



Hlavní mechanismy toxicity cizorodých látek



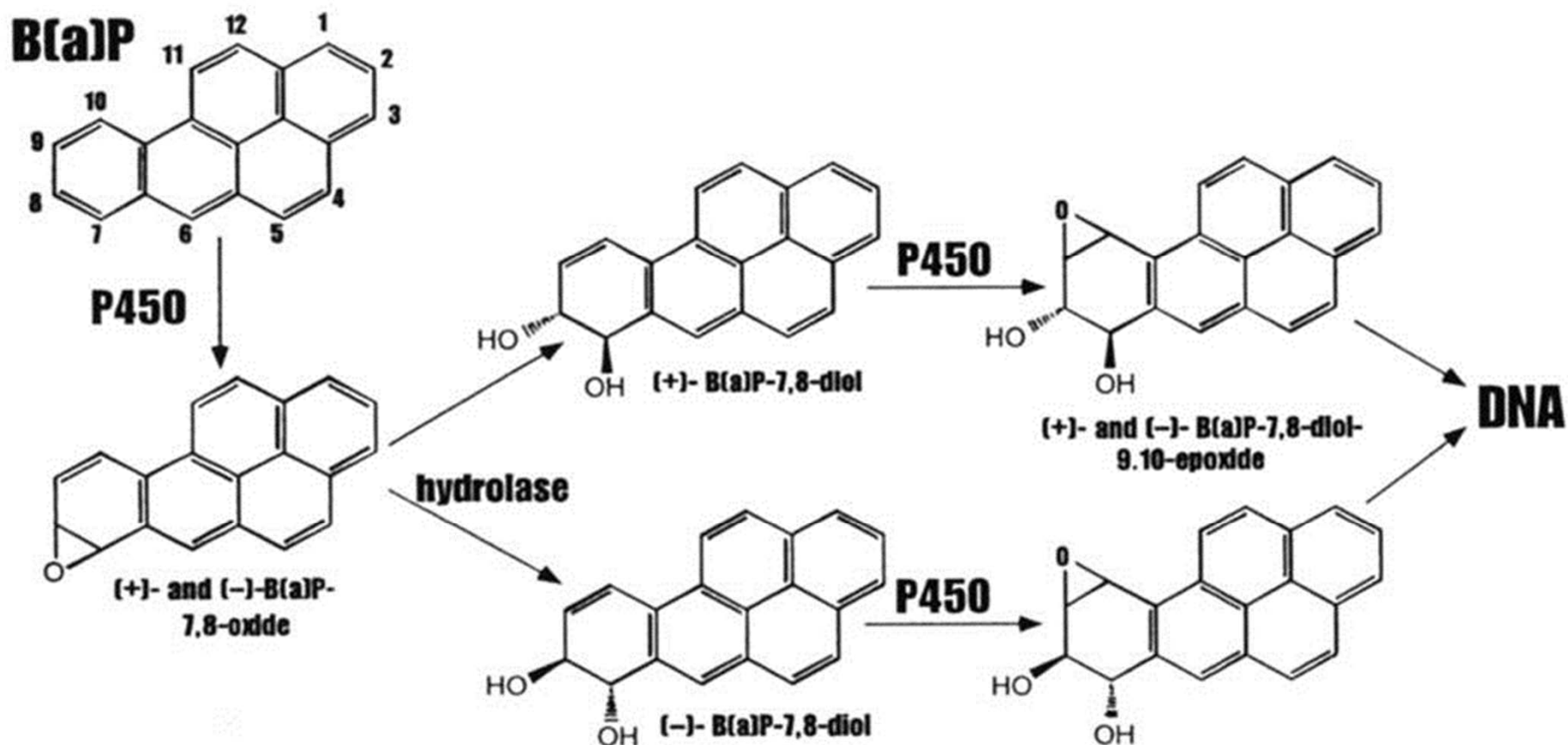
HLAVNÍ MECHANISMY TOXICITY XENOBIOTIK

- „Přímé“ mutageny / genotoxiny; metabolická aktivace promutagenů, adukty s DNA, chromosomální aberace; oxidativní stres - oxidativní poškození DNA
- Mechanismy nádorové promoce - (negenotoxické) modulace intracelulární signální transdukce a změny genové exprese, oxidativní stres aj. AhR-dependentní (dioxinová) aktivita. Efekty v plasmatické membráně
- Další receptor-dependentní mechanismy endokrinní disrupce (např. estrogenita, antiestrogenita)
- Inhibice mitochondriálních funkcí (respirace, syntéza ATP, ale také apoptóza - porušení mitochondriální membrány)
- Neurotoxicita, imunotoxicita, poruchy metabolismu endogenních látek atd.

GENOTOXICITA

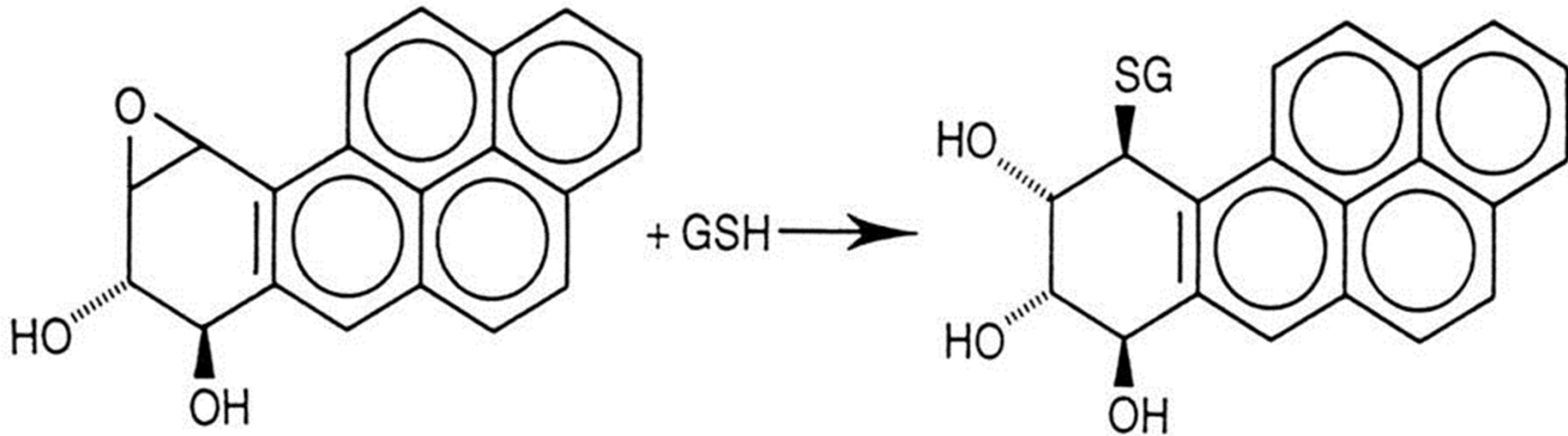
- Genotoxicita = potenciálně škodlivé účinky chemických látek nebo záření na genetický materiál; důsledkem nemusí být smrt buňky, ale trvalé genetické změny (mutace, chromosomální aberace aj.).
- Příklady hlavních genotoxinů: PAHs (benzo[a]apyren), alkyl-PAHs, aromatické a heterocyklické aminy, nitro-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

GENOTOXICITA - METABOLICKÁ AKTIVACE POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ



DETOXIKACE POLYCYKLIČKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ:

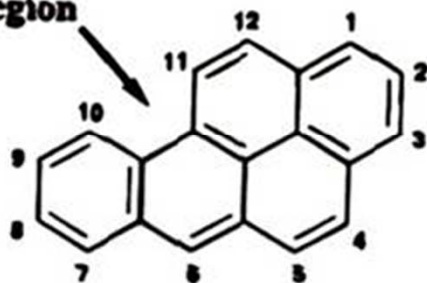
Protektivní úloha GST, UDPGT aj. enzymů 2. fáze biotransformace



Glutathione-S-transferase

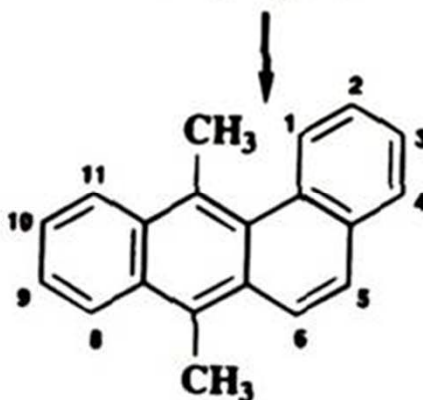
GENOTOXICITA - METABOLICKÁ AKTIVACE POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ

