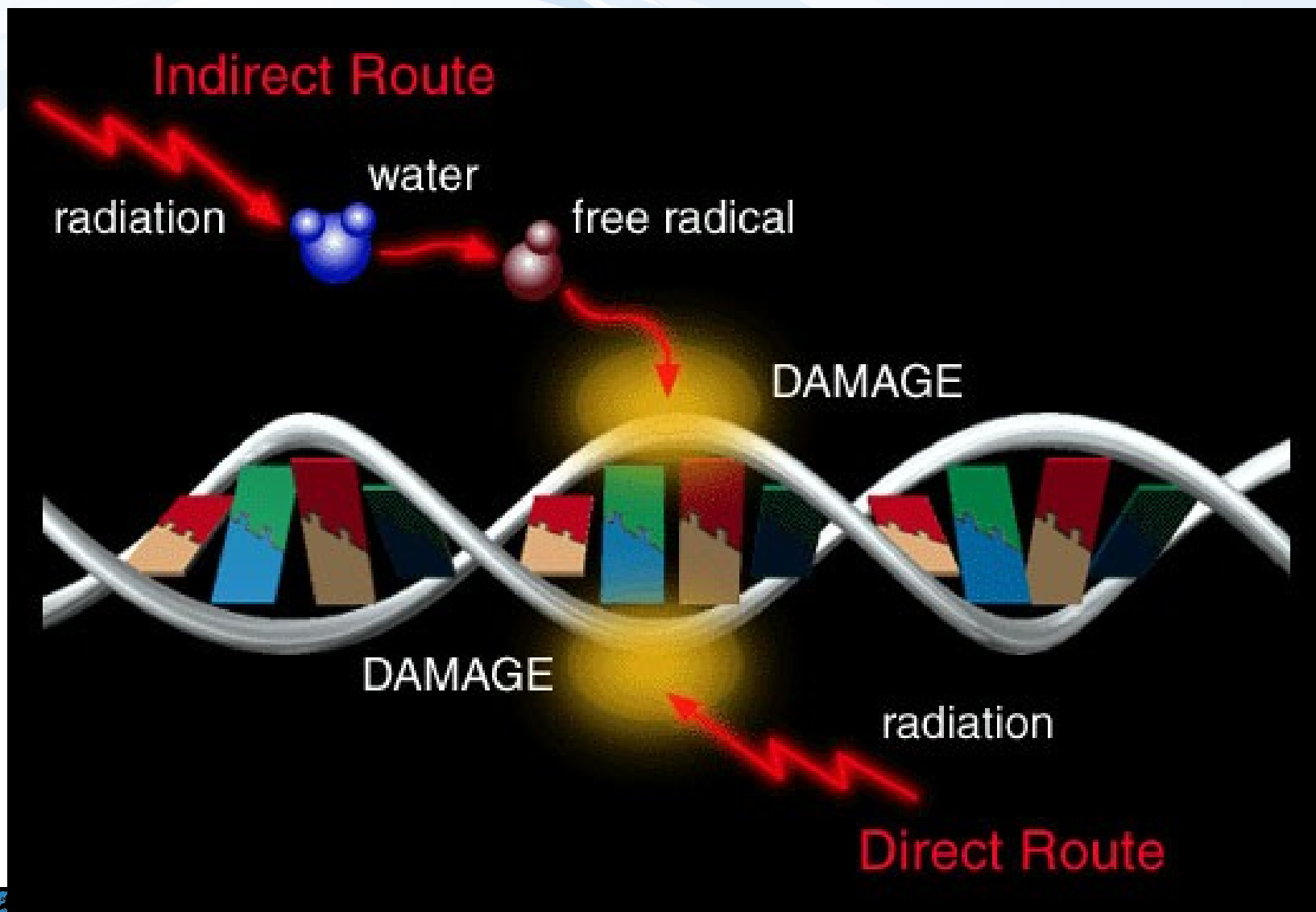
→ *Vážná poškození DNA včetně zlomů*

UV záření

- interakce s aromatickými bazemi
- vznik např. dimerů T=T

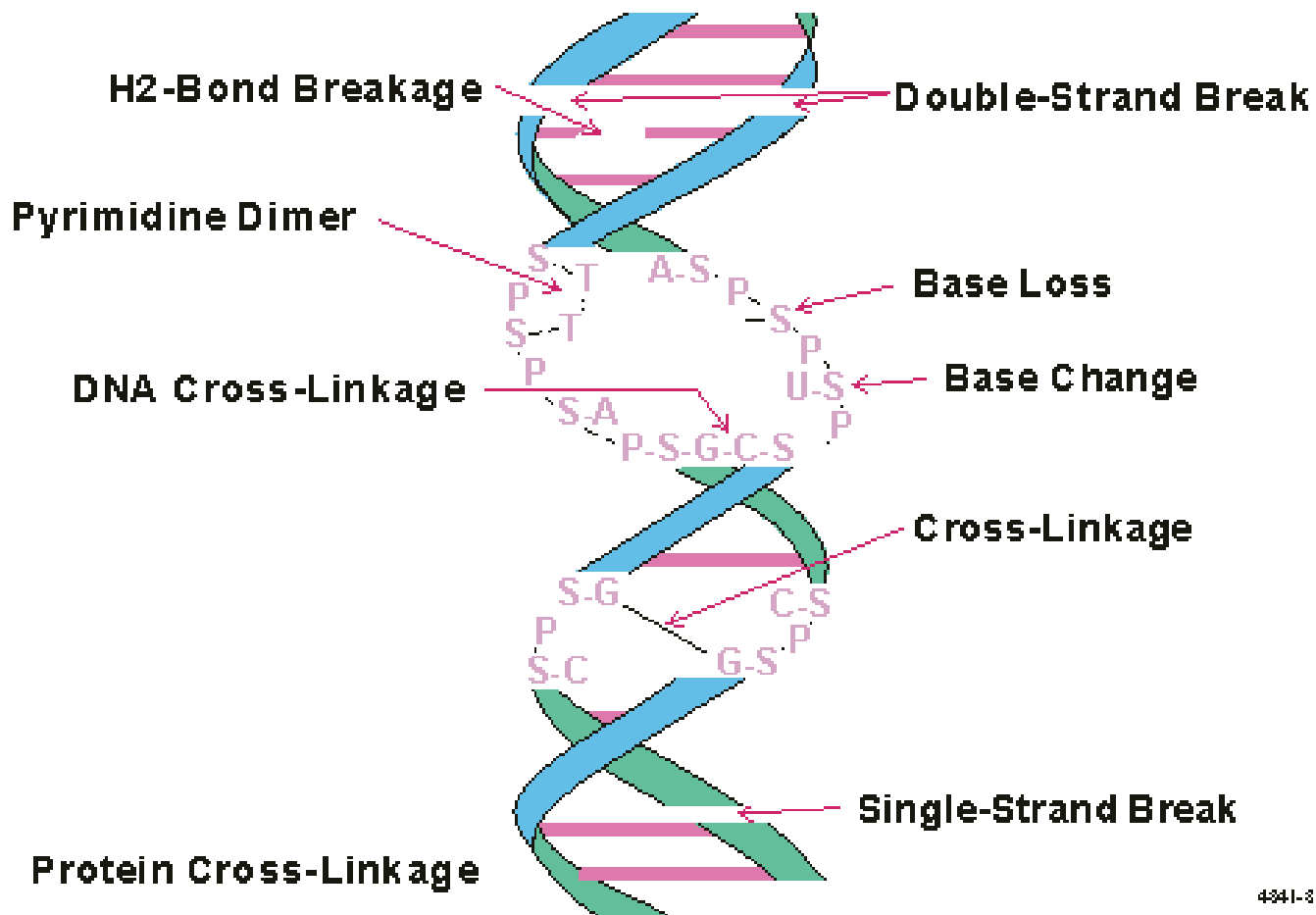


Mutagenita – ionizující záření



Různé typy poškození DNA

RADIATION DAMAGE TO DNA



4941-3



Mutagenita – volné radikály / oxidační stres

Produkty vznikající z vody a kyslíku

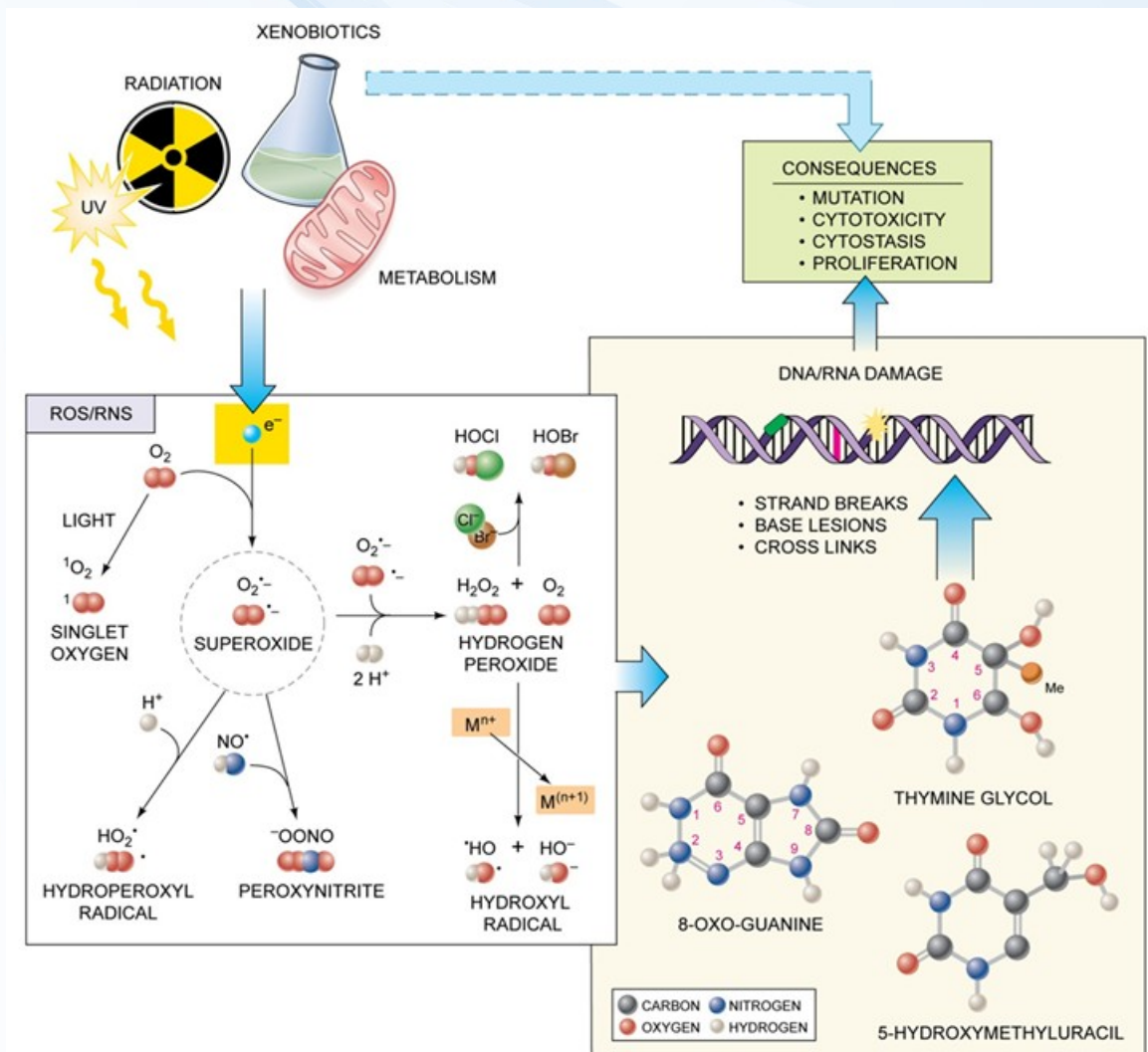
Voda - chemikálie s nejvyšší koncentrací,

Kyslík – silné oxidační činidlo

→ ROS

reactive oxygen species

viz dále – **mechanismus “oxidativní stres”**



Jaké látky (stresory) vyvolávají mutace? **Chemické mutageny**

1) Malé elektrofilní molekuly

(interakce s nukleofilními / bazickými místy ... m.j. v DNA)

2) Další reaktivní látky

* vnášejí alkyl-, aryl-, acyl- (alkylující, arylující, acylující)

* tvorba kovalentních aduktů

* Reakce mohou být

Nespecifické (mnohá protinádorová léčiva)

Stericky specifické („klíč-zámek“) - **interkalátory**

3) Analoga nukleotidů (analoga bazí)

* nahrazují přirozené nukleotidy během replikace

* změna kodování → nefunkční proteiny → apoptóza

Některé látky vyžadují „aktivaci“ (pro-mutagen → mutagen)

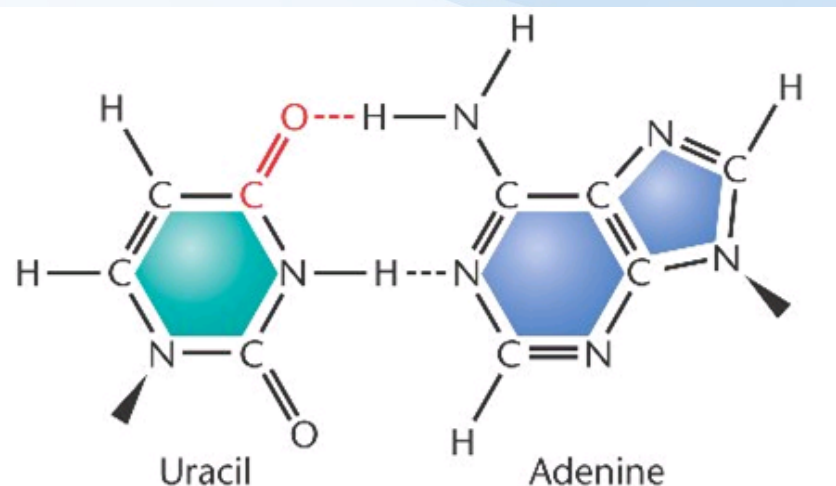


Malé mutageny: oxidace (deaminace) nukleotidů

HNO_2 , HSO_3^- Hydroxylamin (HO-NH_2), Methoxyamin ($\text{CH}_3\text{-O-NH}_2$)

Příklad – oxidace / deaminace

CG \rightarrow TA shift



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

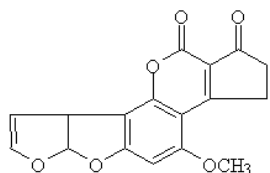
Aflatoxin B1 (po aktivaci CYP)

BaP (po aktivaci CYP)

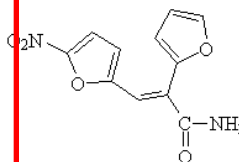
Alkylace

Nitrosomočovina

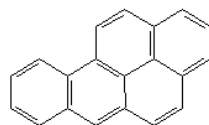
Cyklofosfamid



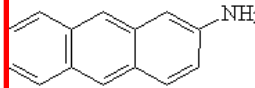
Aflatoxin B1 312.27



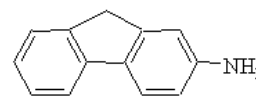
AF-2 (furylfuramide) 248.15



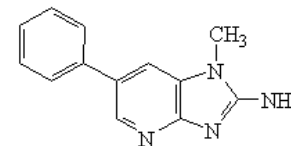
benzo[a]pyrene
(B[a]P) 252.31



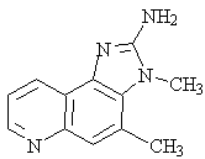
2-aminoanthracene
(2-AA) 193.24



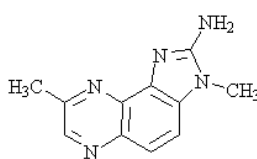
2-aminofluorene
(2-AF) 181.23



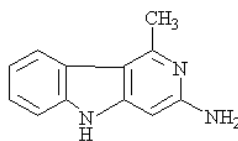
PhIP 224.26



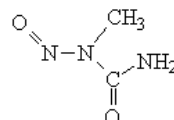
MeIQ 212.25



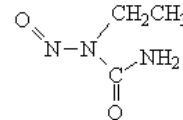
MeIQx 213.24



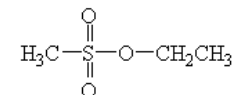
Trp-P-2 197.23



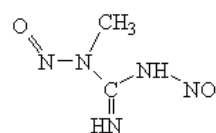
MNU 103.08



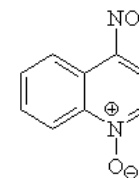
ENU 117.10



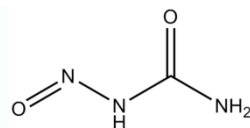
ethyl methane sulfonate
EMS 124.15



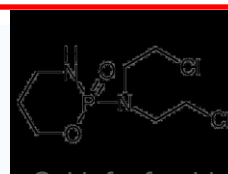
N-methyl-N'-nitro-
N-nitrosoguanidine
(MNNG) 147.09



4-nitroquinoline-1-oxide
(NQO) 190.15



Nitrosoformamide



Cyclophosphamide



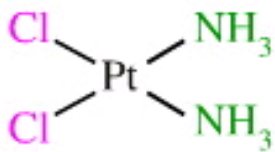
ALKYLUJÍCÍ mutageny

Kovalentní vazba na NK (alkylace bazí, tvorba crosslinků ... nejčastěji reakce s Guaninem:G)