bay region



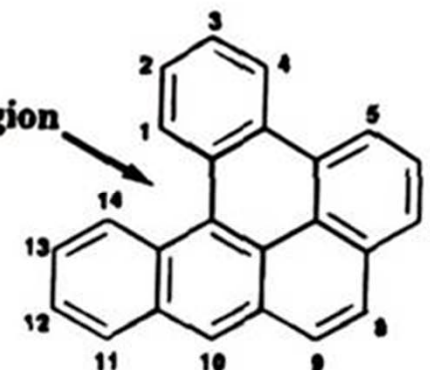
B[a]P

sterically hindered
bay region



DMBA

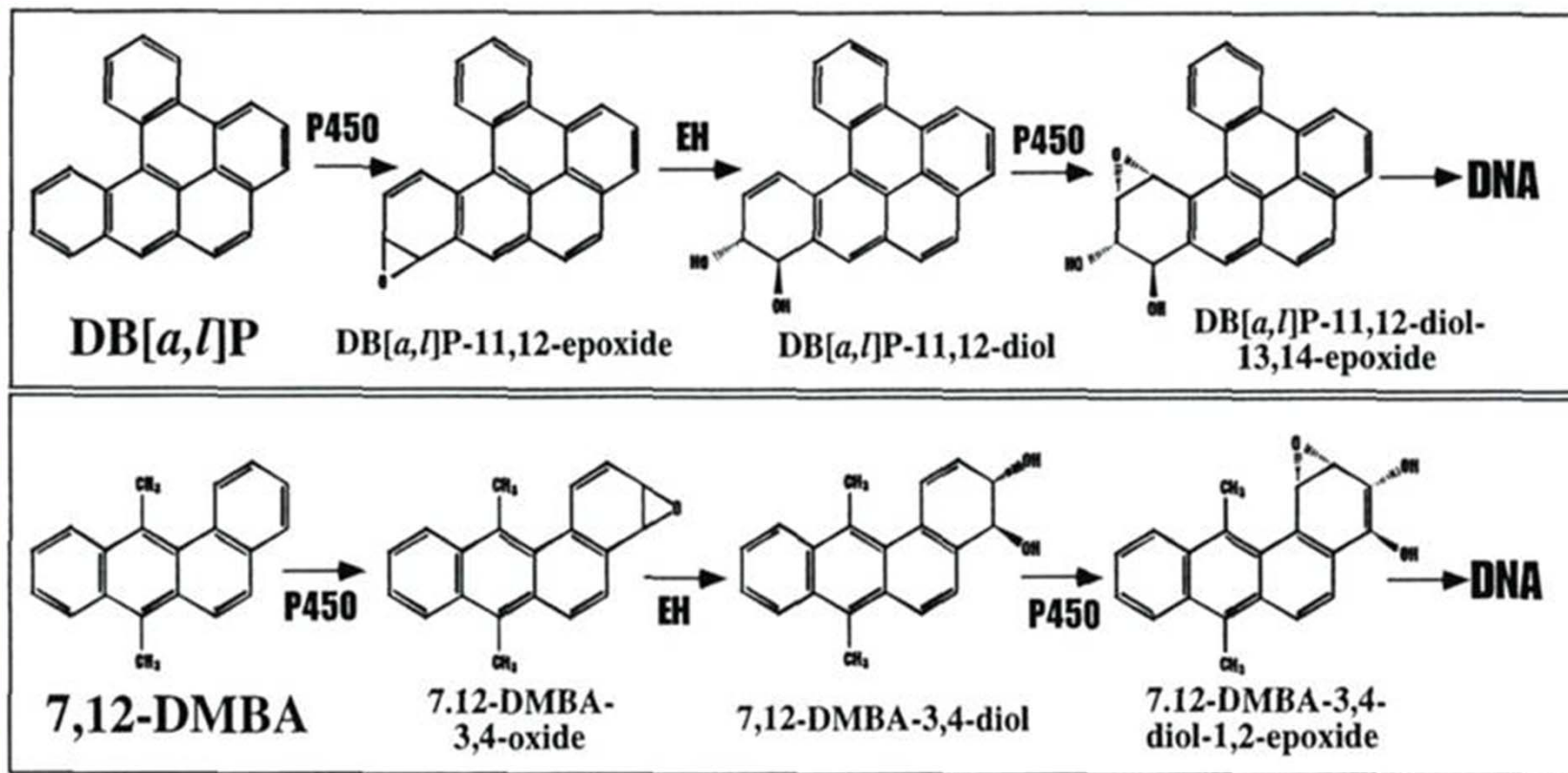
fjord region



DB[a,h]P

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

GENOTOXICITA - METABOLICKÁ AKTIVACE POLYCYKLIČKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ



Akrylamid: detoxikace vs. tvorba aduktů

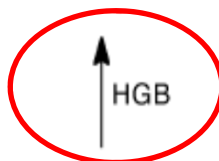
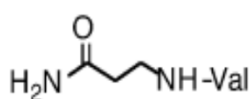
detoxikace

metabolická aktivace

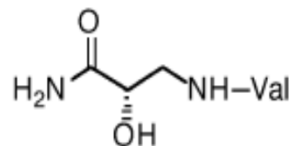
-tvorba aduktů s proteiny

-tvorba aduktů s DNA

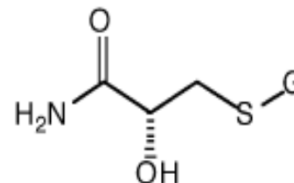
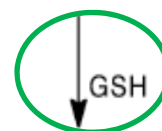
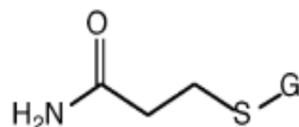
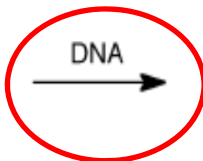
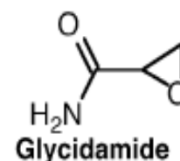
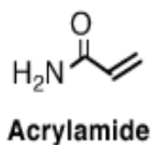
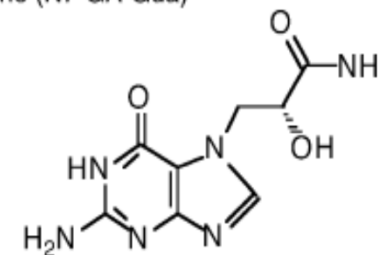
N-(2-carbamoylethyl)-valine (AAVal)



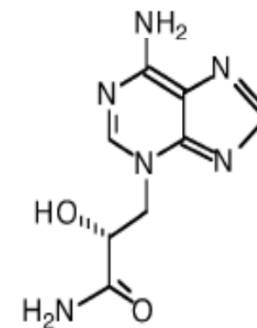
N-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-valine (GAVal)



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



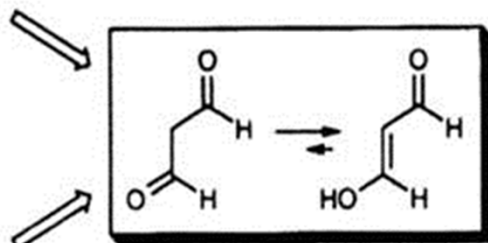
OR



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

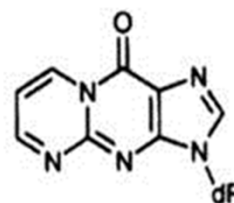
MALONDIALDEHYD - TYPICKÝ PRODUKT PEROXIDACE LIPIDŮ TVOŘÍ ADUKTY S DNA

Lipid Peroxidation

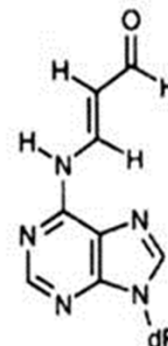


Prostaglandin Endoperoxides

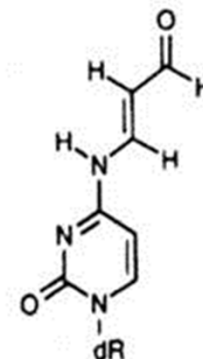
DNA



M₁G



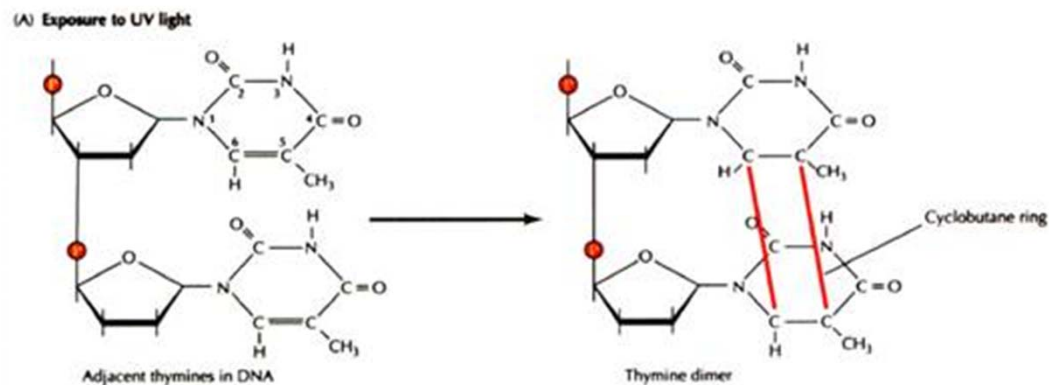
M₁A



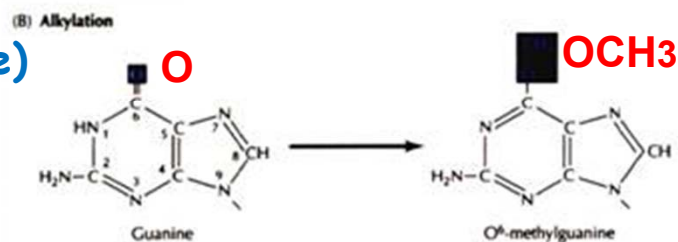
M₁C

2. HLAVNÍ TYPY POŠKOZENÍ DNA

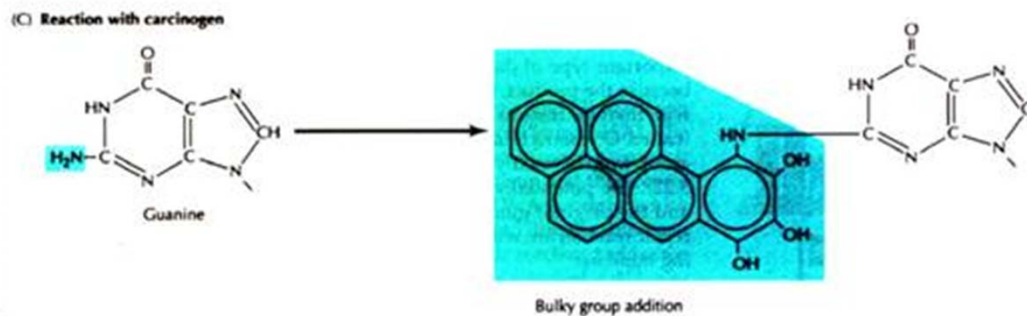
UV záření:
dimerizace



Alkylace (methylace)
= O \longrightarrow -OCH₃



Vznik objemných
aduktů
("bulky adducts")

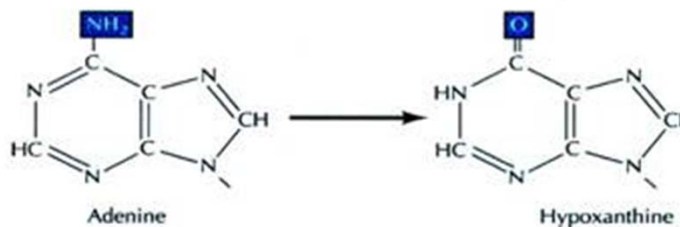
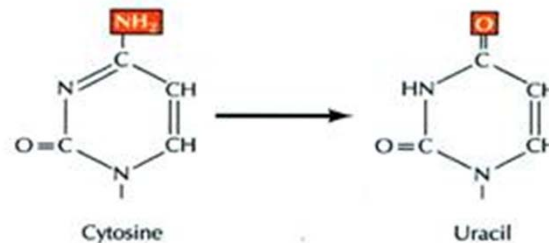


Oxidativní poškození
DNA - viz dále

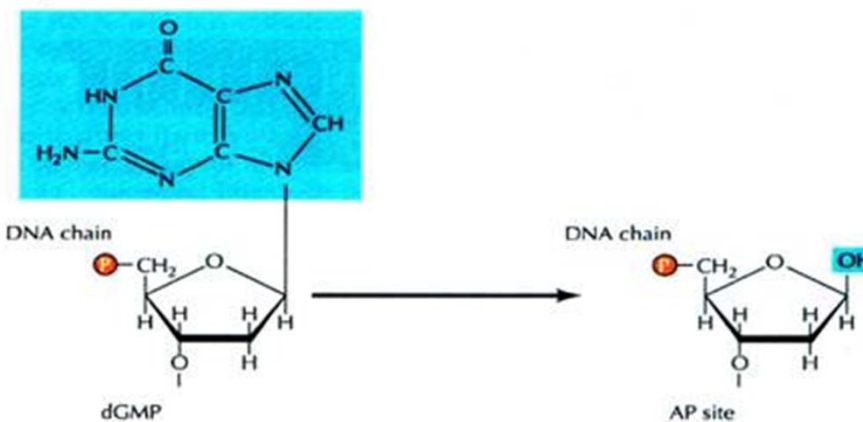
HLAVNÍ TYPY OXID. POŠKOZENÍ DNA ("apurinic sites")

Oxidativní deaminace

(A) Deamination

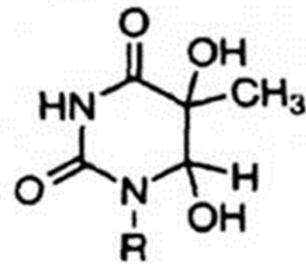


(B) Depurination

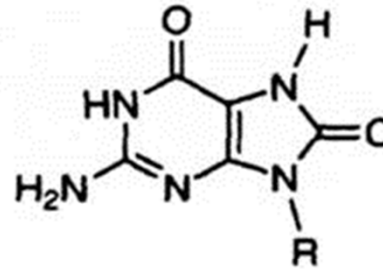


Depurinace (nestabilní
modifikované nukleotidy)

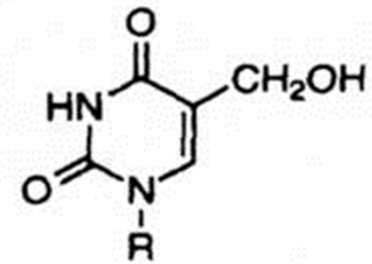
PRODUKTY OXIDATIVNÍHO POŠKOZENÍ DNA



thymine glycol

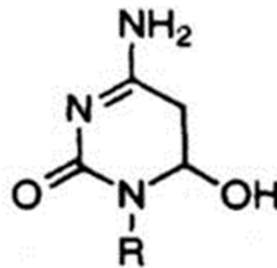


8-oxo-dG

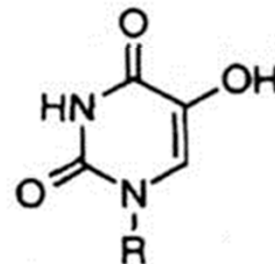


5-hydroxymethyluracil

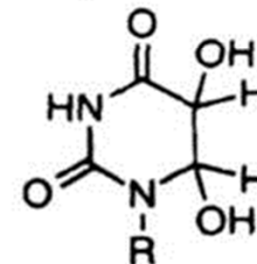
Biomarker
oxidativního
poškození
DNA
(stanovení
HPLC)



6-hydroxy-5,6-dihydrocytosine



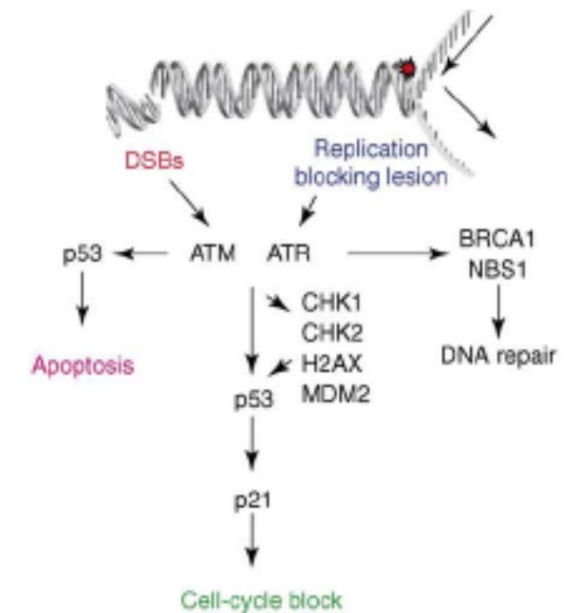
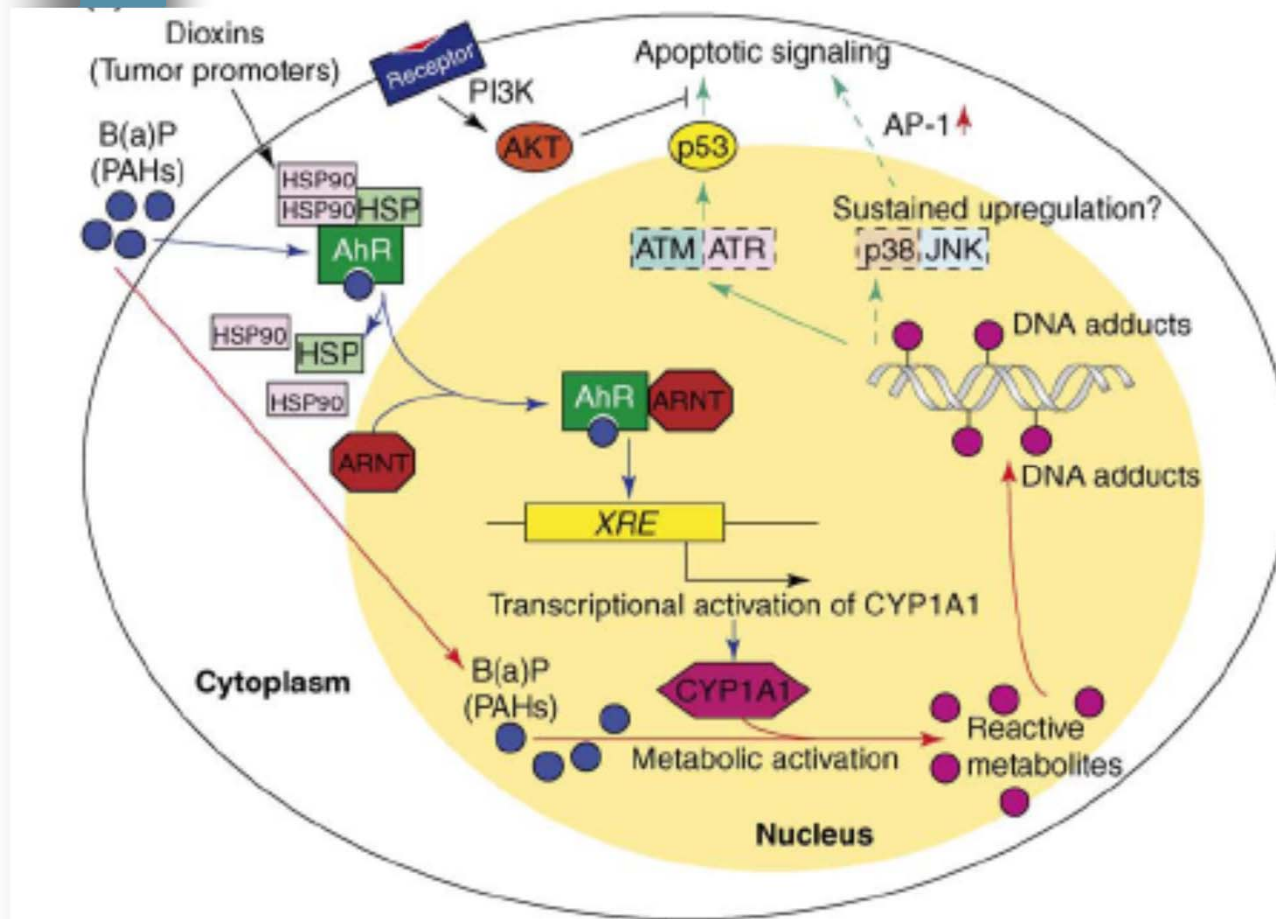
5-hydroxyuracil



uracil glycol

3. POSTGENOTOXICKÉ SIGNÁLY

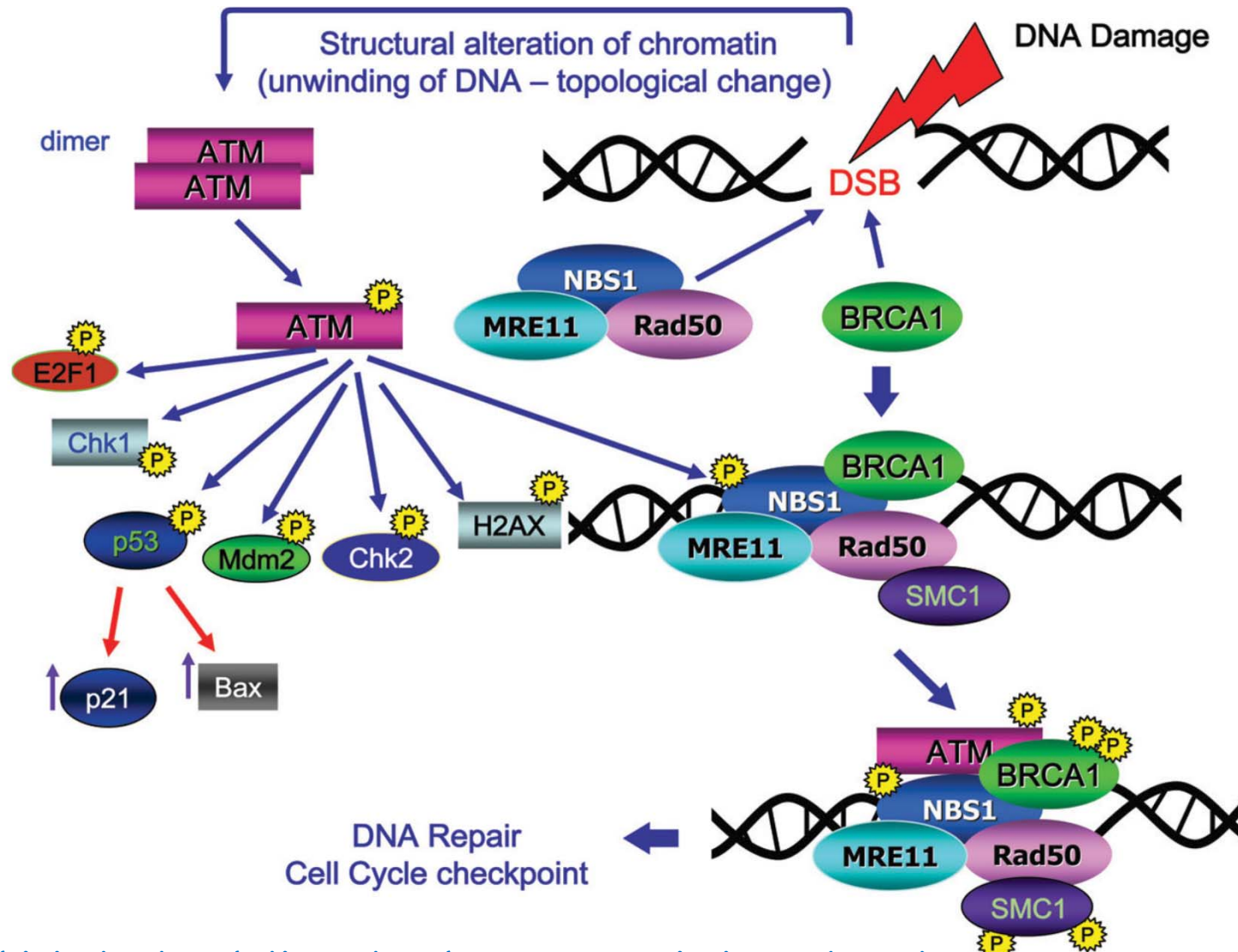
POSTGENOTOXICKÉ SIGNÁLY: sensory genotox. poškození, přenos post-genotoxických signálů a regulátory bun. cyklu, oprav DNA a apoptózy (H2AX, ATM, ATR, ChK1, ChK2, p53)