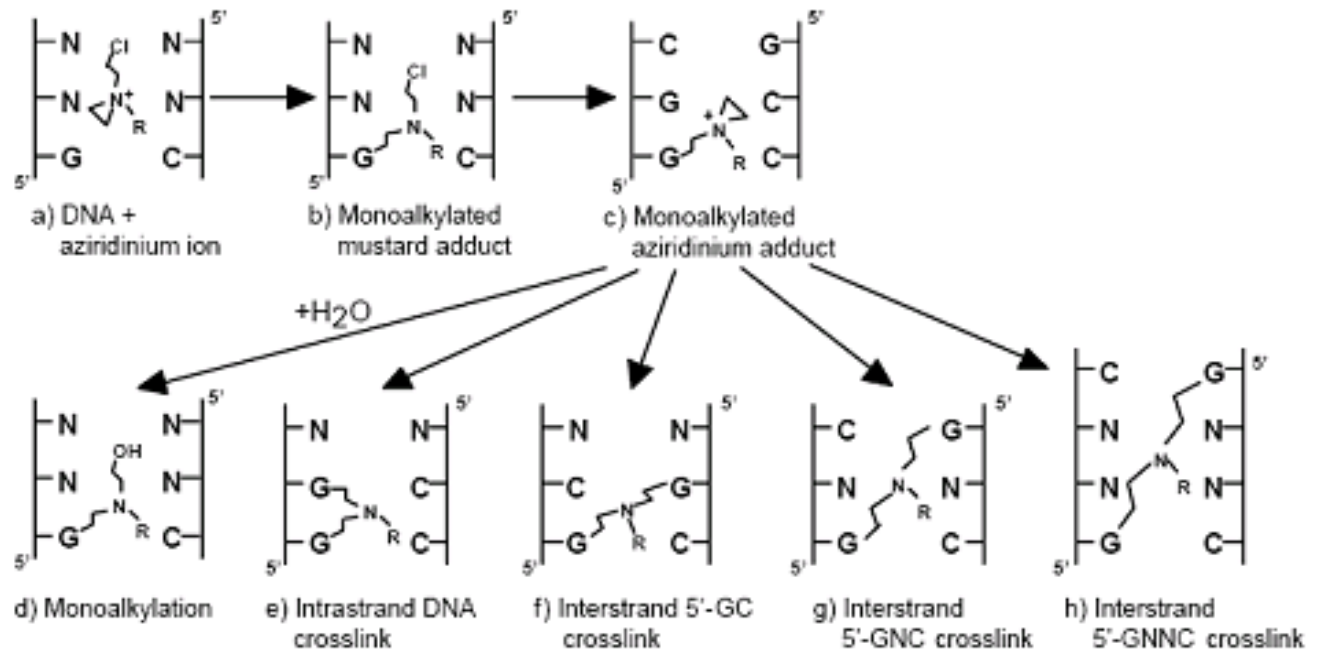
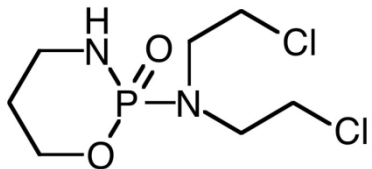
Alkylsulfáty, Nitromočovina, N-nitroso-alkyly

Cis-platina a Cyklofosfamid = protinádorová léčiva

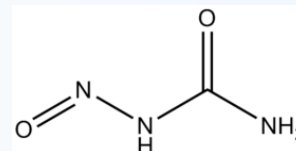
cisplatin



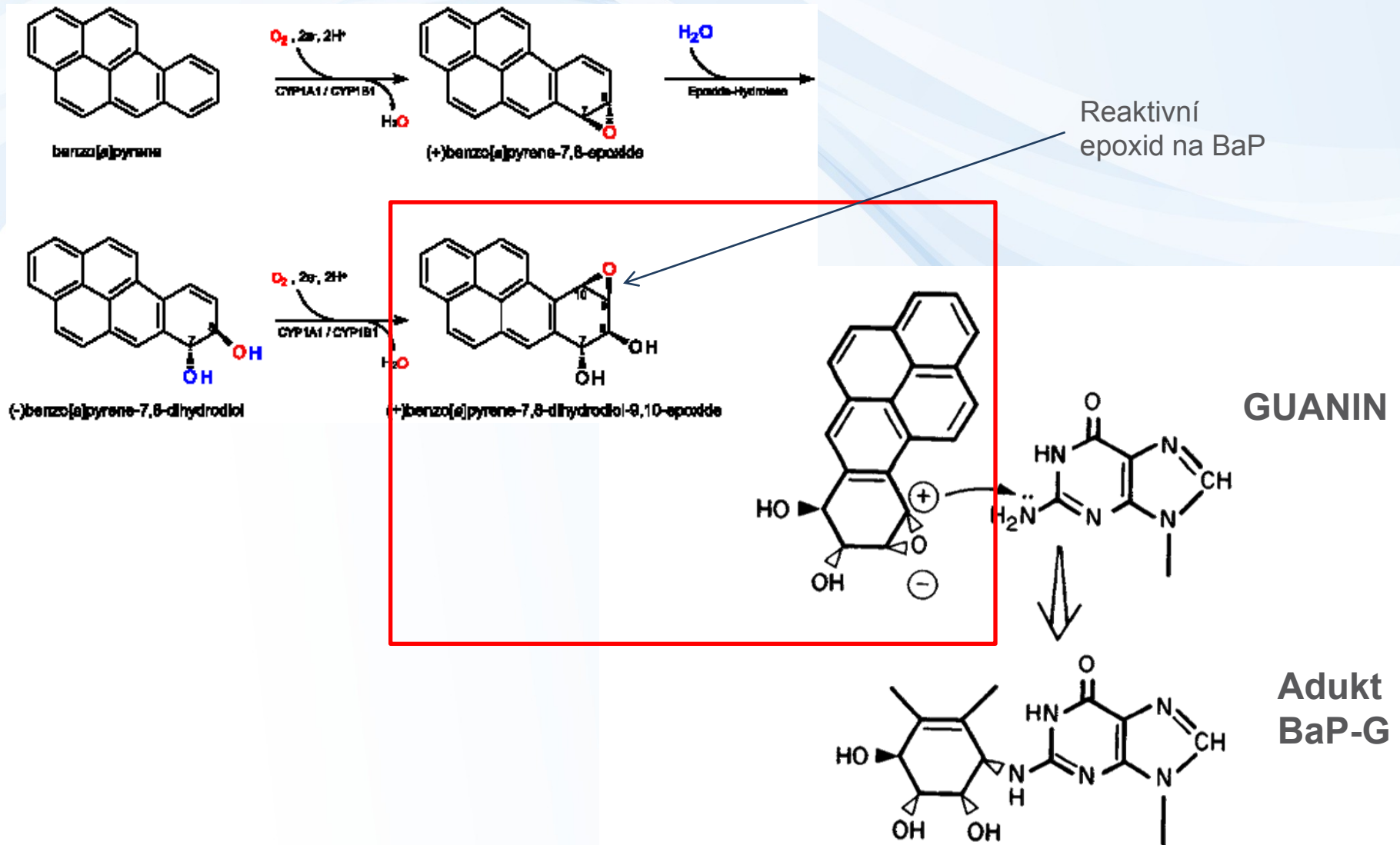
cyclophosphamide



Nitrourea
(Nitromočovina)



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.

Příklady ARYLUJÍCÍCH mutagenů (arylace)

Covalent binding, aromatic „adducts“ with bases
(see also discussion at biomarkers)

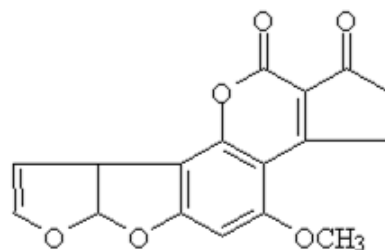
Mycotoxins (Aflatoxins) – requires activation

PAHs (benzo[a]pyrene) – requires activation

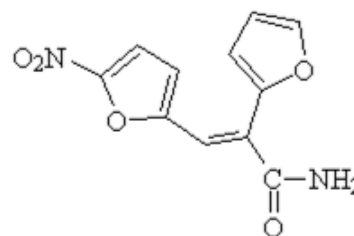
PAH derivatives

- **2-AA, 2-AF** (grill products)
- **NQO** – model mutagen in experiments

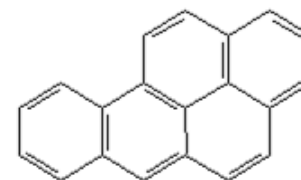
... many others



Aflatoxin B₁ 312.27



AF-2 (furylfuramide) 248.19



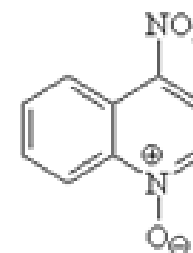
benzo[a]pyrene
(B[a]P) 252.31



2-aminoanthracene
(2-AA) 193.24



2-aminofluorene
(2-AF) 181.23

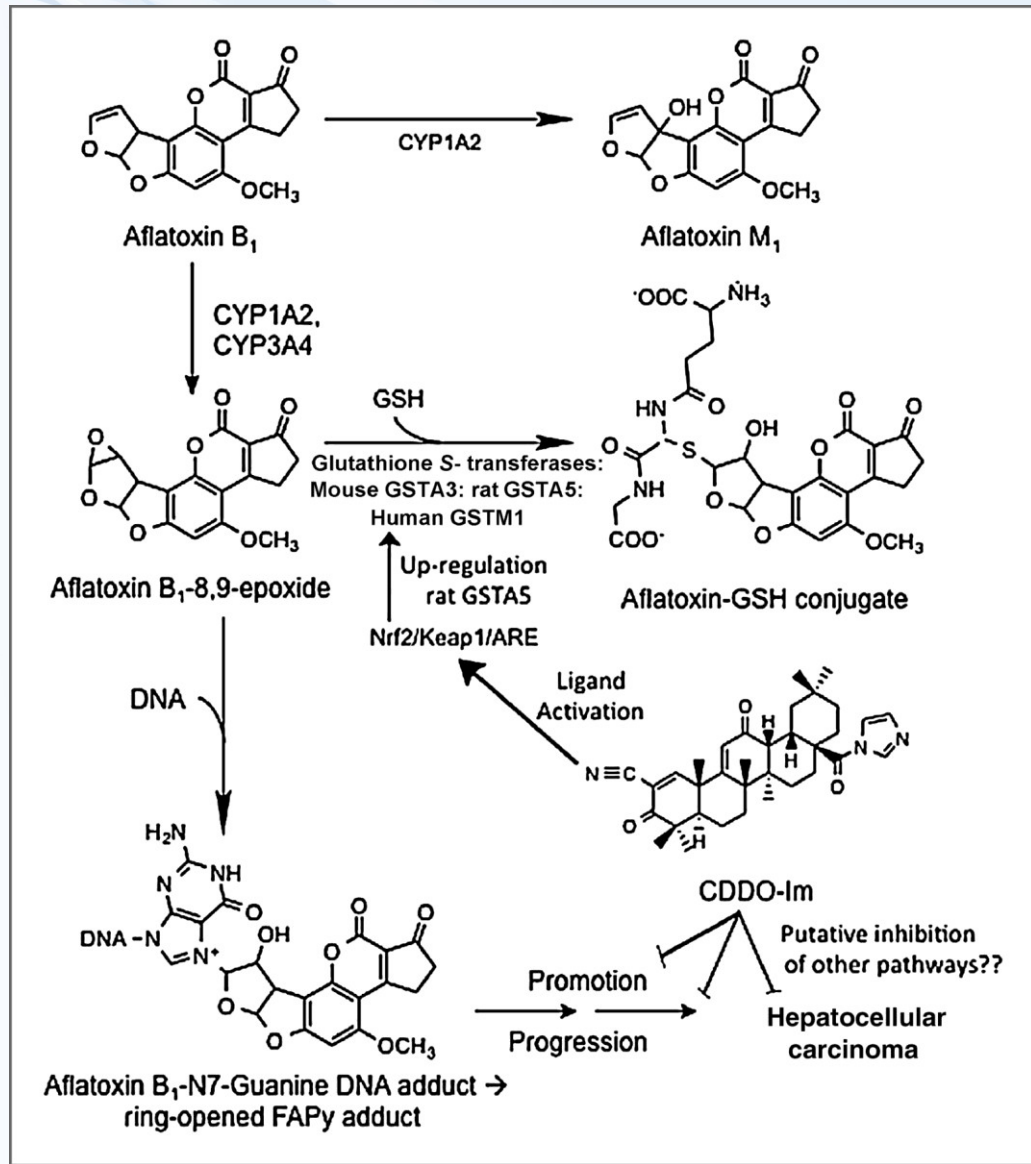
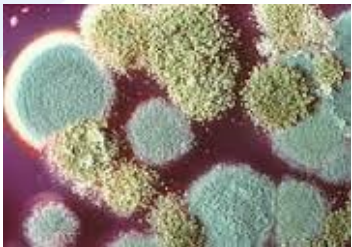


4-nitroquinoline-1-oxide
(NQO) 190.15



Bioaktivace: aflatoxin → genotoxici

AFLATOXIN sources



Interkalační činidla

m.j. využití v experimentální biologii – značení DNA (ethidium bromid)

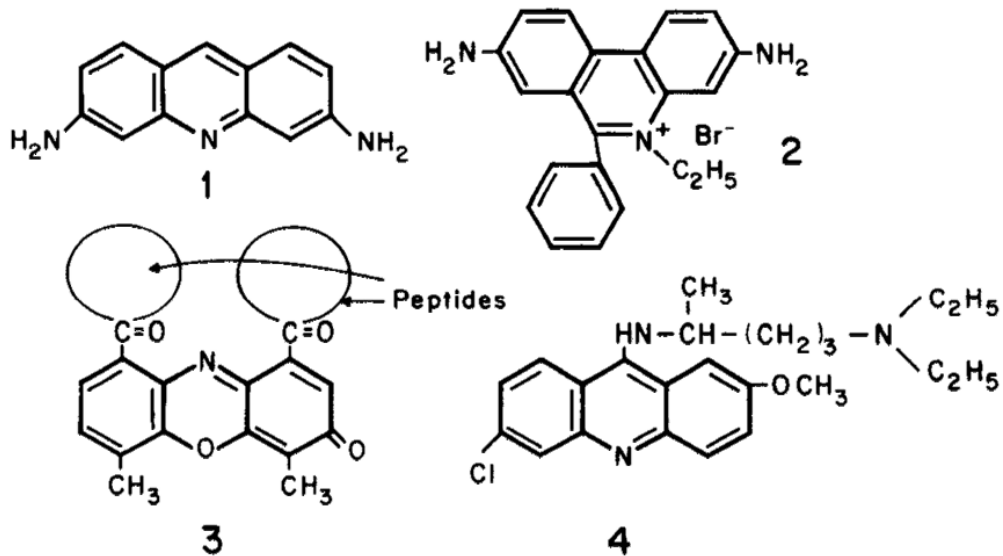
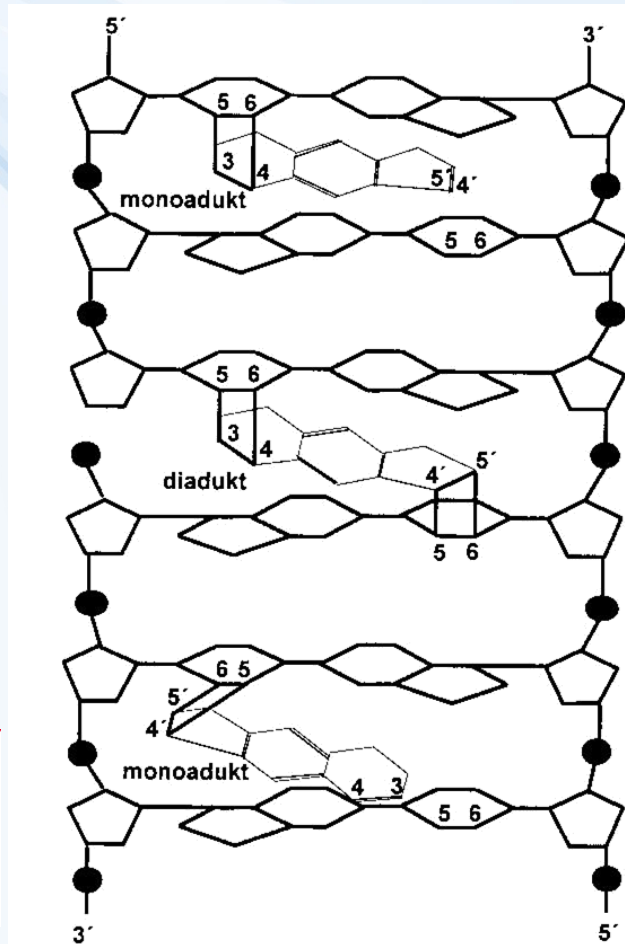
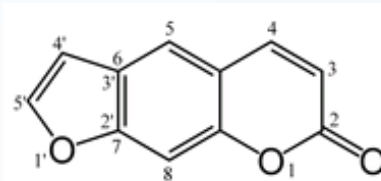


Chart 5.8. Examples of intercalating agents. Key: 1, acriflavine; 2, ethidium bromide; 3, actinomycin; 4, quinacrine.