(podle Roos, Kaina, 2006)

POSTGENOTOXICKÉ SIGNÁLY

(sensory poškození a regulátory buněčného cyklu)



Příklad odpovědi na dvoušroubovicové zlomy (DSB)



OXIDATIVNÍ STRES



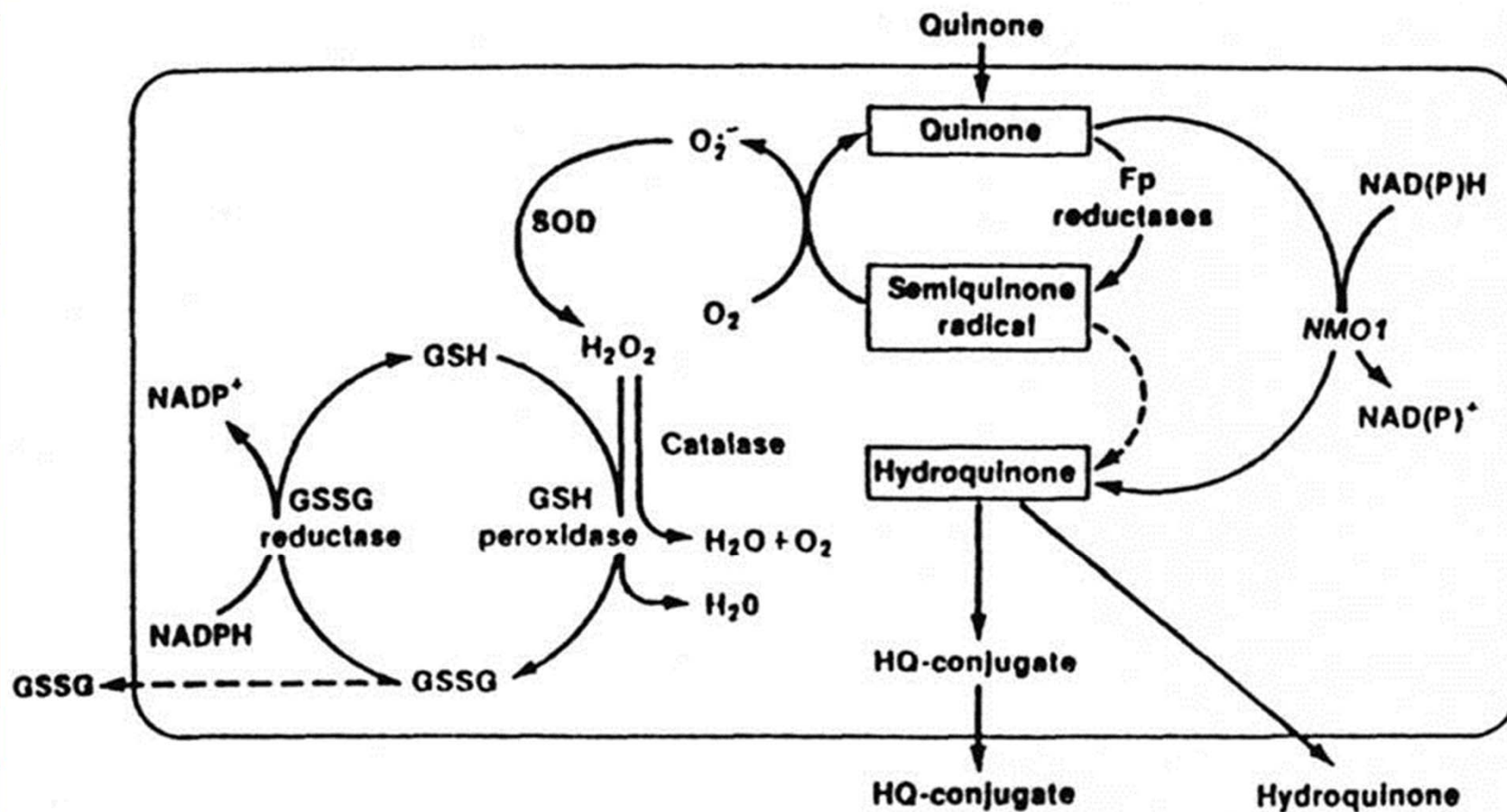
OXIDATIVNÍ STRES

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

Hlavní mechanismy:

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

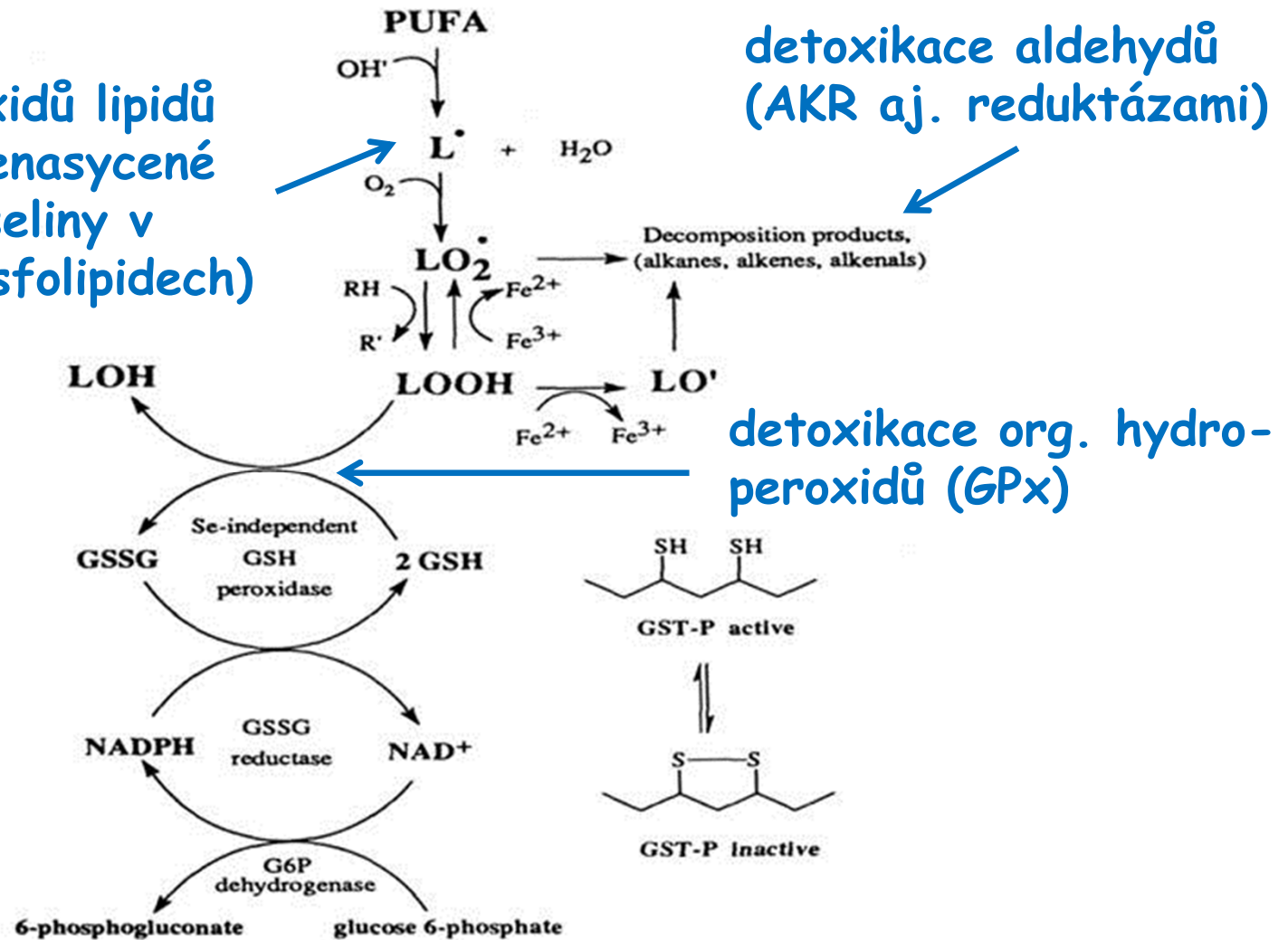
REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU: redoxní cyklování chinonů / antioxidační enzymy



PEROXIDACE LIPIDŮ

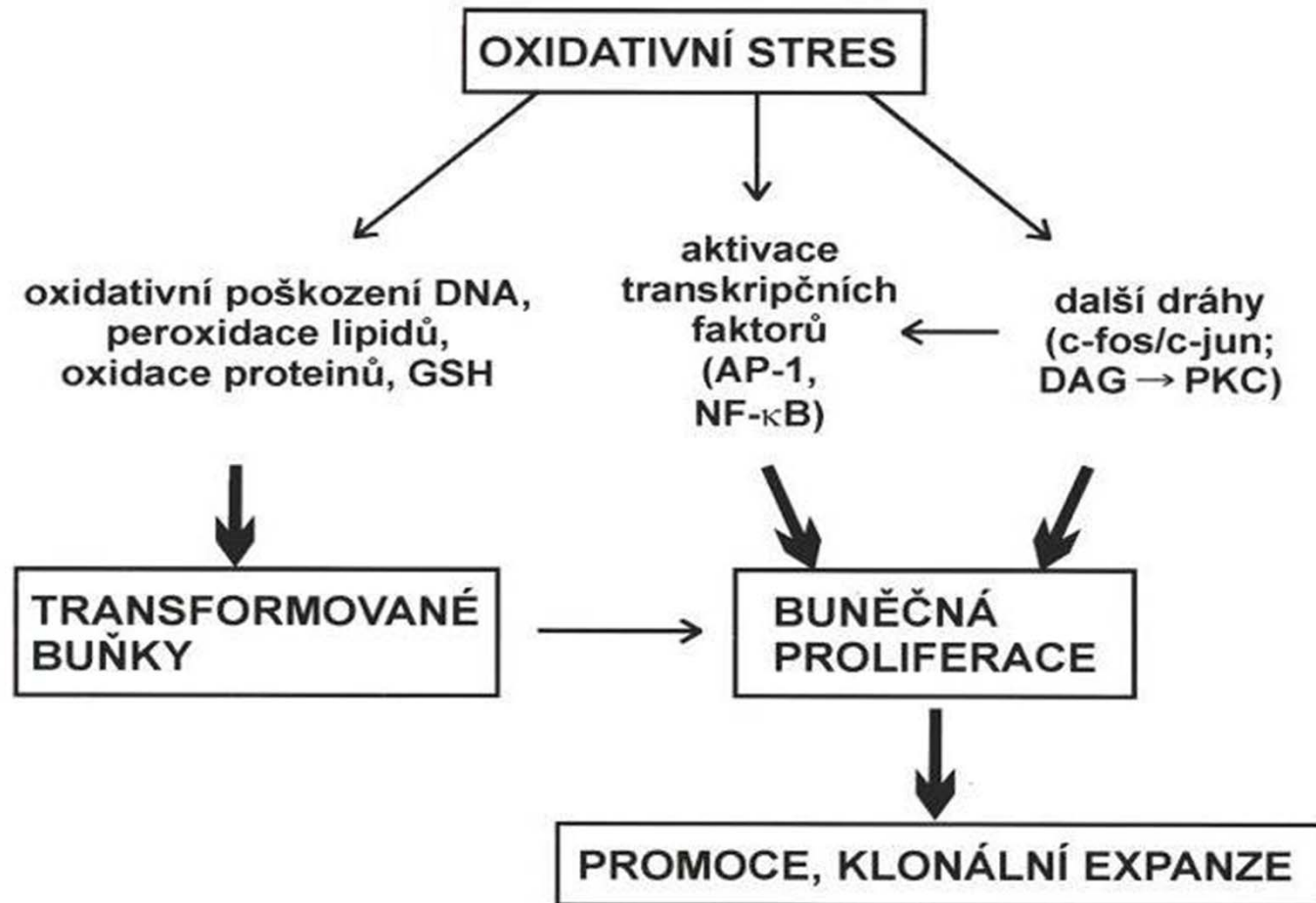
vznik peroxidů lipidů
(PUFA = nenasycené
mastné kyseliny v
membr. fosfolipidech)

detoxikace aldehydů
(AKR aj. reduktázami)



detoxikace org. hydro-
peroxidů (GPx)

DŮSLEDKY OXIDATIVNÍHO STRESU



(různé role ox. stresu v chemické karcinogenezi)



ENDOKRINNÍ DISRUPCE



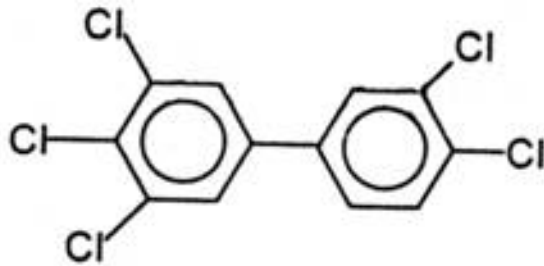
MECHANISMY ENDOKRINNÍ DISRUPCE

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

AKTIVACE AhR A NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ

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

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



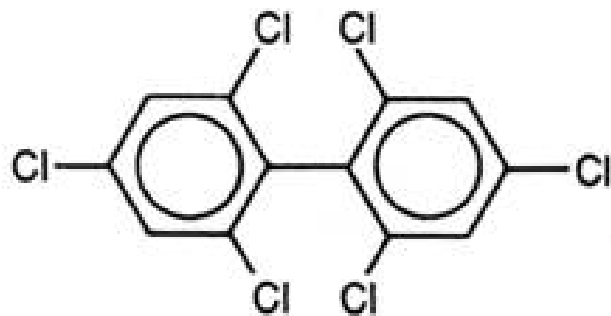
3,4,5,3',4'-pentachlorobifenyl
(PCB)

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

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

antiestrogenita (suprese ER-dependentní genové exprese;

indukce hydroxylace (inaktivace) estradiolu



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

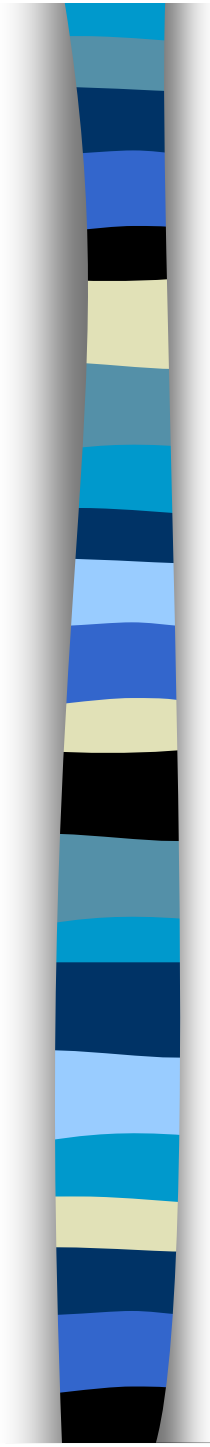
Nekoplanární PCB:

nízkomolekulární kongenery mají estrogení aktivitu (aktivace ER);

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

vazba na thyroid-binding protein;

vazba na RyR (disrupce Ca²⁺ signálování = neurotoxicita)



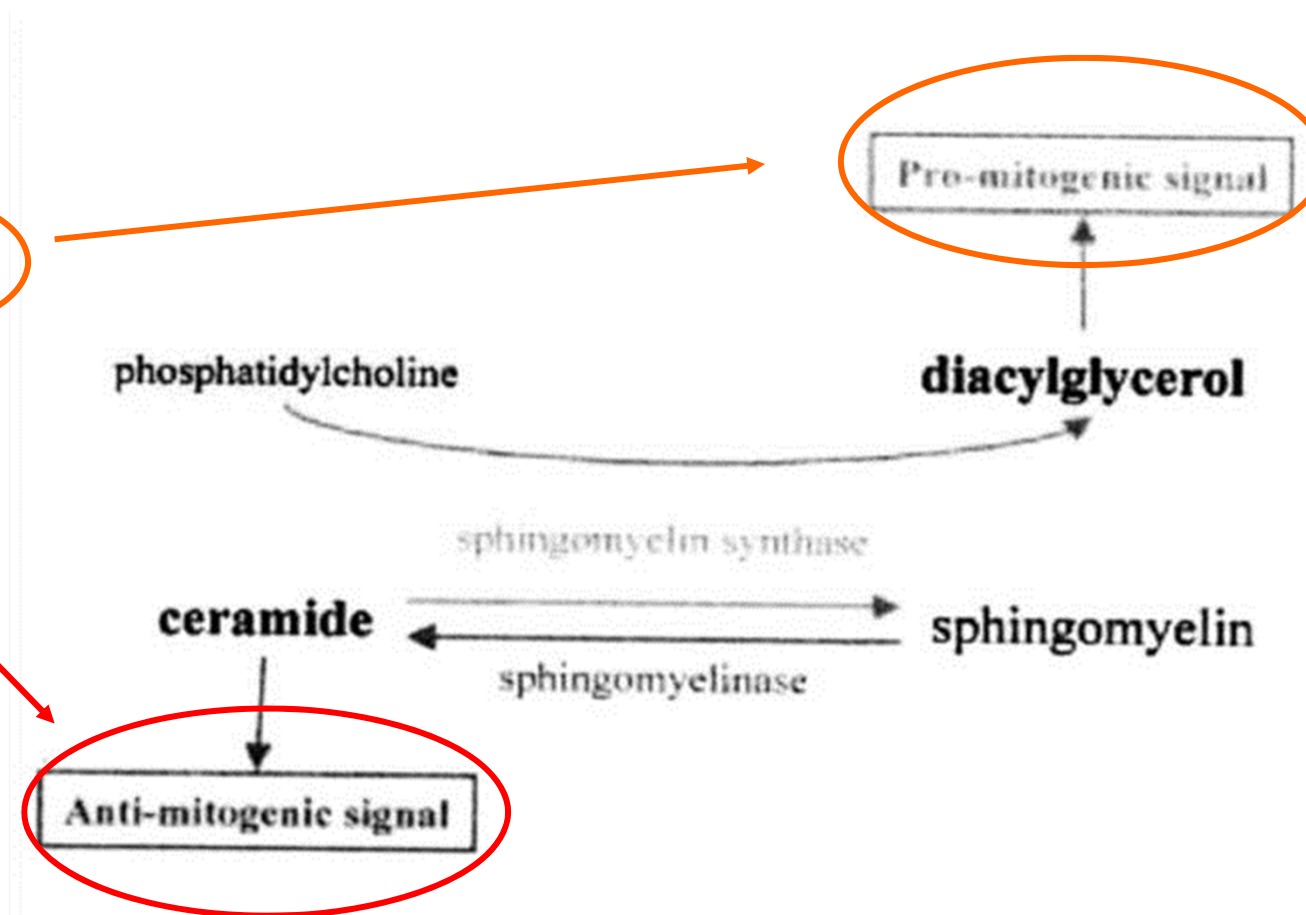
**VLIV CIZORODÝCH LÁTEK NA
METABOLISMUS A HOMEOSTÁZI
LIPIDŮ**

Xenobiotika ovlivňují syntézu a metabolismus lipidů: role syntézy ceramidu a DAG v signální transdukci