Interkalace: **psoralen**
(v dehtu, psoriáza = lupenka)

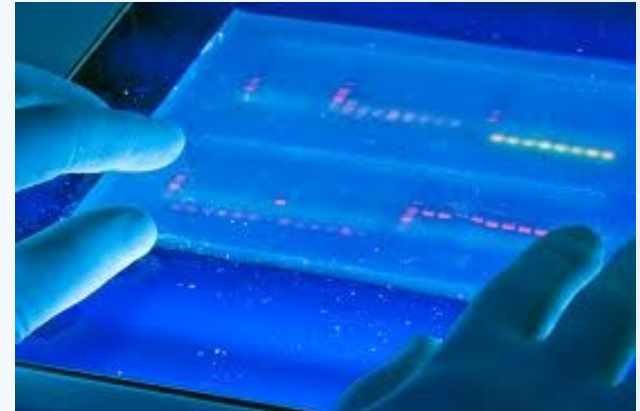
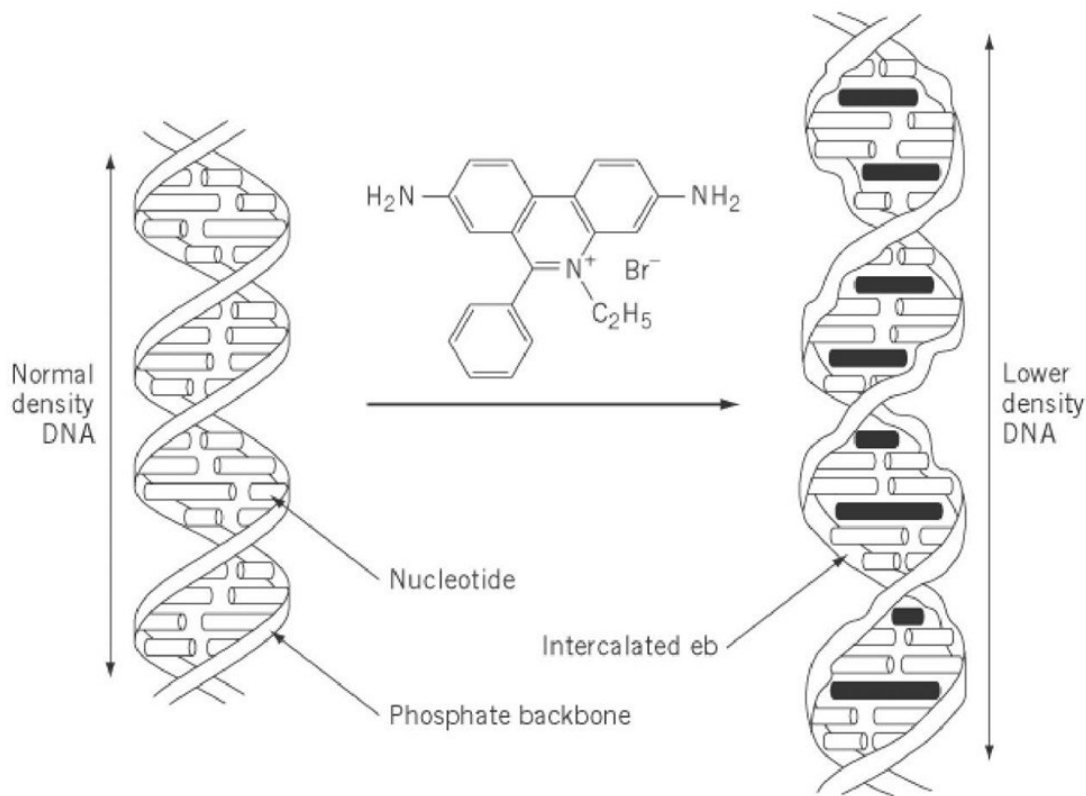
Ethidium bromid

(běžná látka v mol-biol výzkumu: vizualizace DNA)

INTERKALACE DO DNA

Example 1 – ETHIDIUMBROMIDE

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



Mutageny: analogy bází

Strukturně podobné bazím (nukleotidům)

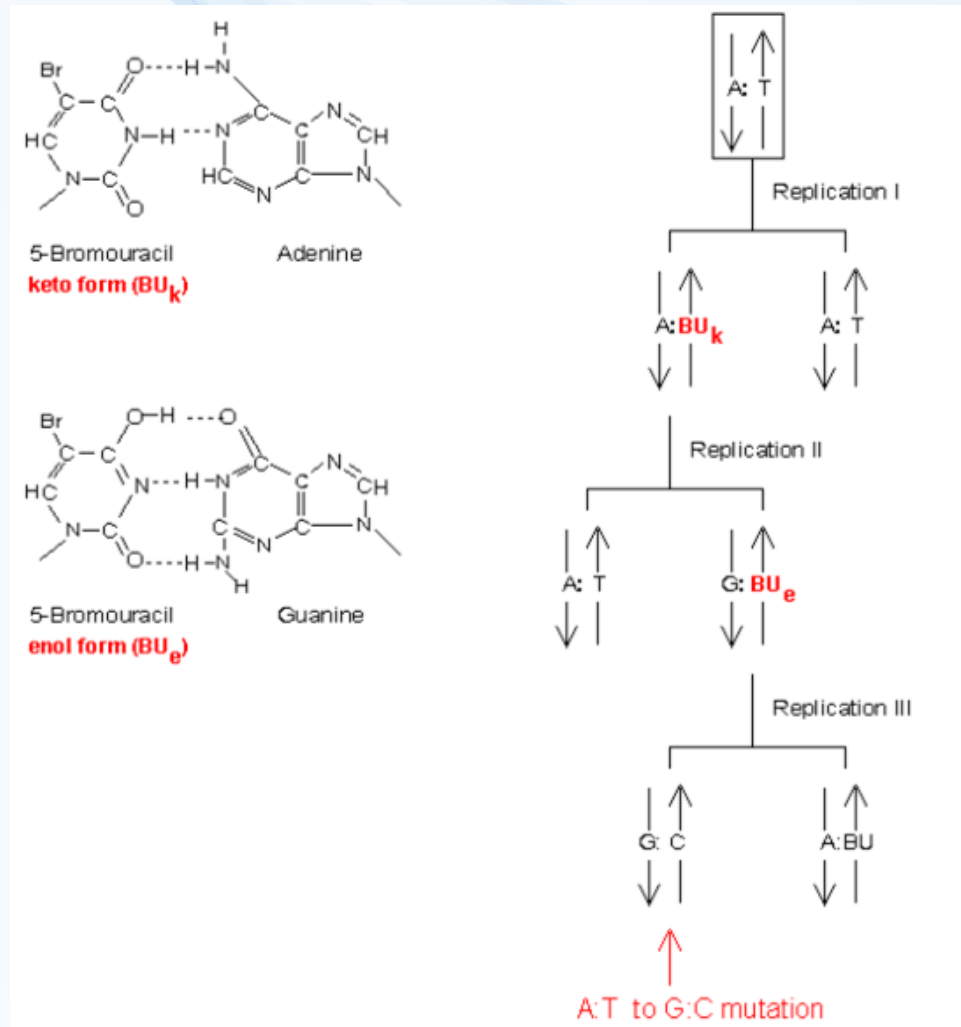
→ vstup do DNA během replikace

Příklady

5-Br-Uracil

5-F-Uracil (protinádorové léčivo)

Důsledek: změna kodování
AT → GC shift



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

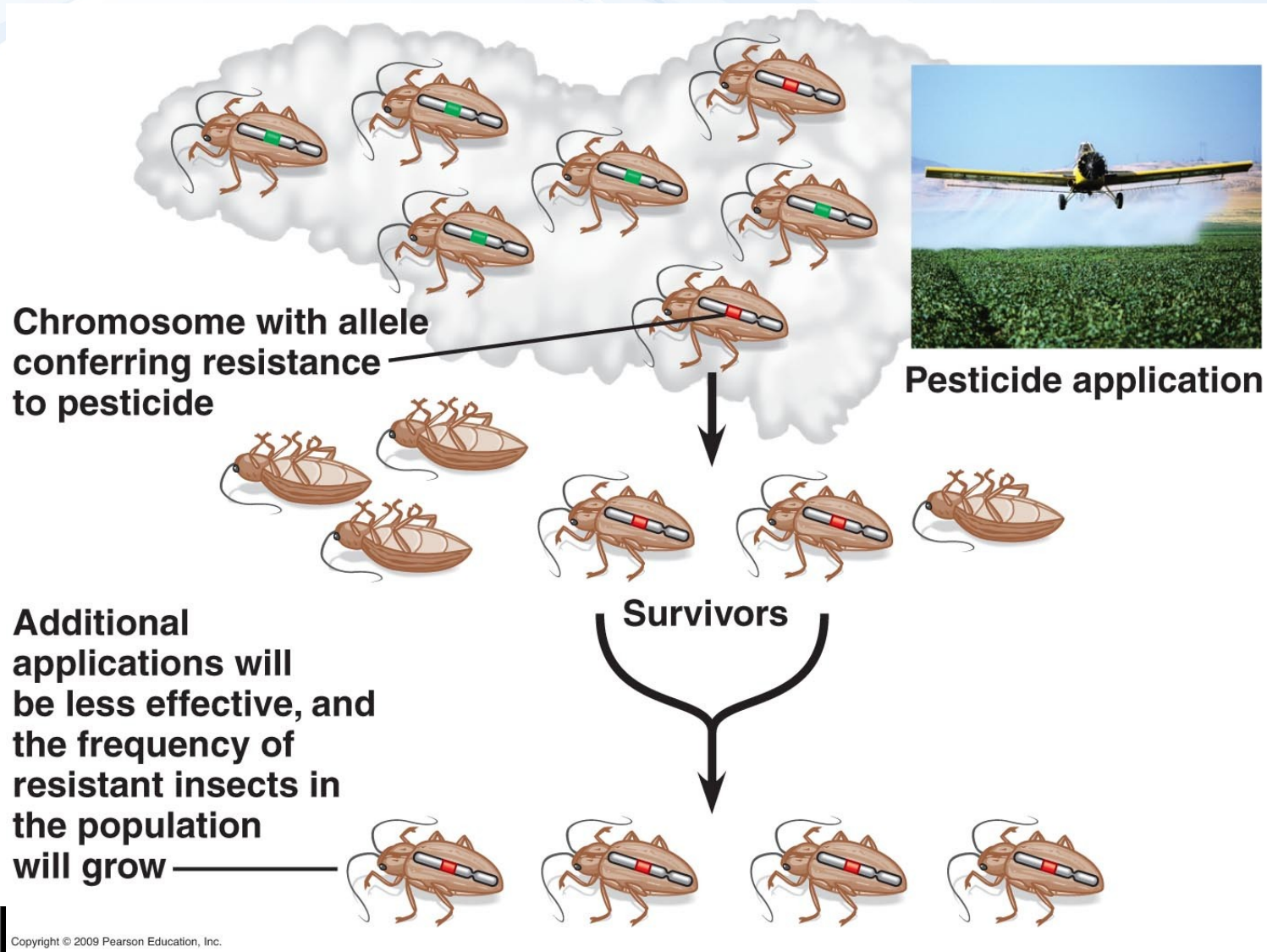
→ přenos mutací na další generace → evoluce

2) Důsledky pro ekosystémy

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

*Příklady/přípomínka: Pesticidy → vznik rezistentního hmyzu
Antibiotika → ATB-rezistentní bakterie*

Připomínka: mutace – základ evoluce populací



PROTEINY jako cíl toxických látek



Struktura a funkce proteinů

Structure of proteins

- primary (sequence of aminoacids, AA),
- secondary, tertiary, quaternary (folding – important for functions)

Proteins - large/long – key target for number of toxicants!

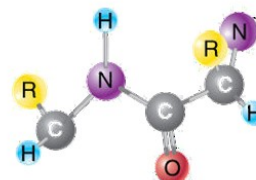
= polypeptides - tens to thousands of AA

Peptides (small, “πεπτός, "digested“, 2x AA to e.g. 20x AA)

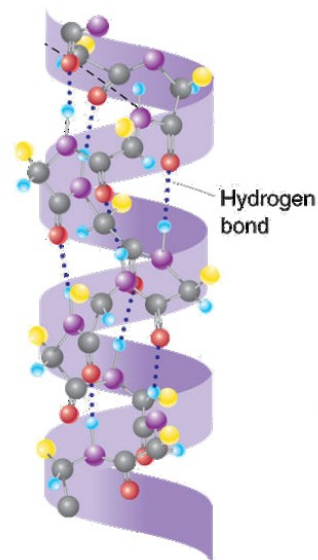
may have various functions (e.g. protective - glutathione)

Key functions of proteins

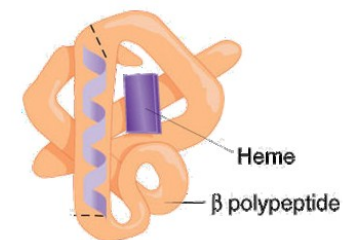
- STRUCTURE and PROTECTION
- CATALYSIS (enzymes)
- TRANSFER (information and mass)
- receptors, channels, transporters



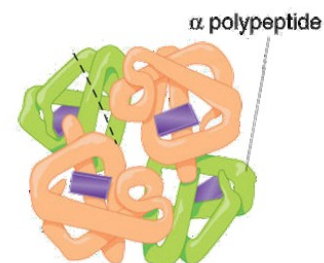
(a) Primary structure



(b) Secondary structure



c) Tertiary structure



(d) Quaternary structure

Nespecifické mechanismy (reaktivní): denaturace

→ účinky látek na sekundární a terciární strukturu proteinů (včetně enzymů)

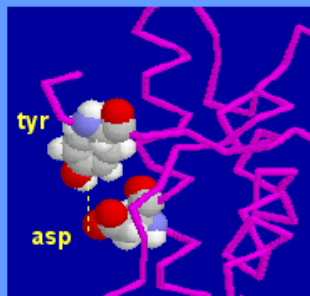
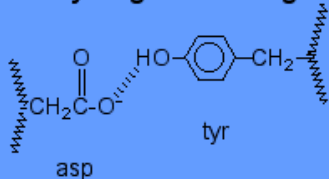
**Narušení H-můstků
Iontové vazby**

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

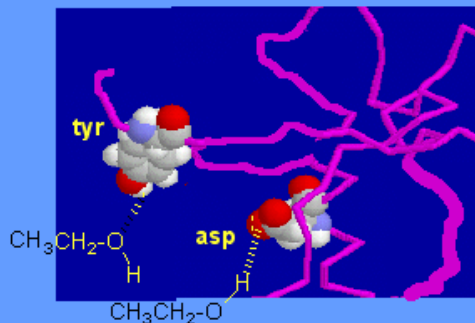
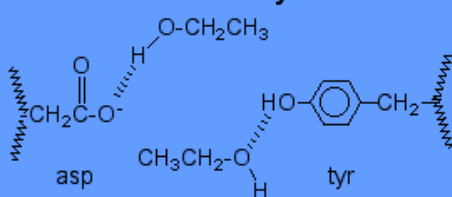
S-S můstky

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

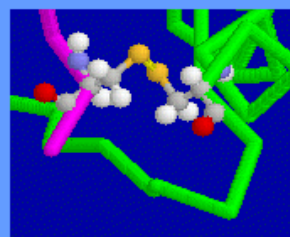
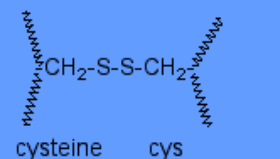
**Tertiary Structure -
Hydrogen Bonding**



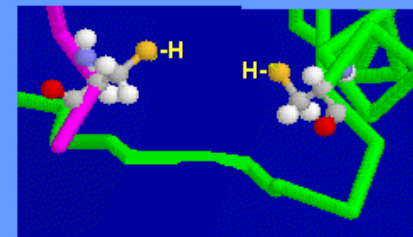
Denaturation by Alcohol



**Tertiary Structure -
Disulfide Bonds**



Denaturation by Reducing Agents



Inhibice enzymových aktivit

Inhibice enzymových aktivit

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

inhibice **kompetitivní**

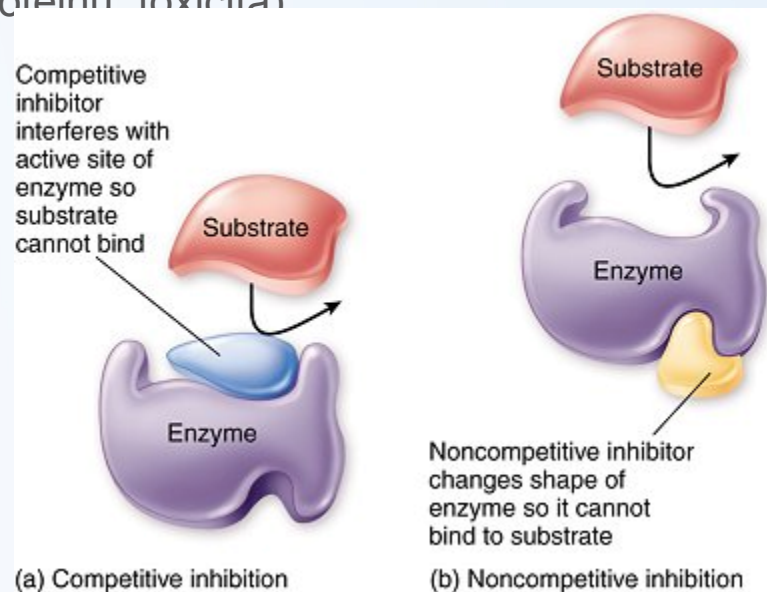
: vazba v aktivním místě, na úrovni substrátu: viz příklady dále

inhibice **nekompetitivní / alosterické**

: vazby na jiném místě enzymu

→ „nespecifická“ změna struktury a následně funkce

(např. nízké pH: hodně H⁺ → denaturace proteinu, toxicita)



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

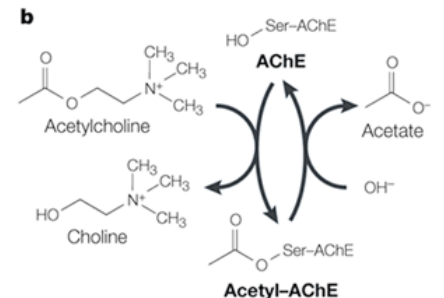
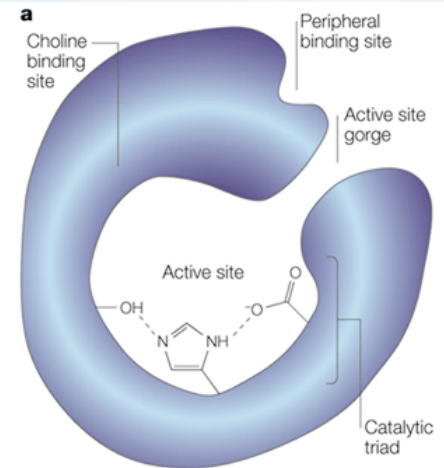