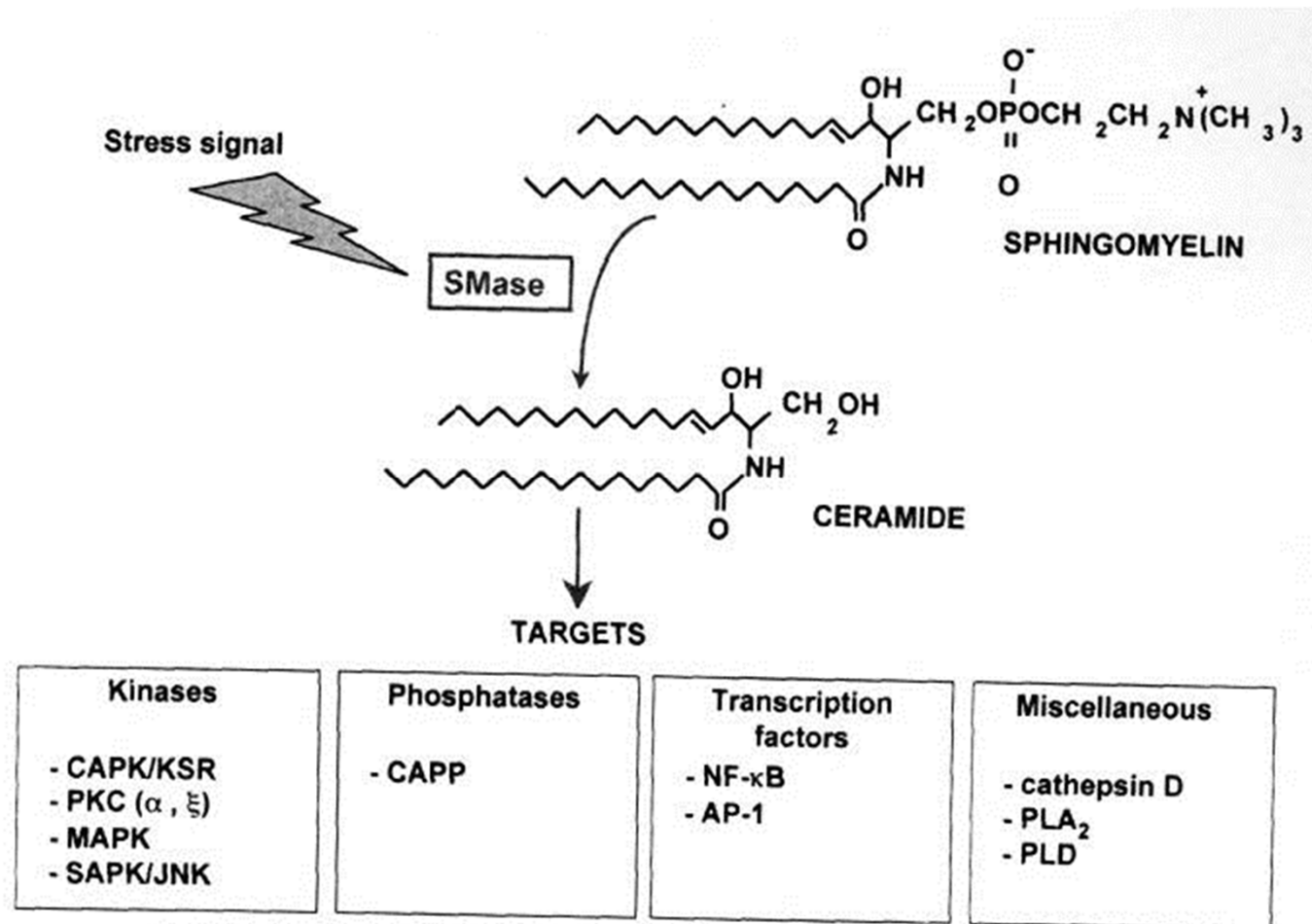
PC-PLC a
SMsyntáza

versus

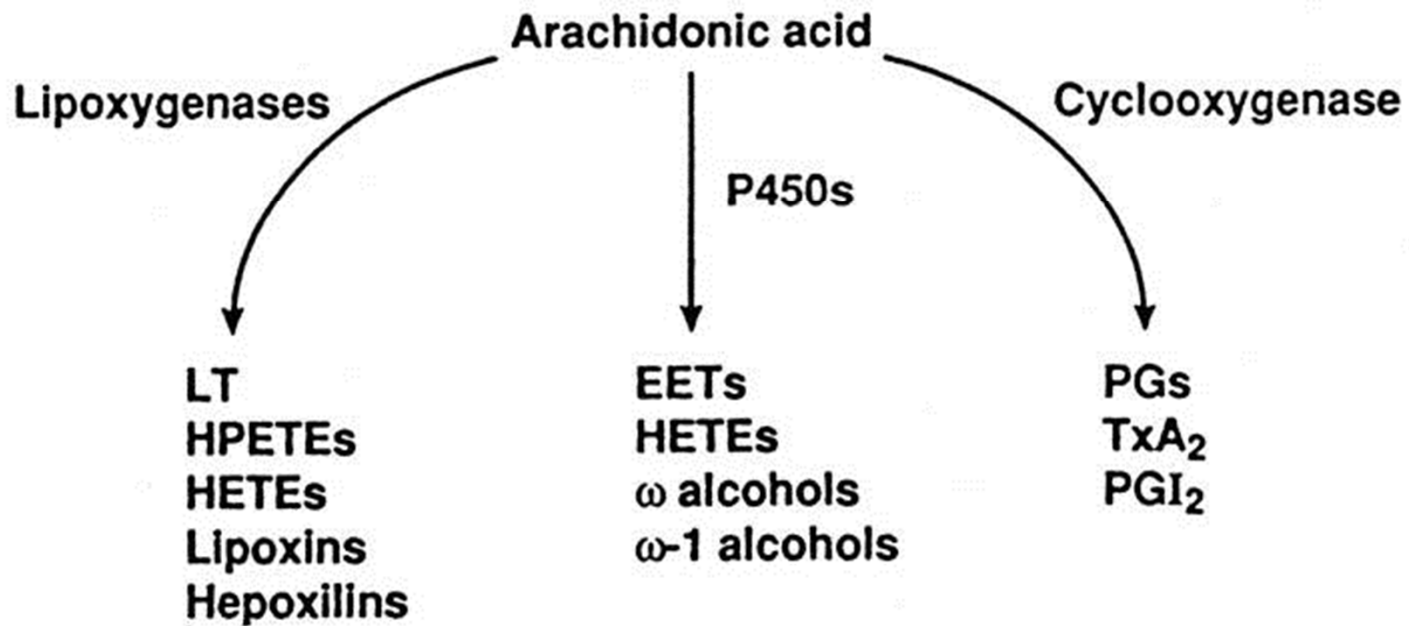
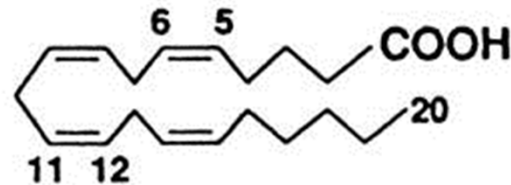
SMáza



BIOTRANSFORMACE LIPIDŮ: ceramid aktivuje enzymy signální transdukce



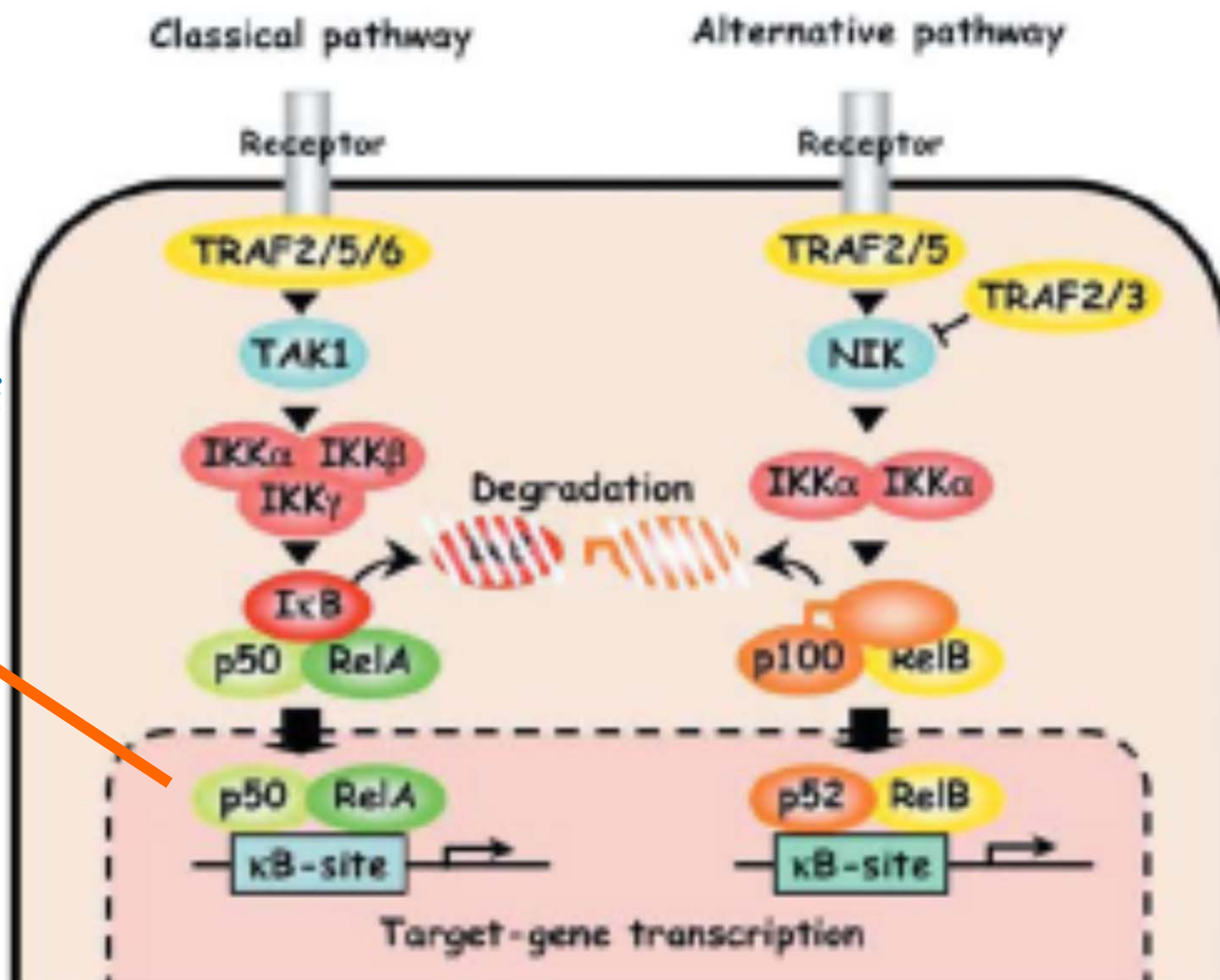
**Produkce mediátorů zánětlivých procesů a
toxických lipidových metabolitů
(kyselina arachidonová jako substrát pro
enzymy CYP, LOX a COX)**