- ACh
- ACh Receptor
- ⚡ Signal transmission
- ★ ACh Esterase

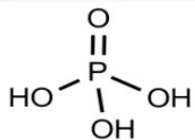
OP's inhibit ACh Esterase



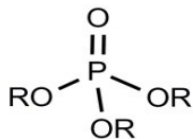
- ACh
- ACh Receptor
- ⚡ Signal transmission
- ★ ACh Esterase
- ▶ Organophosphate pesticide (OP)



Příklady – inhibitory AcCholE



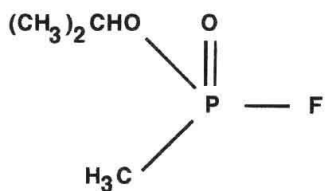
Phosphoric acid



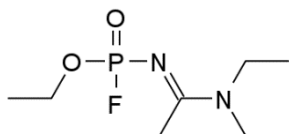
'Organophosphate'

Nervové plyny

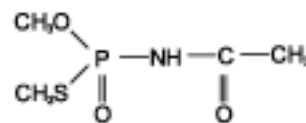
SARIN / GB NERVE AGENT
Isopropoxymethylphosphoryl Fluor



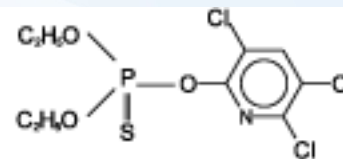
Novichok



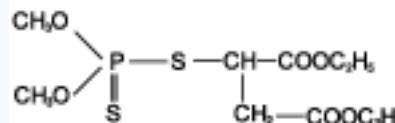
Organofosfátové insekticidy



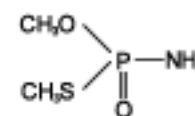
Accephate



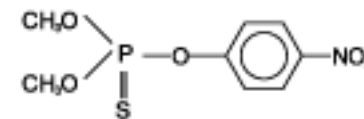
Chlorpyrifos



Malathion

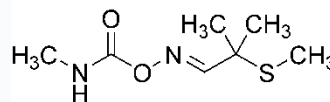


Methamidophos

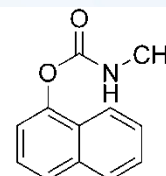


Parathion-methyl

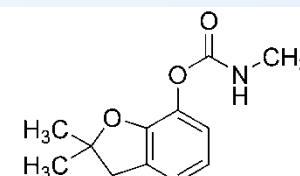
Insekticidy - karbamáty



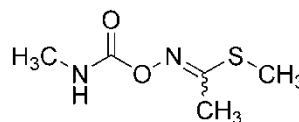
Aldicarb



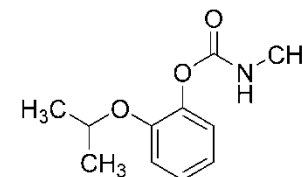
Carbaryl



Carbofuran



Methomyl



Propoxur



Specifické inhibice enzymů - příklady

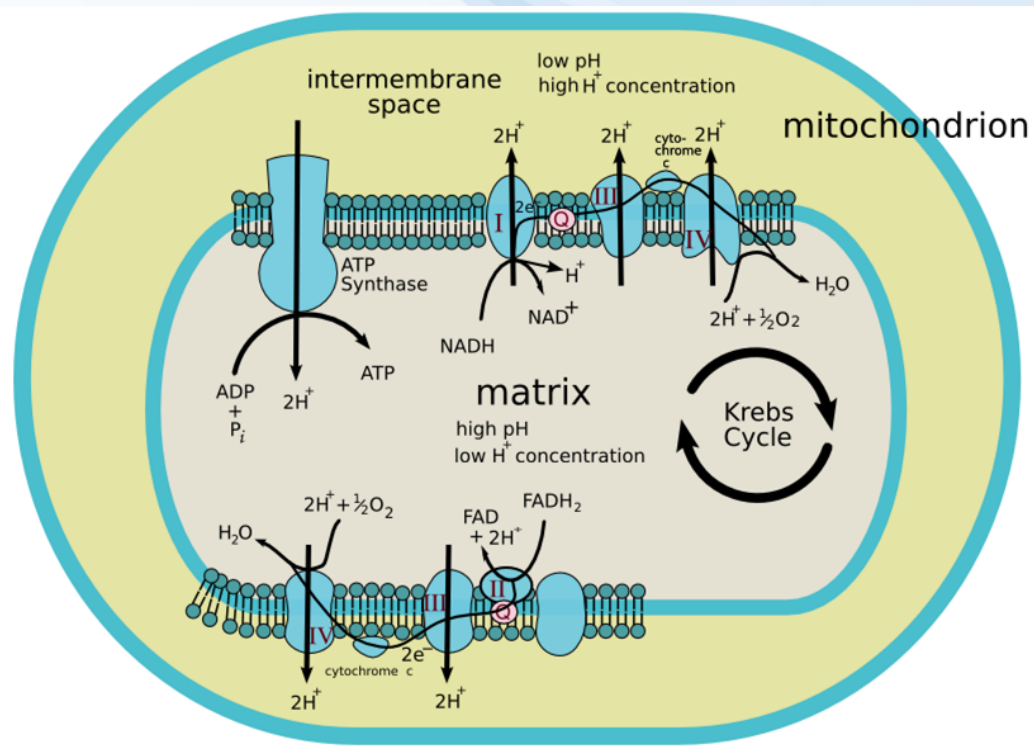
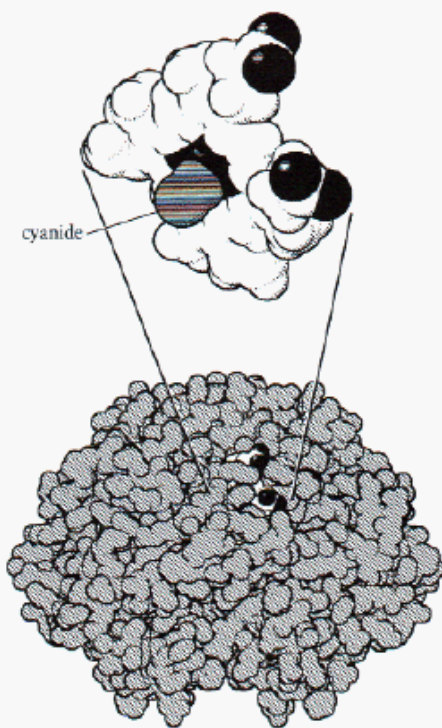
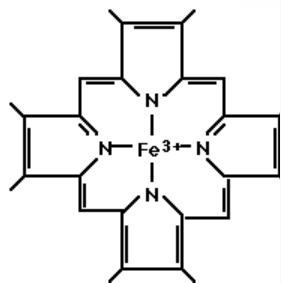
inhibice enzymů respiračních řetězců

- Respirace & tvorba ATP - klíčový metabolický proces

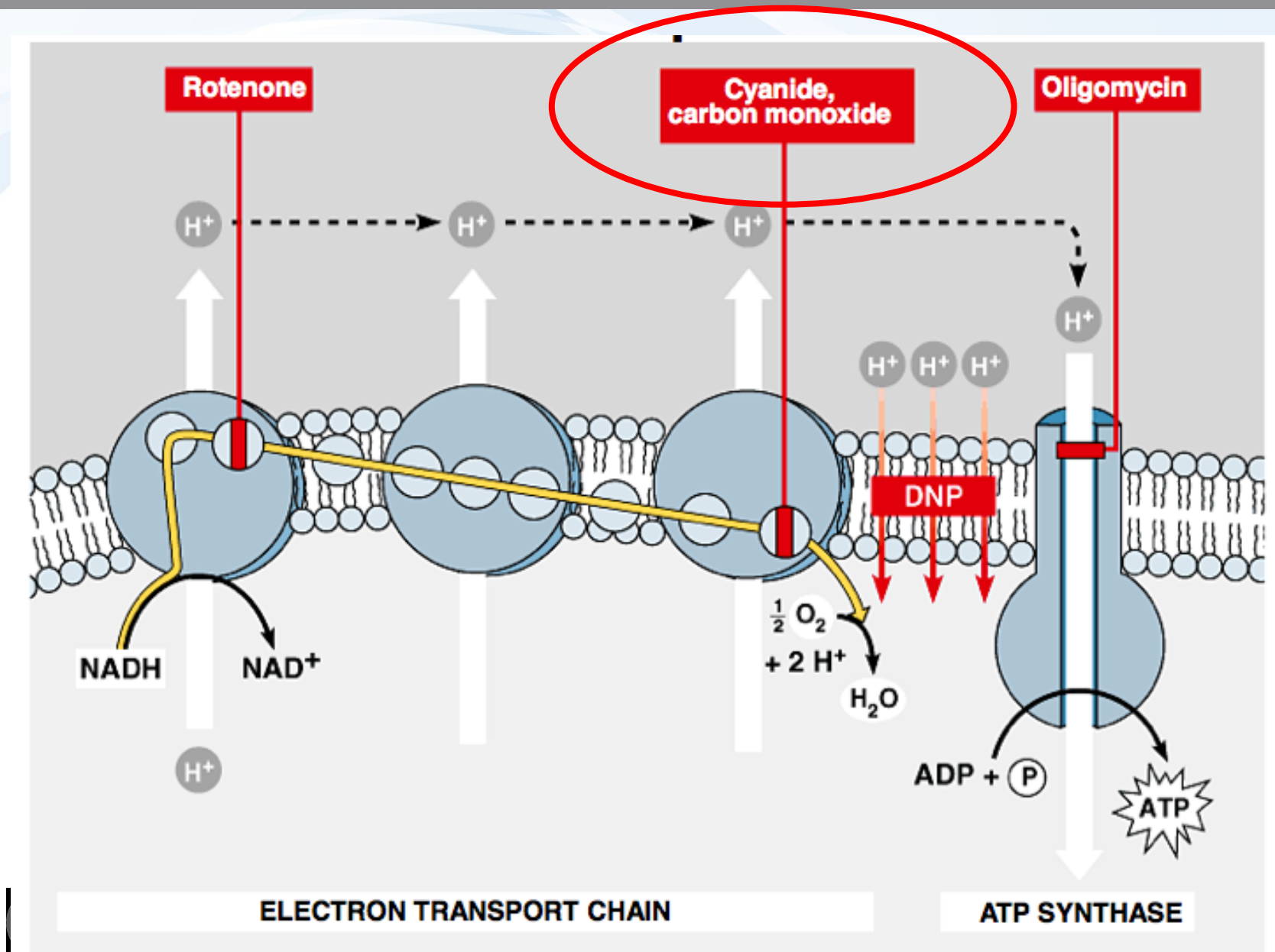
- **Kyanid** ($C\equiv N$), **CO** vazba na hemový komplex

→ nejrychlejší toxicita – mitochondrie

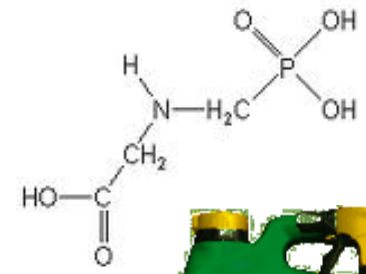
→ také v hemoglobinu, CYP450 atd.



Modelové toxikanty inhibující produkci ATP v mitochondriích



Mechanismus: Glyfosát (Pesticid RoundUp)



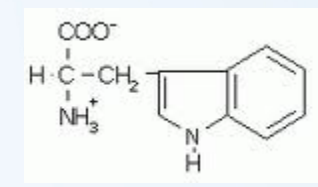
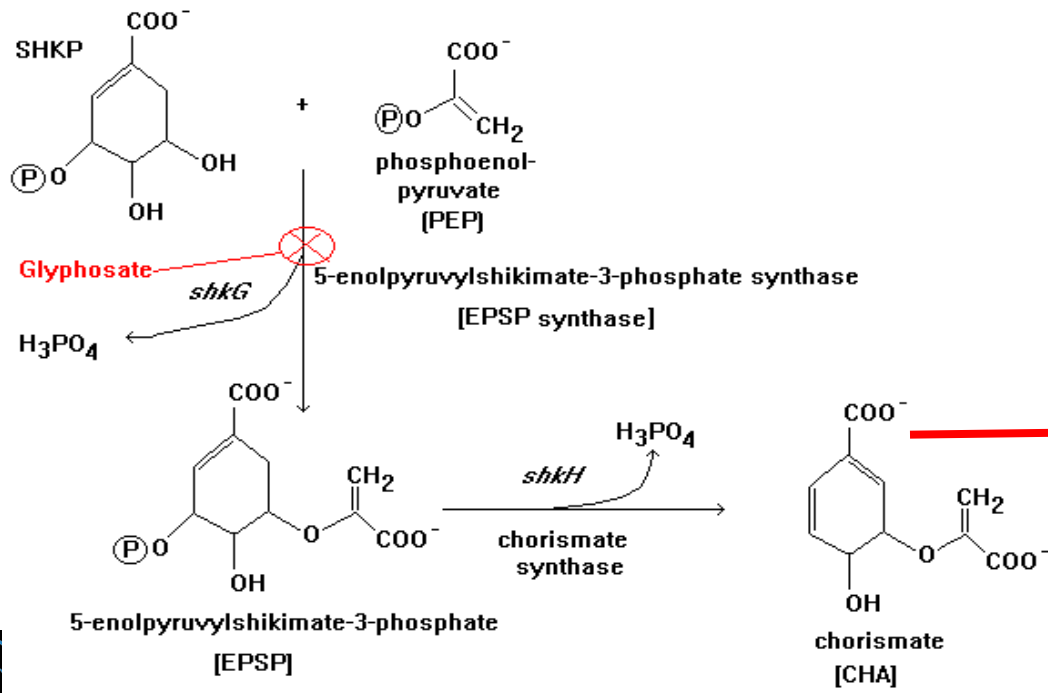
N-(phosphonomethyl)glycine

Broad-spectrum herbicide („RoundUp“)

Selective inhibition of ESPs 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase;
(synthesis of aromatic AAs – Tyr, Trp, Phe)

Uptake via leaves - only to growing plants

„Non-toxic“ to other organisms (no ESPs in animals, AA-like chemical - rapid degradation)



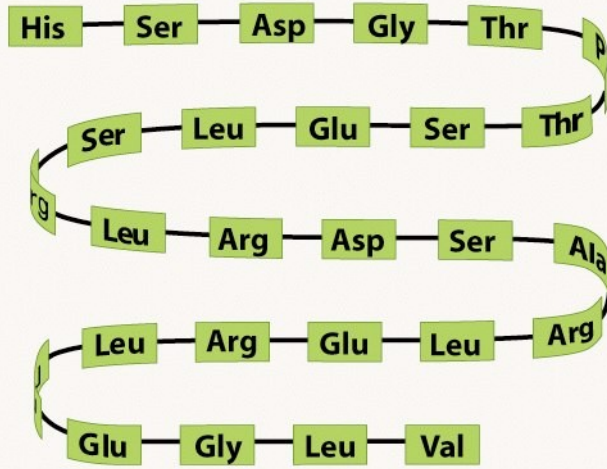
Další specifické mechanismy

- intracelulární a extracel. receptory



Interakce látek s proteinovými receptory: část 1: membránové

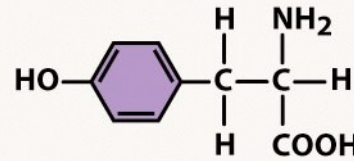
Polypeptides



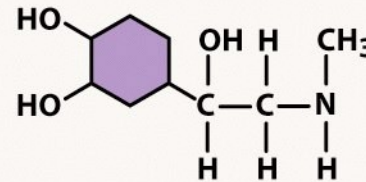
Secretin

Not lipid soluble;
bind to receptors on
surface of target cell

Amino Acid Derivatives



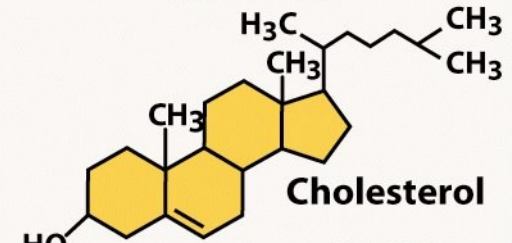
Tyrosine



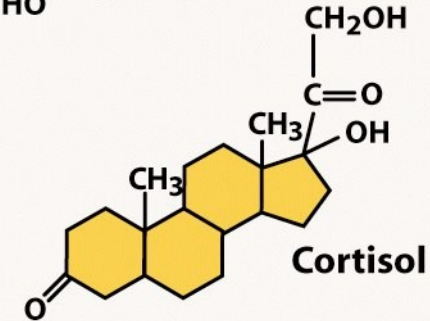
Epinephrine

Most not lipid soluble;
bind to receptors on
surface of target cell

Steroids



Cholesterol

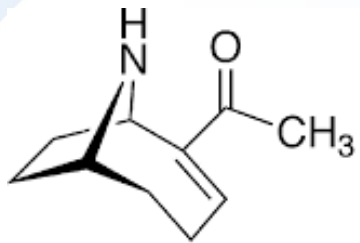


Cortisol

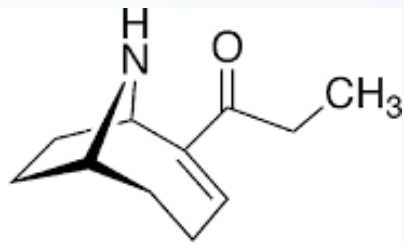
Lipid soluble;
often bind to
receptors inside
target cell

AKTIVACE membránových kanálů: neurotoxiny sinic

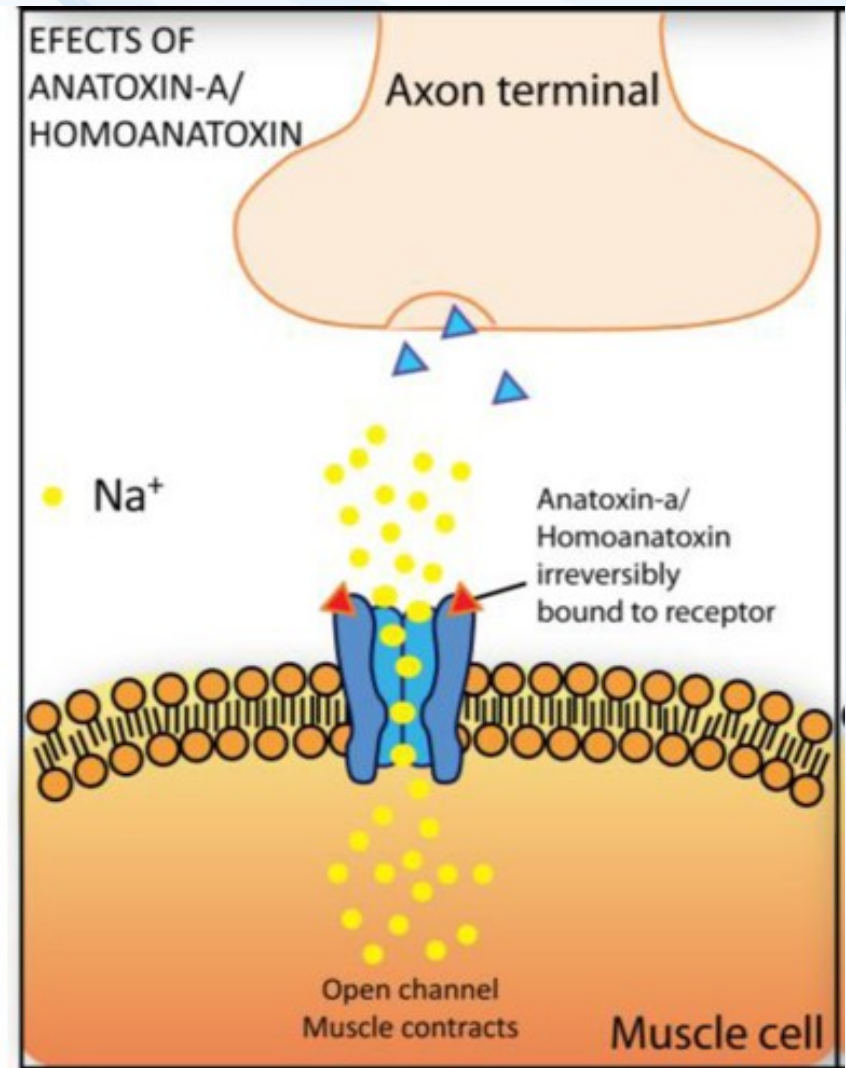
Neurotoxins (cyanobacterial)



Anatoxin-a



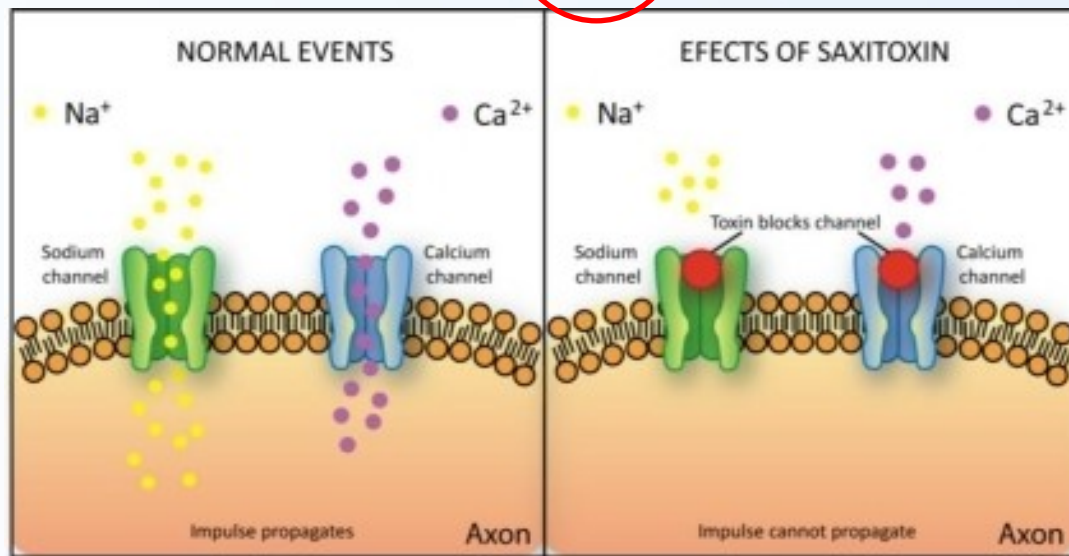
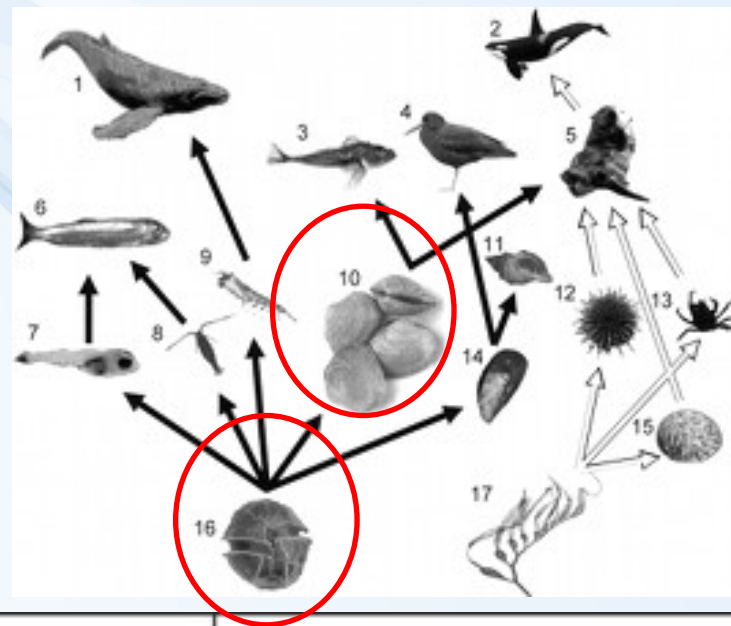
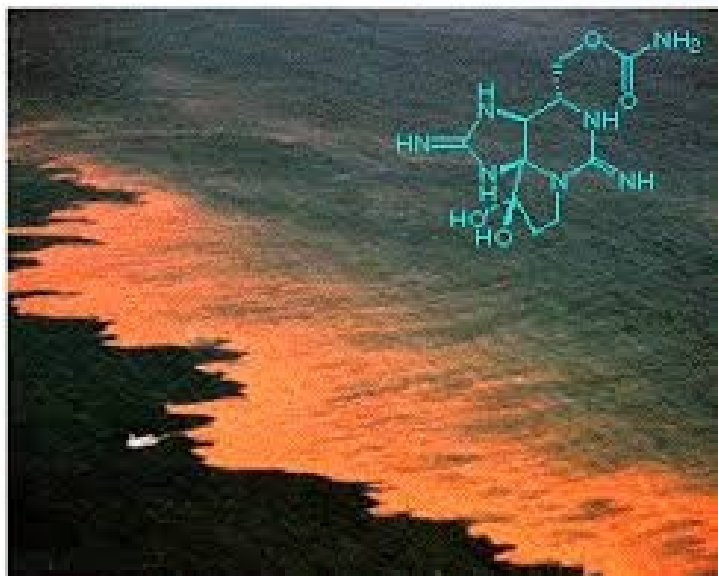
Homoanatoxin-a



BLOKACE membránových kanálů: neurotoxiny obrněnek

SAXITOXINS

- Produced by **dinoflagelates** and **cyanobacteria**
- (toxic blooms, „red tides“)
- PSPs – Paralytic Shellfish Poisons

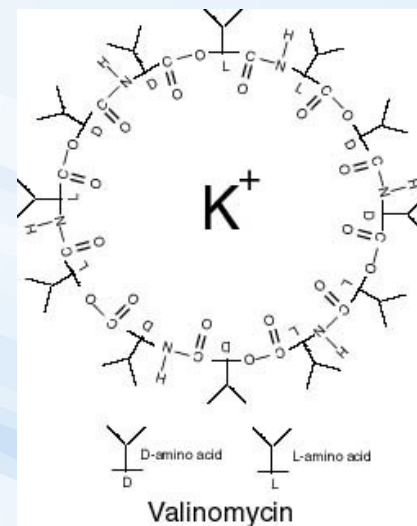


Změny gradientů na membránách – IONOFORY

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

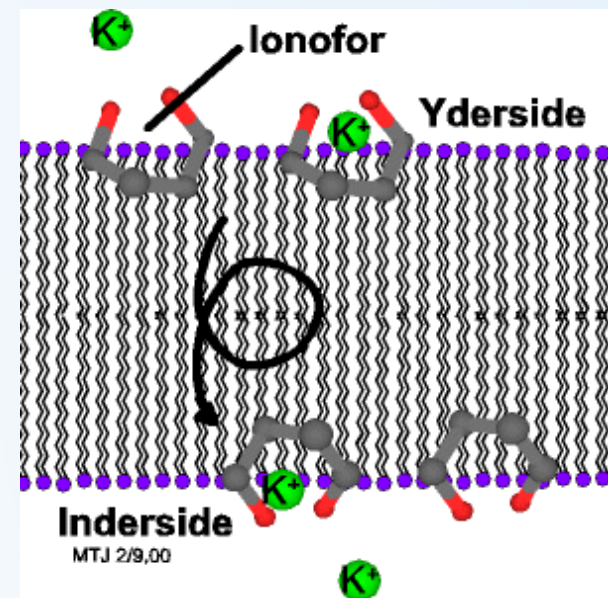
Význam gradientů:

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



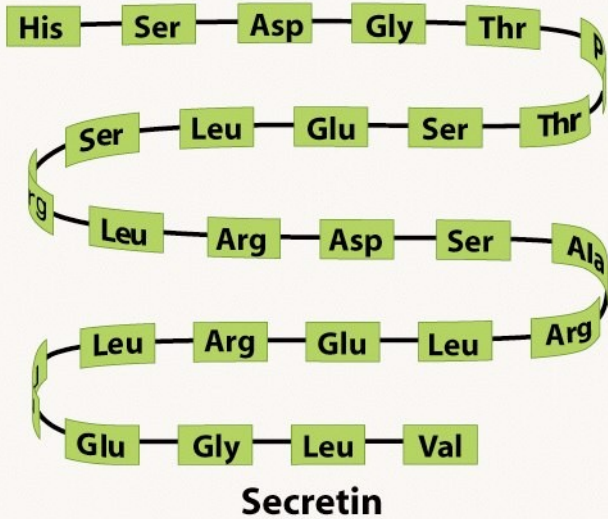
Toxické látky narušující gradienty

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

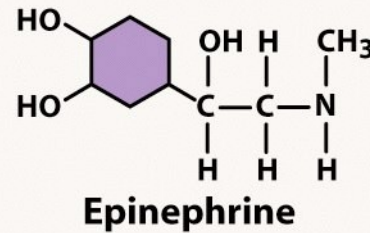
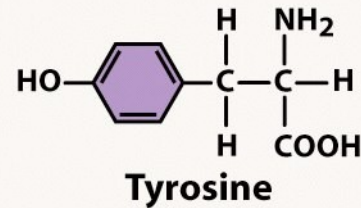


Interakce látek s proteinovými receptory: část 2: cytoplazmatické / jaderné

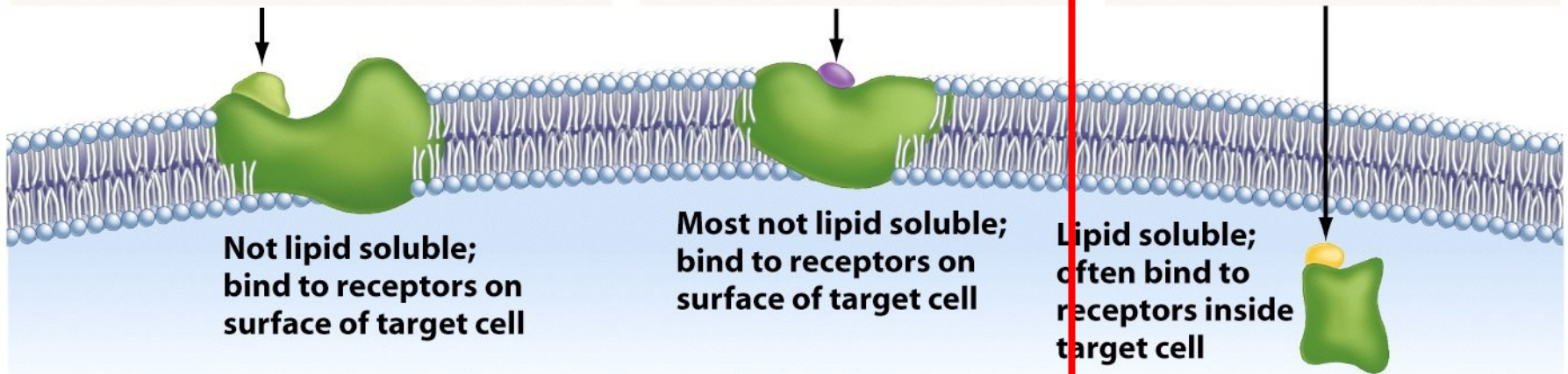
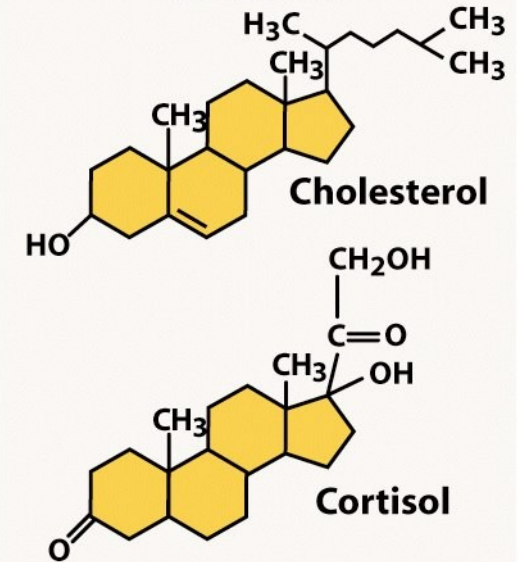
Polypeptides



Amino Acid Derivatives



Steroids



Kompetice toxických látek s přirozenými ligandy

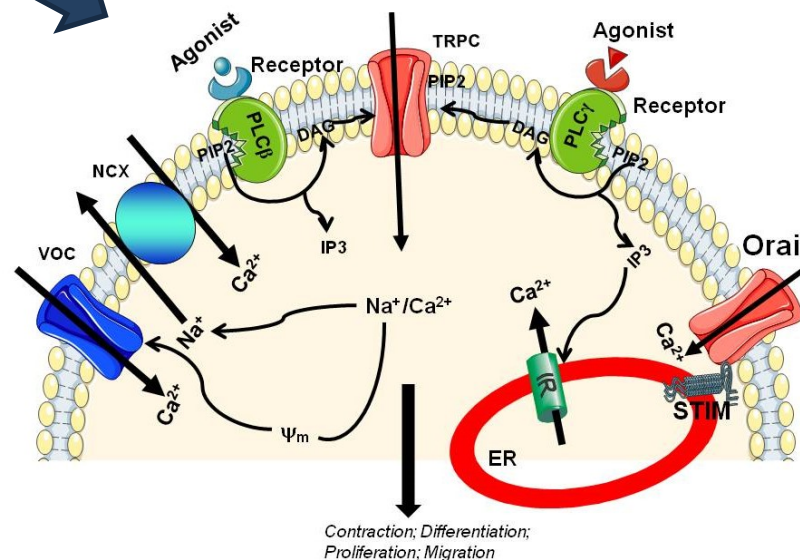
Interakce chemických látek s receptory pro přirozené ligandy
= reakce s proteinovými receptory

PROTEINOVÉ RECEPTORY

A) Membránové receptory – *menší význam v ekotoxicitě*

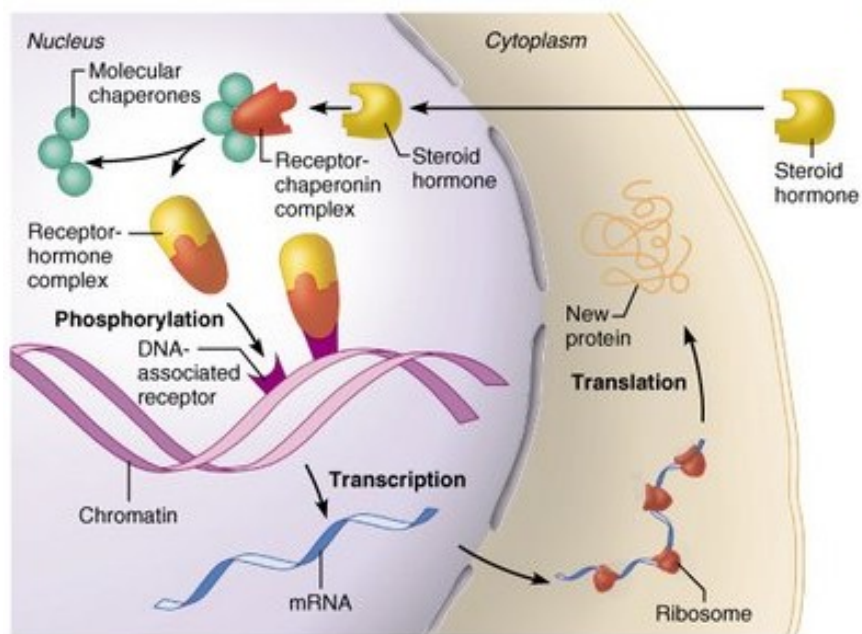
- přirozené ligandy
 - velké hormony (inzulin):
menší význam toxických látek
 - malé signální molekuly (neurotransmittery)
strukturně blízké malým mk toxikantů (spíše farmakologie)