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

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

PROZÁNĚTLIVÉ
PROCESY

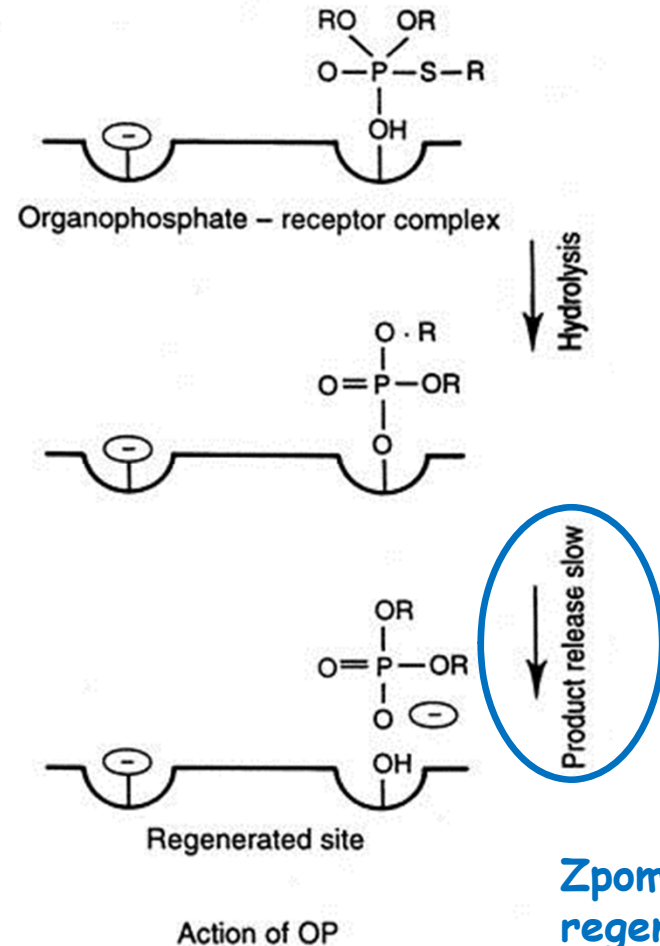
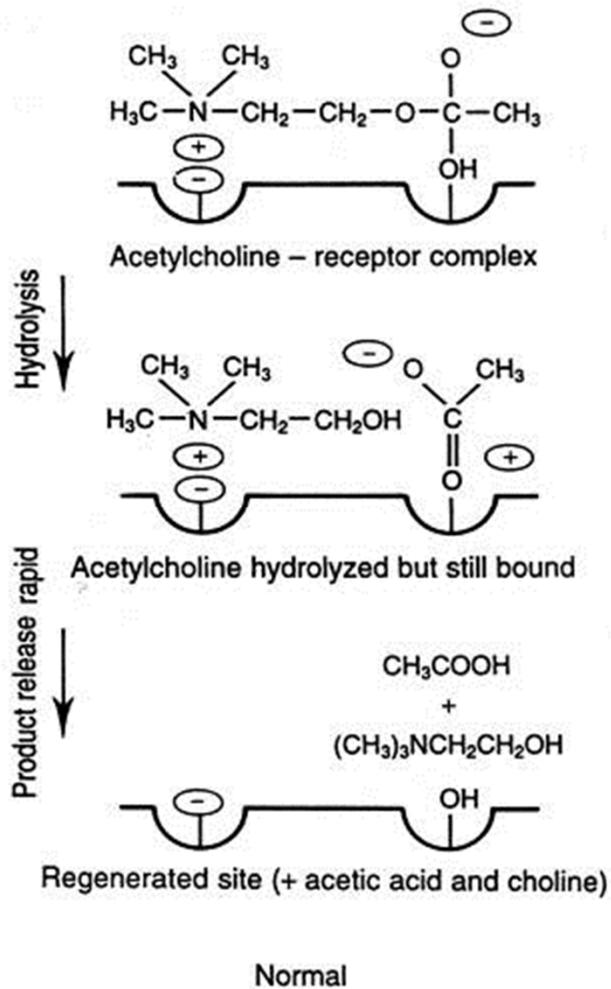




NEUROTOXICITA

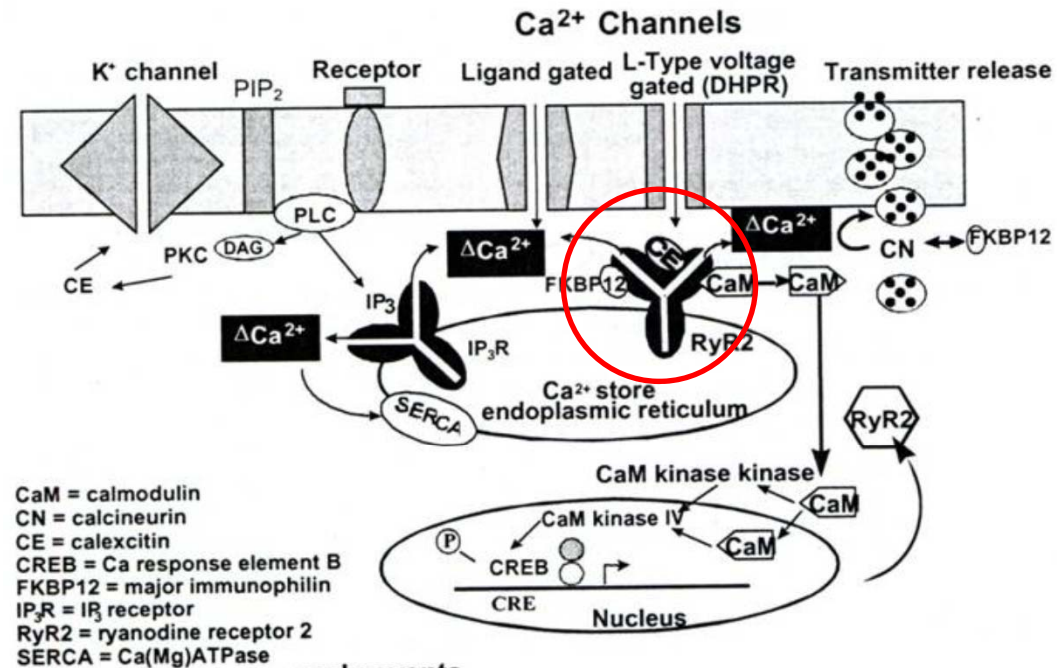
- Inhibice acetylcholinesteráz (např. karbamáty, organofosfáty, ..)
- Modulační uvolňování dopaminu; efekty na další signálování pomocí neurotransmiterů (efekty na cholinergní receptory apod.)
- Interakce s ryanodine receptorem (RyR) - deregulace Ca^{2+} koncentrací = modulační Ca^{2+} -dependentní enzymů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

NEUROTOXICITA: inhibice acetylcholinesterázy (AChE)



Zpomalení regenerace vazebného místa (uvolnění produktu esterázové reakce)

NEUROTOXICITA: interakce s RyR a modulate Ca²⁺



early events

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

late events



IMUNOTOXICITA

- Obecně mohou být po expozici xenobiotiky porušeny všechny typy humorální a buněčné imunity
- Apoptóza vede k supresi krevních buněk (příklad: benzo[a]pyren je cytotoxický v relativně nízkých koncentracích)
- Suprese funkce a hmotnosti thymu (dioxiny, koplánárními PCB aj. AhR agonisty)
- Poruchy indukce protilátkové odpovědi a další mechanismy



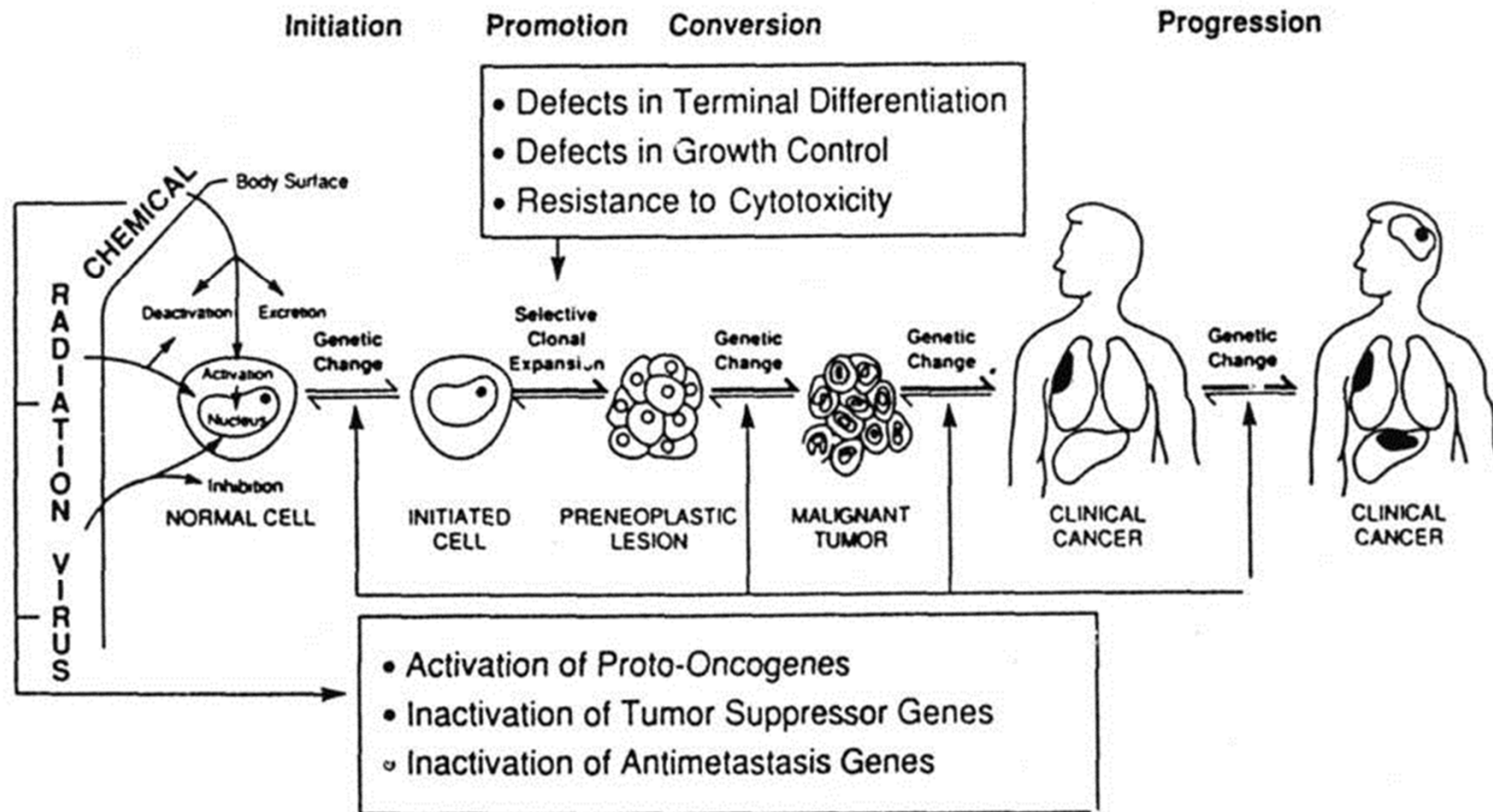
CHEMICKÁ KARCINOGENEZE - základní koncept:

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

- **Faktory ovlivňující mutagenitu/genotoxicitu a karcinogenitu:**
 - 1) genetické predispozice („susceptibility“);
 - 2) environmentální faktory (chemické kontaminanty, nutriční vlivy), kombinace 1 + 2;
 - 3) suprese imunologických funkcí;
 - 4) neznámé faktory

- **Cizorodé látky mohou ovlivňovat všechny uvedené procesy**

CHEMICKÁ KARCINOGENEZE



Vznik mutací - genetická instabilita prakticky ve všech fázích



SUSCEPTIBILITA

- polymorfismus CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2E1, GSTM1, NQO1, NAT aj. genů biotransformačních enzymů;
- DNA repair; mutace v tumor-supresorových genech;
- otázka etnik, pohlaví, věku;
- komplexní vlivy spolu s nutričními návyky (včetně mikronutrientů, vitamínu, PUFA aj.).