B) Intracelulární receptory! Velký význam v (eko)toxicitě



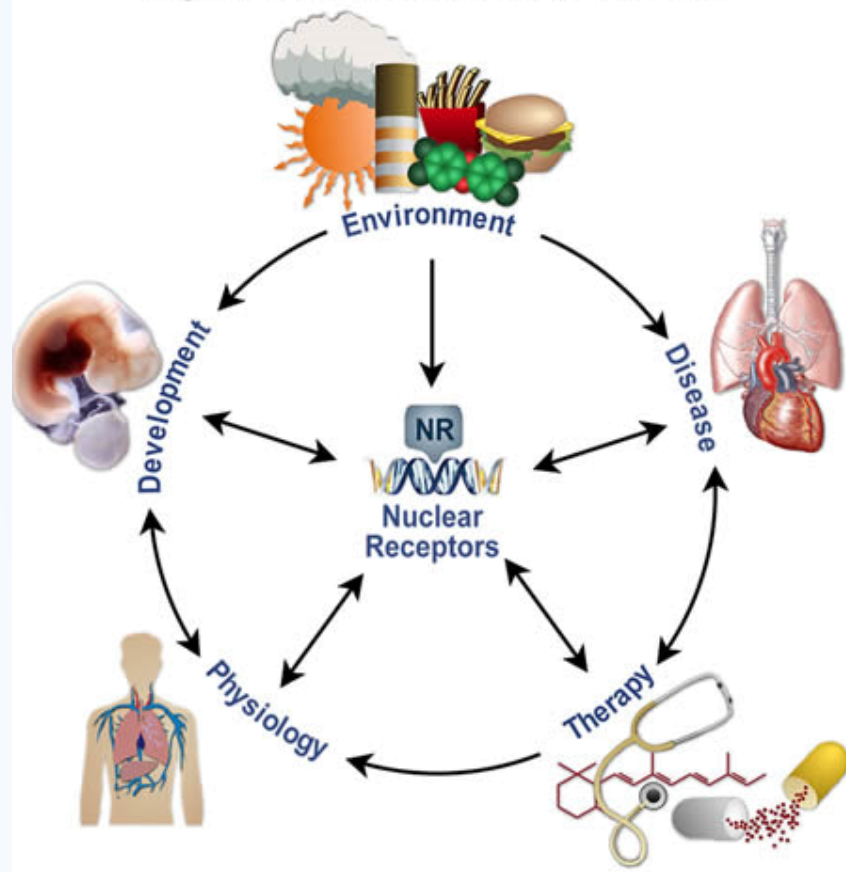
Intracelulární (nukleární, jaderné) receptory

Nukleární receptory
- přímo interagují s DNA
(transkripční faktory)

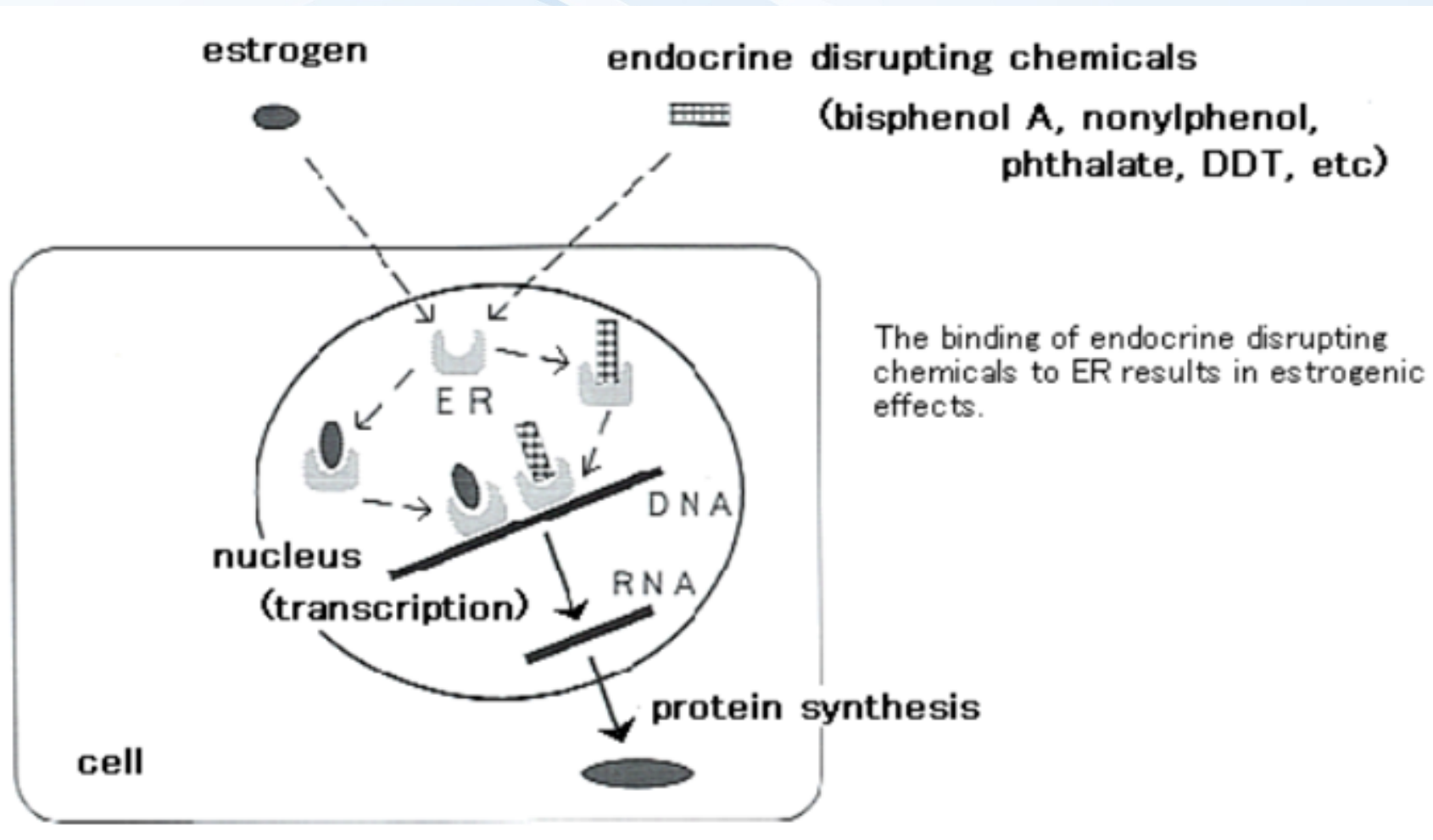


Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Figure 1. Nuclear Receptors:
Ligand Dependent Transcription Factors



Toxické látky interferují s ligandy nukleárních receptorů



Nukleární receptory



Intracelulární (jaderné) receptory

Velký význam v ekotoxikologii !

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

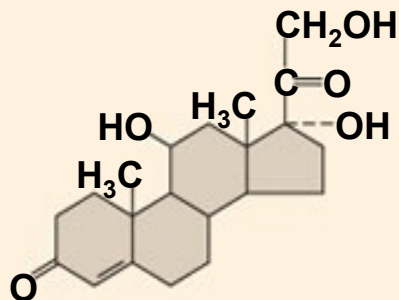
Organické toxické látky: strukturní podobnost s hormony (!)

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

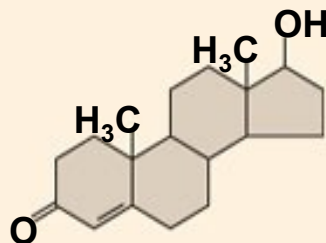
Důsledky: chronická toxicita velmi významných polutantů

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

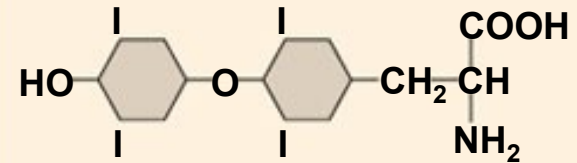
Cortisol (Hydrocortisone)



Testosterone



Thyroxine



Nukleární receptory významné v ekotoxicitě

AhR – receptor pro aromatické uhlovodíky (arylhydrocarbon receptor)

ER – estrogenní receptor

také např. AR (androgenní receptor)

další (PPAR, ThR) – méně prostudované účinky látek

Aktivace AhR :

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

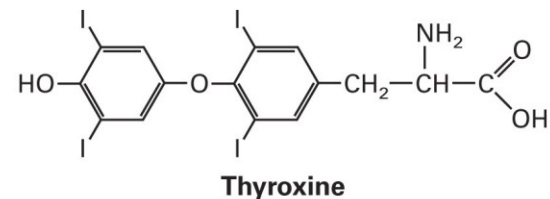
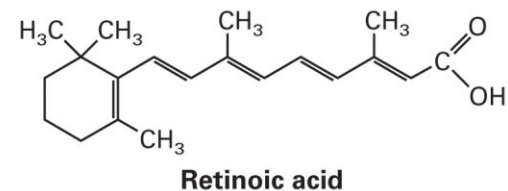
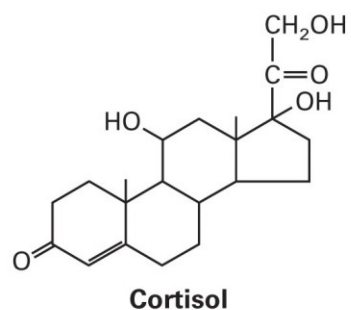
Aktivace ER

- 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**)



Příklady – ligandy jaderných receptorů

- **Malé molekuly – hormony (signální látky) rozpustné v tucích**
 - Přestup přes membránu – vazba na NR – aktivace transkripce (transkripční faktory)
 - **STEROIDNÍ HORMONY**
 - Pohlavní hormony (estrogen, progesteron, testosteron)
 - Kortikosteroidy (glucocorticoids and mineralcorticoids)
 - **Další hormony a ligandy**
Thyroidní hormony, vitamín D3, kyselina retinová, ligandy AhR (např. TCDD)
 - **Malé molekuly - plyny**
Např. NO (signálování v imunitních reakcích)



Příklad – ligandy ER (Estrogenní receptor)

Environmentální toxikanty (xenoestrogeny, exoestrogeny, anti-ER)

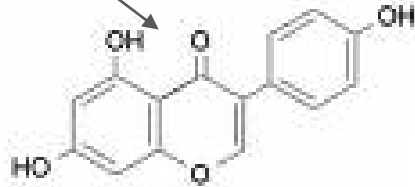
>> látka může působit jako **AGONISTA** a/nebo **ANTAGONISTA**
(podle konkrétní situace v tkáni a v závislosti na koncentraci ligandu)

→ Dopady – především reprodukční toxicita, ale také imunosuprese ad.

Natural products

genistein

naringenin
coumestrol
zearalenone



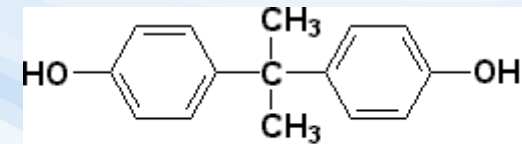
Industrial chemicals

Bisphenol A

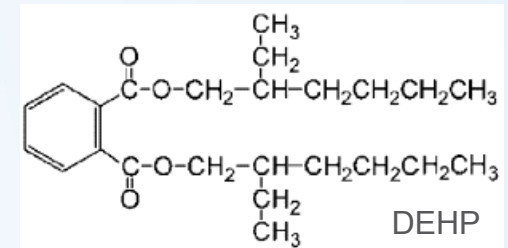
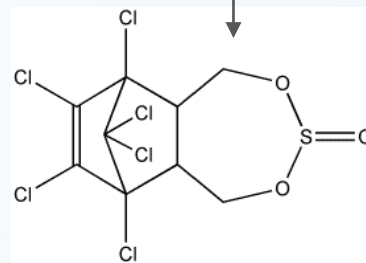
Nonionic surfactants

Phthalate esters (eg. DEHP)

Endosulfan (pesticide)



bisphenol A



DEHP

Various POPs

DDT and its metabolites (DDE)

kepone

PCBs/OH-PCBs

PAHs and dioxins

Pharmaceuticals

Ethinyl estradiol

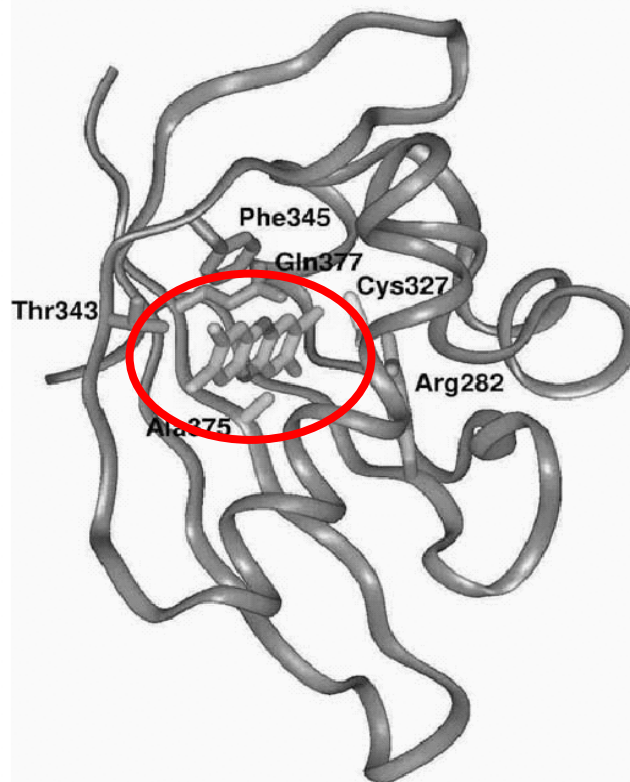
Diethylstilbestrol

gestodene

norgestrel

AhR (Arylhydrocarbon receptor)
= receptor pro planární aromatické uhlovodíky
= dioxinový receptor

Derison et al., Chem Biol Interact. 141: 3

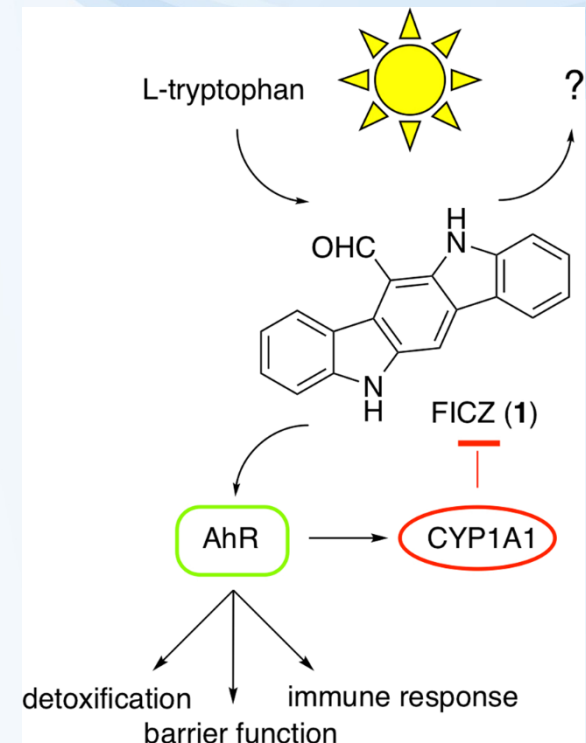
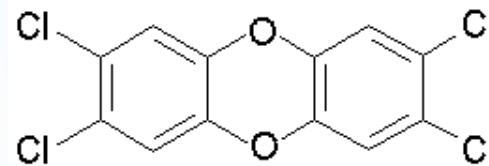


2,3,7,8-TCDD
(dioxin) ve
vazbě s AhR



AhR

- Ligandem aktivovaný transkripční faktor
 - Stejně jako ostatní NRs (nuclear receptors, jaderné receptory)
- Aktivní AhR řídí expresi mnoha různých genů
- Významný mediátor toxicity mnoha POPs – primárně aktivován **planárními aromatickými látkami**
 - Po aktivaci spouští primárně syntézu CYPs (detoxikace – vč. „aktivace“) a současně ovlivňuje další geny
- Křížová aktivace (crosstalk) s dalšími NRs (př. *potlačuje de novo syntézu ER ~ antiestrogenita*)
- **Nejsilnější známý ligand: TCDD**
 - Může být aktivován i endogenními látkami – např. deriváty aromatických heterocyklických aminokyselin



Mnoho genů v buňce je pod kontrolou AhR

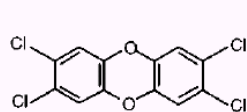
- Promotory mnoha genů obsahují tzv. **xenobiotic response elements (XRE)** nebo dioxin responsive elements (DRE) :
 - **Detoxifikační geny**
 - phase I enzymes (CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 1B1)
 - phase II enzymes (UDP-glucuronosyltransferase, GST-Ya, NADP(H):oxidoreductase)
 - **Další geny - např. řízení buněčného cyklu, apoptozy**
 - Bax (**apoptosis control**), p27Kip1, Jun B (MAP-kinase), TGF-b (**tumor growth factor**)



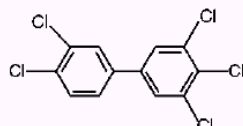
Klasické a další (neplanární) ligandy AhR

Classical = planar structures
→ direct binding to AhR

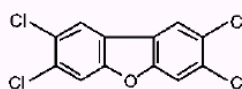
"Classical" AhR Ligands and CYP1A1 Inducers



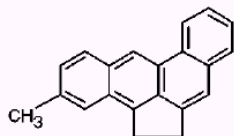
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin



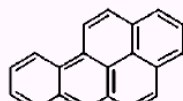
3,4,3',4',5-Pentachlorobiphenyl



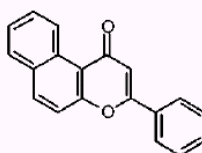
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran



3-Methylcholanthrene



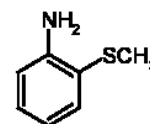
Benzo(a)pyrene



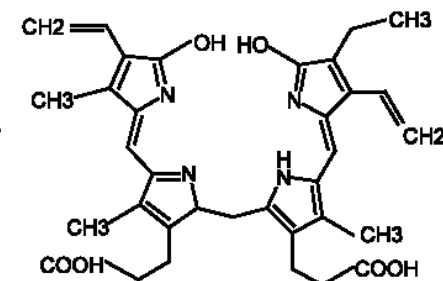
β-Naphthoflavone

Denison & Nagy, Annu.
Rev. Pharmacol. Toxicol. 43:309

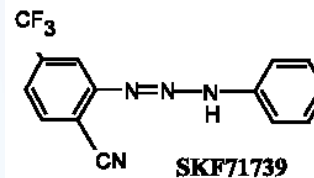
"Non-classical"
Různé látky, které aktivují AhR



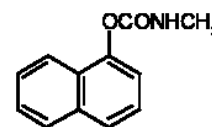
in 2-(Methylmercapto)aniline



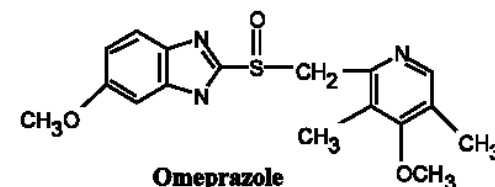
Bilirubin



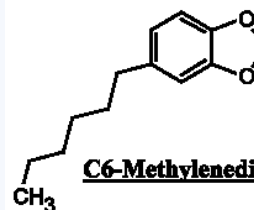
SKF71739



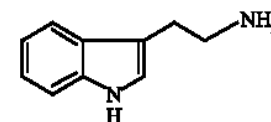
Carbaryl



Omeprazole



C6-Methylenedioxybenzene



Tryptamine

Účinky vyvolané toxikanty přes AhR

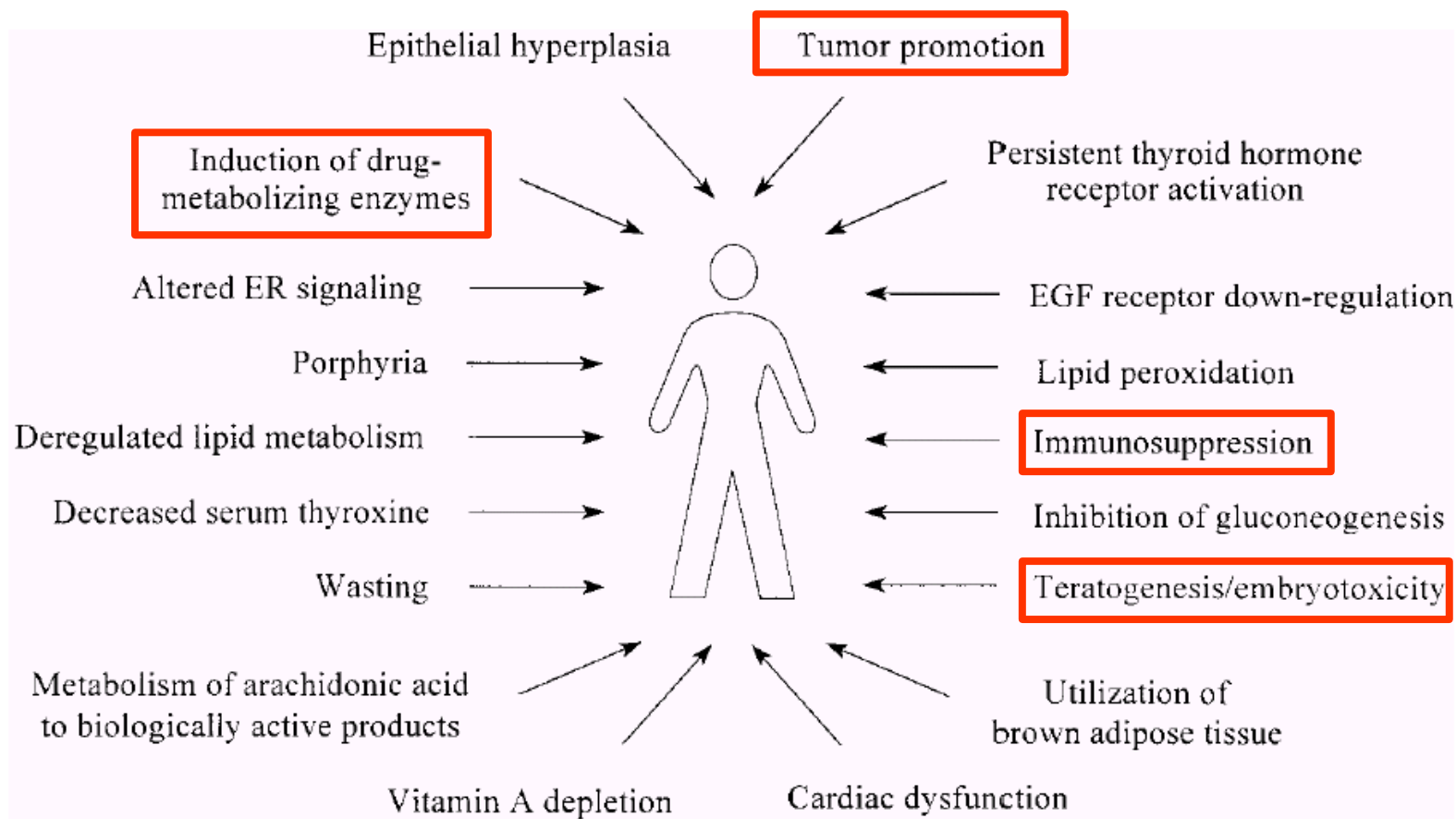
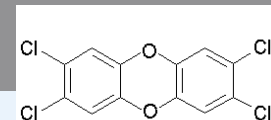


Figure 1 Biological responses to TCDD. A wide variety of cellular processes have been shown to be affected by TCDD.

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**

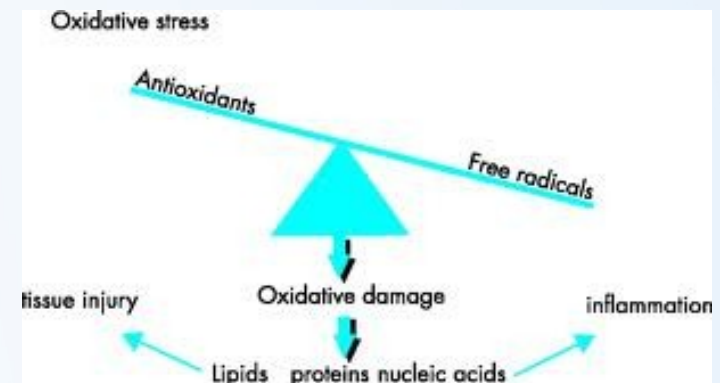
- **Antioxidanty:**

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

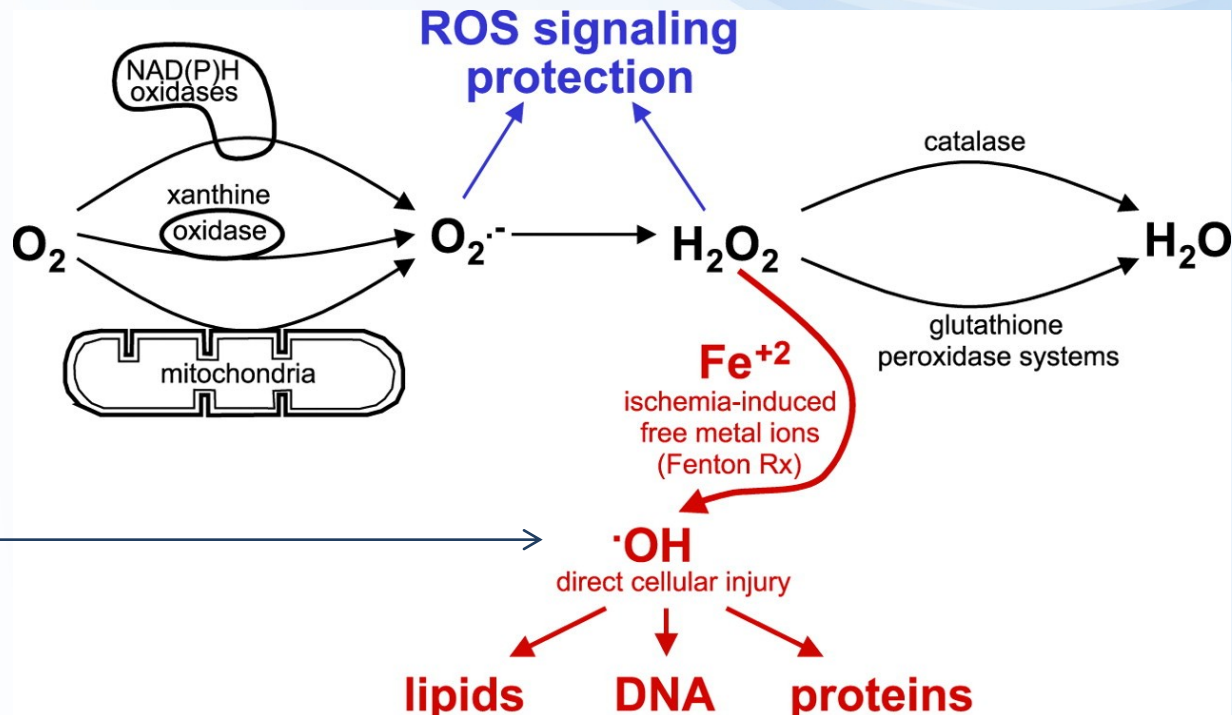
kyslík = terminální akceptor elektronů

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



Velká reaktivita ROS

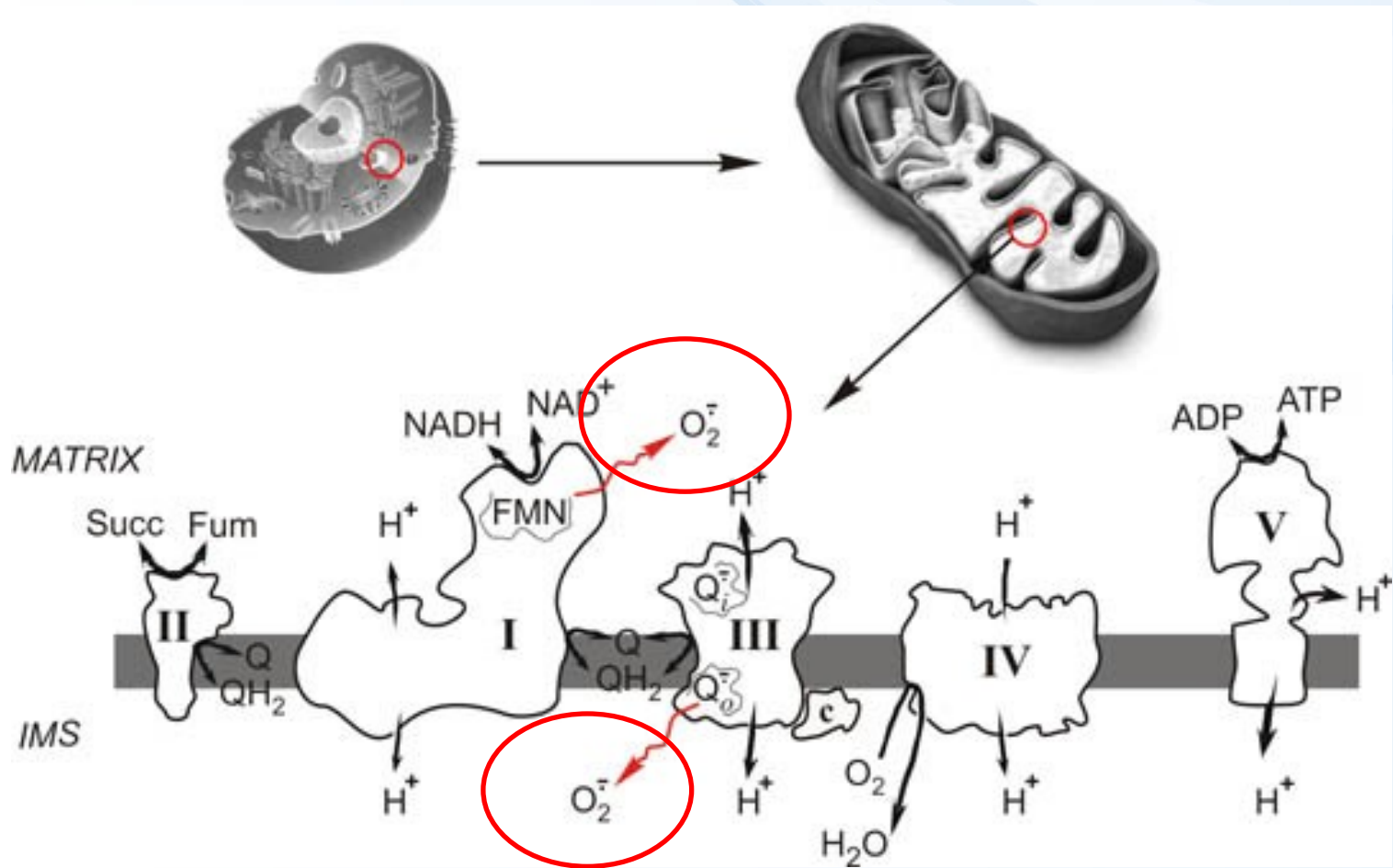
(krátká reakční doba = nestabilita, reaktivita, toxicita)

ROS	Antioxidant	Rate constant, $M^{-1} \cdot sec^{-1}$
Superoxide anion of oxygen	carosine	$5.0 \cdot 10^{-5}$
	carosine	$0.8 \cdot 10^{-5}$
	ascorbate	$2.7 \cdot 10^{-5}$
	α -tocopherol	$2.0 \cdot 10^{-5}$
Singlet oxygen	carosine	$3 \cdot 10^{-7}$
	imidazole	$2 \cdot 10^{-7}$
	ergothioneine	$2 \cdot 10^{-7}$
	NaN_3	$44 \cdot 10^{-7}$
Hydroxyl radical	carosine	$(5-8) \cdot 10^{-9}$
		$9 \cdot 10^{-9}$



Respirační řetězec v mitochondriích

- zdroj elektronů → zdroj ROS



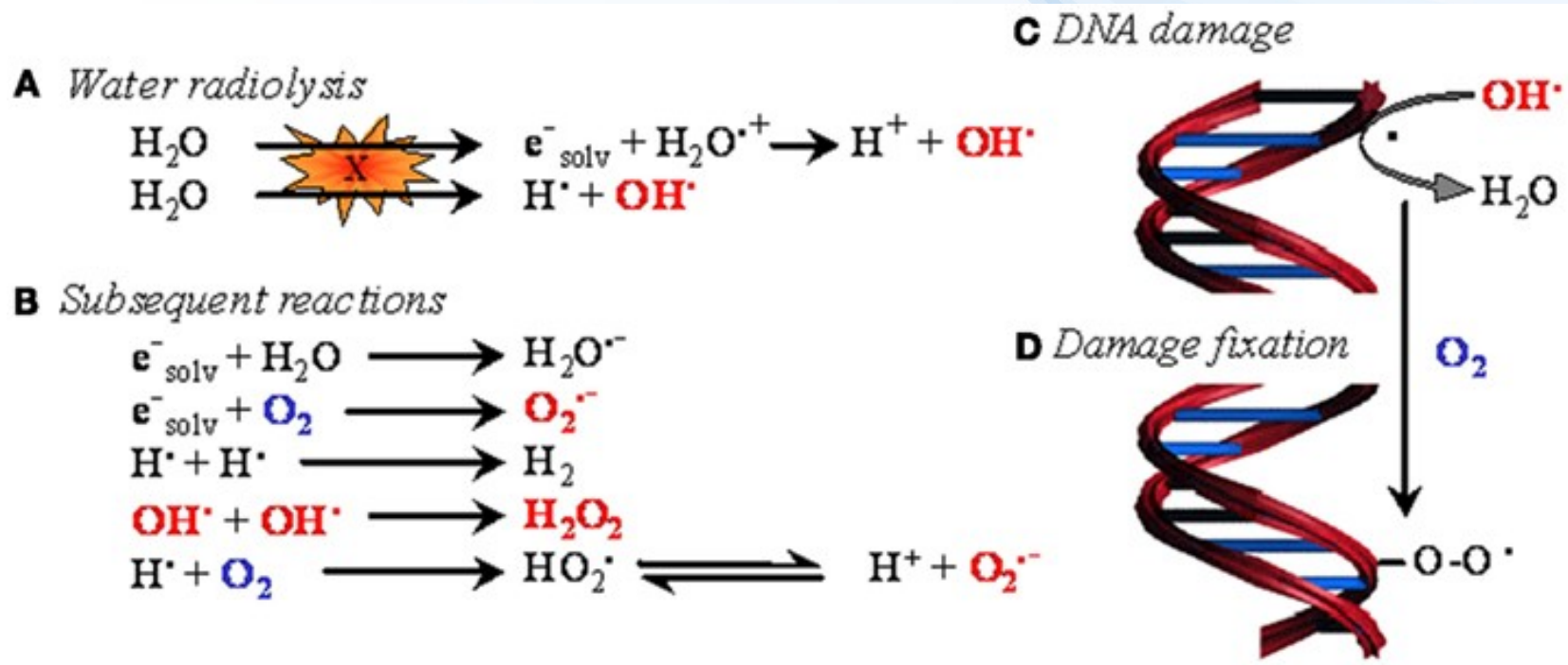
Další zdroje „oxidantů“ v buňce - záření

Ionizující záření

→ reakce s vodou v buňkách

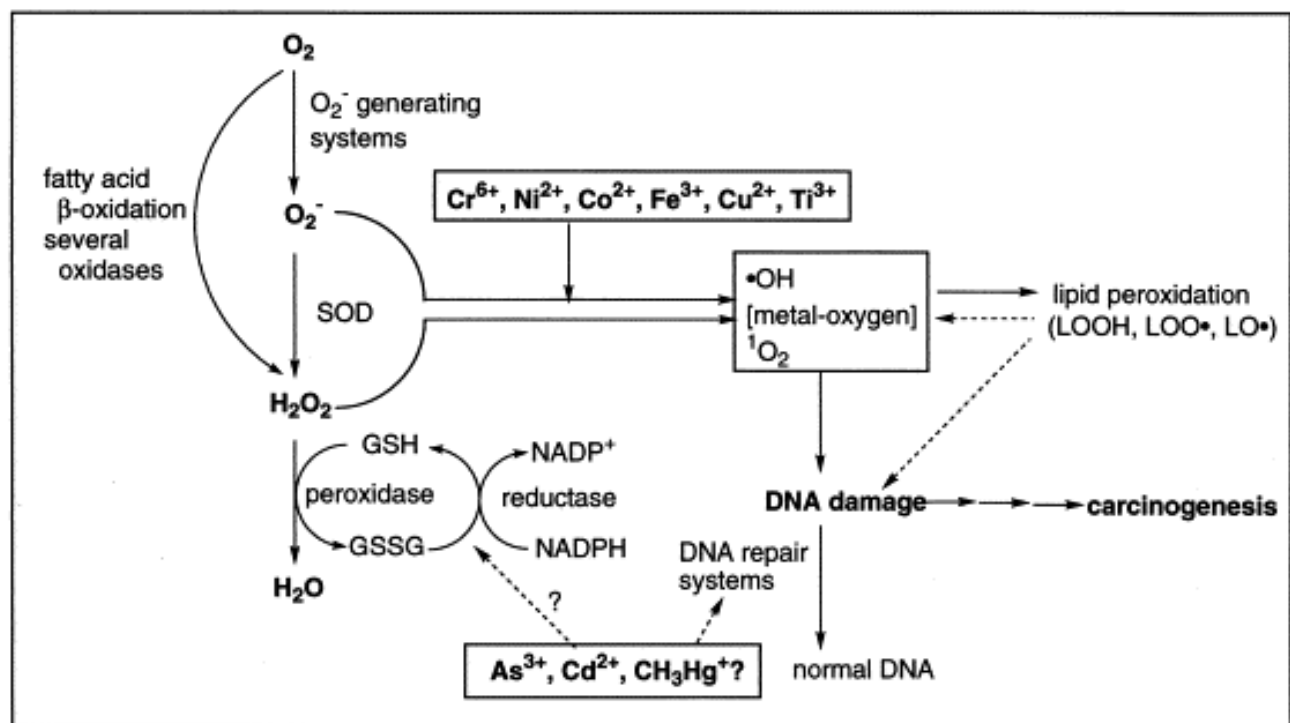
→ produkce ROS (OH-radikál)

→ základní mechanismus toxicity způsobené zářením !



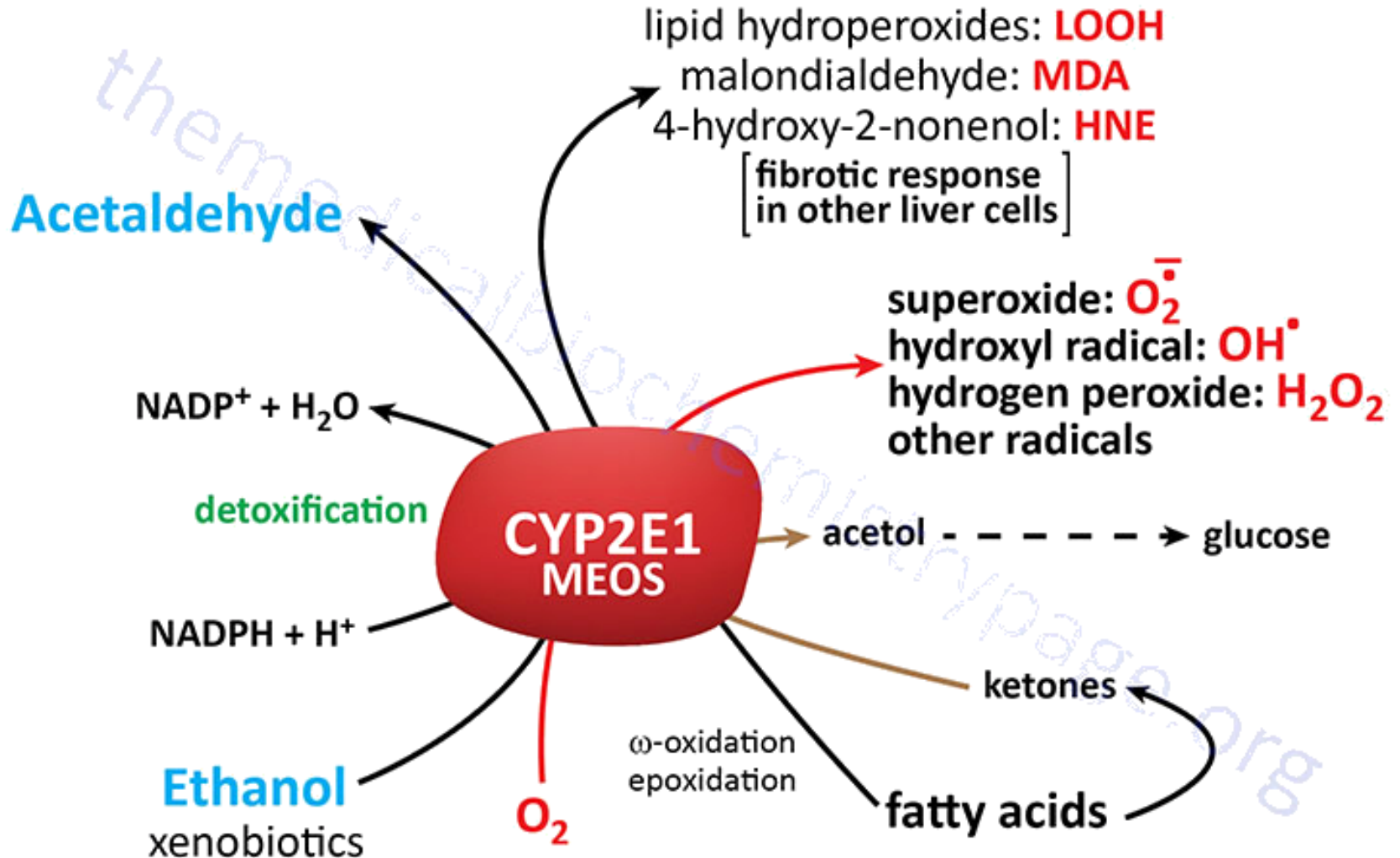
XENOBIOTIKA A OXIDAČNÍ STRES

- přímo reaktivní látky (např. epoxidy a další ...)
- metabolity vznikající při transformacích a detoxifikaci
 - Reakce s "antioxidanty" → omezení antioxidační kapacity
- toxické kovy (Fentonova reakce – katalýza rozkladu $H_2O_2 \rightarrow OH^*$)
- redoxní cyklátory – např. chinony
 - Indukce radikálů (viz příklad dole: kovy → ROS)



CYP450 jako zdroj ROS

(příklad CYP2E1, MEOS – microsomal ethanol oxidising system)



Oxidativní poškození buněčných součástí & biomarkery oxidativního poškození

BIOMARKER	AVAILABILITY	FREQUENTLY USED ASSAYS
Lipid Peroxidation		
F ₂ -isoprostanes	Plasma, urine	GC/MS, HPLC-MS/MS
Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL)	Plasma, serum	ELISA
Malondialdehyde (MDA)	Plasma, serum, saliva, urine, exhaled breath condensate	Colorimetry, spectrophotometry, HPLC + fluorescence, GC/MS
Protein Oxidation		
Protein carbonyls	Plasma, serum	ELISA
DNA Oxidation		
8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)	Plasma, serum, urine	HPLC-EC, HPLC-MS/MS*, GC/MS, Comet assay*



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)



Komplexní účinky – důsledky oxidativního stresu (akutní i chronické!)

Příklad – akutní infarkt myokardu (acute coronary syndrome; ACS)

Diseases Related to Oxidative Stress

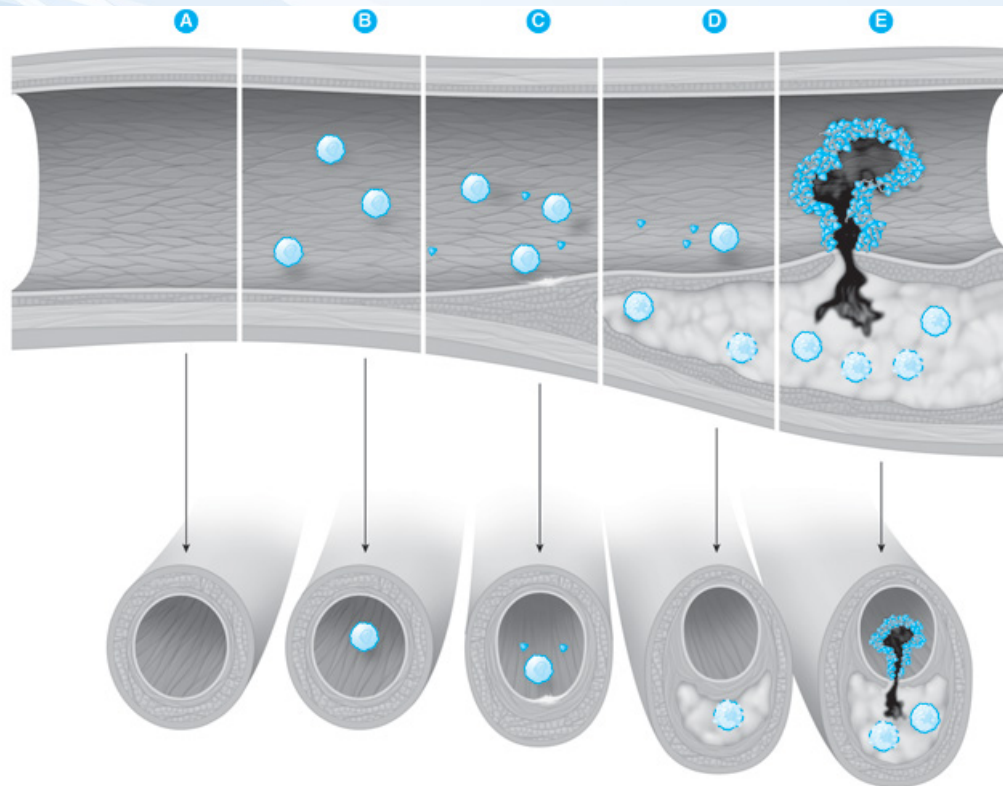
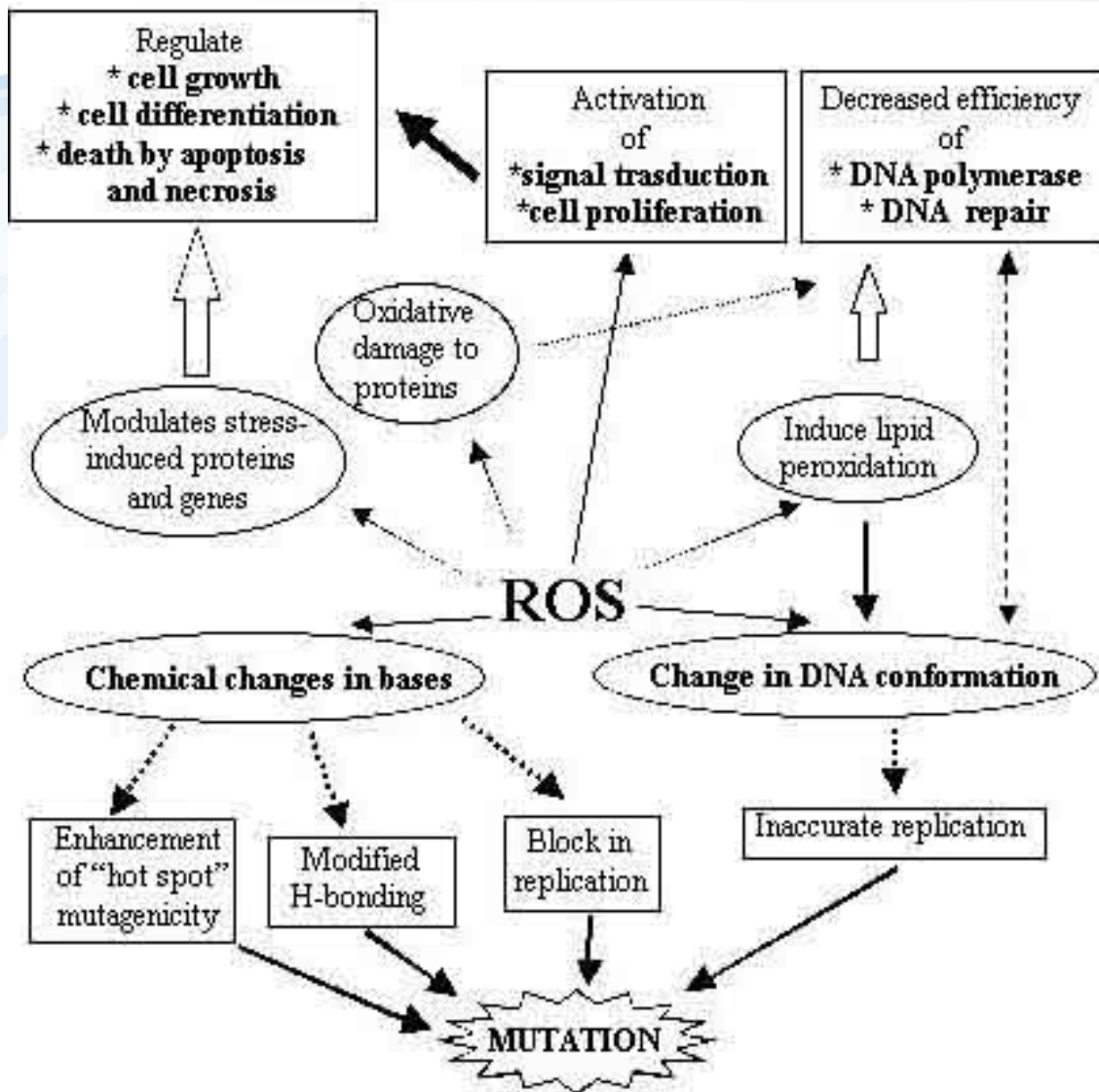


Figure 24-7. Pathogenesis of acute coronary syndromes. A. A normal coronary artery has an intact endothelium surrounded by smooth muscle cells. B. Endothelial cell activation or injury recruits monocytes and T lymphocytes to the site of injury, leading to development of a fatty streak. C. Continued oxidative stress within a fatty streak leads to development of an atherosclerotic plaque. D. Macrophage apoptosis and continued cholesterol deposition cause further plaque organization, and may induce the expression of additional inflammatory proteins and matrix metalloproteinases. At this stage, the cap of the fibroatheroma remains intact. E. Continued inflammation within an atherosclerotic plaque leads to thinning of the fibrous cap and, eventually, to plaque erosion or rupture. Exposure of plaque constituents to the bloodstream activates platelets and the coagulation cascade, with resulting coronary artery occlusion.

Credit: Figure 24-7: Adapted with permission from Libby P. Current concepts of the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104:365–372.



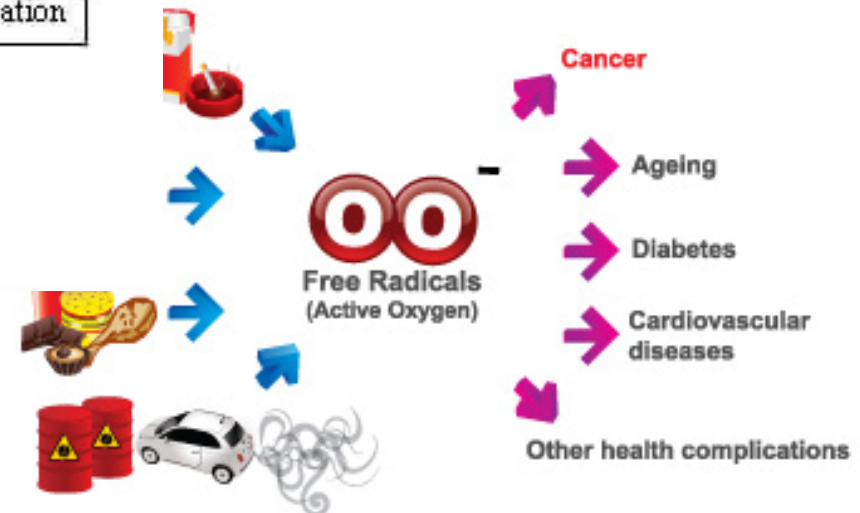


ROS a oxidace na molekulární úrovni

- DNA
- proteiny
- fosfolipidy

Důsledky:

→ Přímá toxicita, stárnutí, nemoci



Shrnutí

Přehled mechanismů:

ke každému znát principy, důsledky, příklady chemických látek

Základní typy toxicity

Nespecifická toxicita

- (ne)polární **narkotická** toxicita (bazální 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?