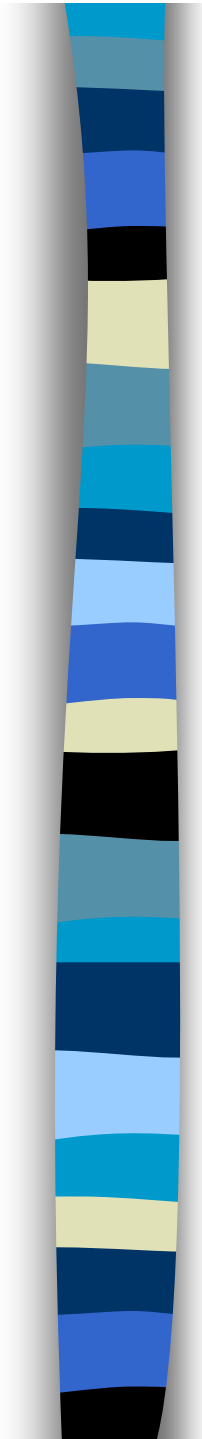
ENVIRONMENTÁLNÍ EXPOZICE

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

PREKLINICKÉ EFEKTY

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

CHEMICKÁ KARCINOGENEZE

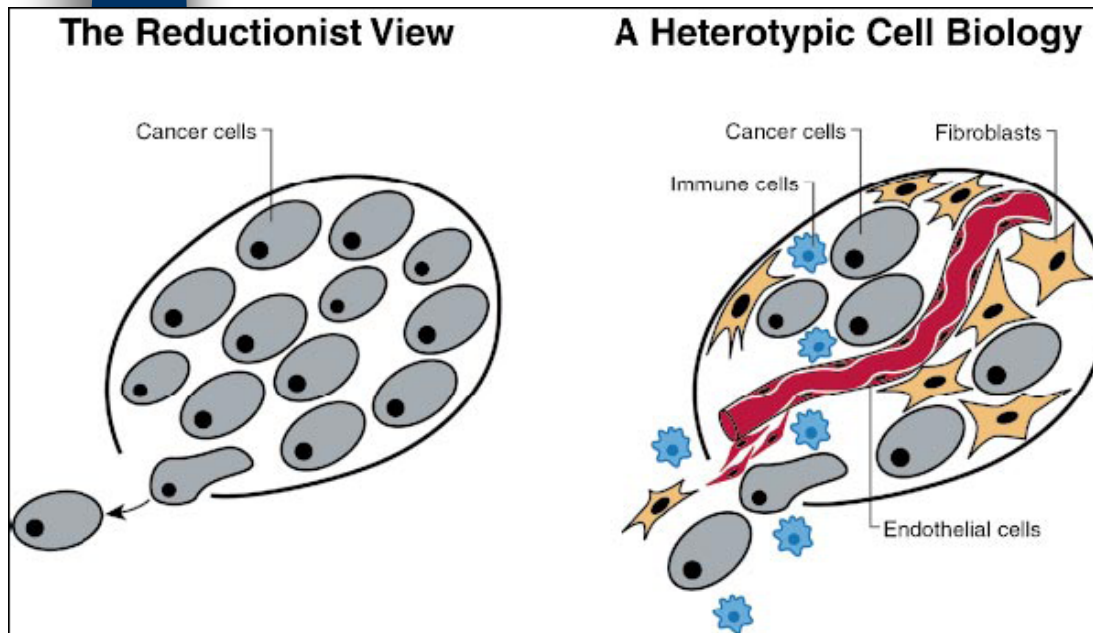
- 
- **GENOTOXICKÉ KARCINOGENY** reagují s DNA a ireversibilně pozměňují genom (bodové mutace, změny v chromosomální struktuře, zlomy, výměny sesterských chromatid, klastogeny); interakce chemických látek s DNA: alkylace, oxidativní poškození nukleotidů, interkalace. **INICIACE** zahrnuje mutace genů DNA repair, onkogenů (ras, myc aj.) a tumor-supresorových genů (např. p53) - genů kontrolujících buněčný cyklus a proliferaci (PAHs, nitro-PAHs, NNK aj. nitrososloučeniny)
 - **NEGENOTOXICKÉ KARCINOGENY** modulují signální transdukci a gen. expresi - pozměněna proliferace a diferenciace, inhibována apoptóza a mezibuněčná komunikace; především působí ve fázi **PROMOCE** karcinogeneze (dioxiny, PCB, OCP, azbest, křemenný prach, keramická vlákna, kovové ionty, např. Co, Mn, Ni, Cr, Be)
 - **KOKARCINOGENY** - samy nejsou nutně karcinogenní, potencují aktivaci chemických karcinogenů



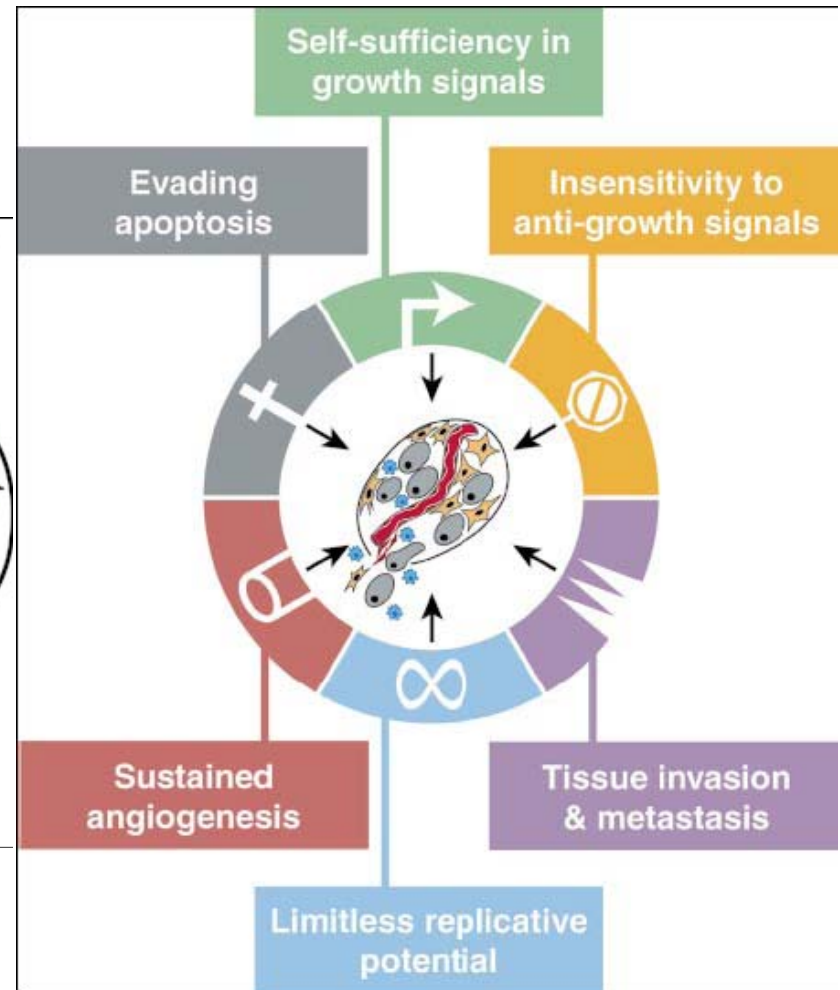
MECHANISMY NEGENOTOXICKÝCH PROCESŮ

- aktivace nebo suprese transkripčních faktorů (AhR, NF-κB,...), „klasické“ **epigenetické** mechanismy (de/methylace DNA nebo acetylace/deacetylace histonů);
- aktivace **intracelulární signální transdukce** (ERK1/2, ...);
- strukturní a funkční změny **cytoplasmatické membrány**, efekty na intercelulární komunikaci (např. inhibice GJIC, disrupce adherence)
- vyvázání se z homeostatické kontroly okolních buněk, angiogeneze, procesy související s progresí a metastázemi

ZÁKLADNÍ MECHANISMY NÁDOROVÁ PROMOCE



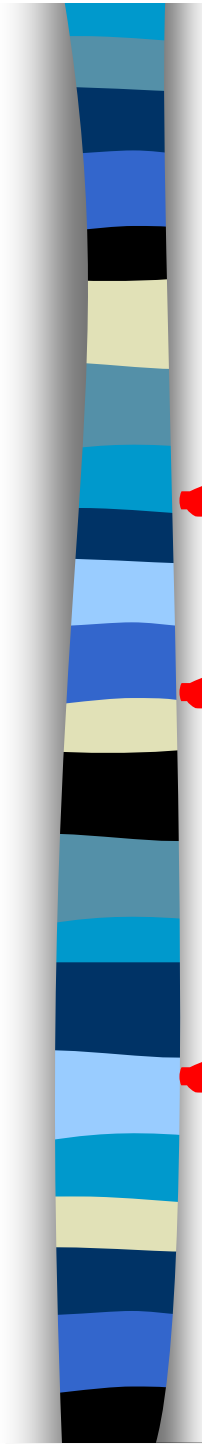
(Hannahan, Weinberg, 2000)





ZÁKLADNÍ MECHANISMY NÁDOROVÉ PROMOCE

- Mitogenní efekt, **zvýšení buněčné proliferace**, vyvázání z kontaktní inhibice růstu (role onkogenů - mutanty ras, myc, β -cat,.. a inaktivace tumorových supresorů)
 - interference s transdukčními signály, které kontrolují normální buněčný růst a diferenciaci (aktivace EGFR/ErbB2-ras-ERK, aktivace proteinkinázy C např. produkcí DAG po expozici forbolestery), produkce ROS, aberantní produkce růstových faktorů atd.
 - aktivace ER- nebo AR-dependentní buněčné proliferace
- **Inhibice apoptózy** (nefunkční tumorové supresory, např. p53) = další mechanismus přežívání buněk
- Inhibice mezibuněčné komunikace (GJIC), disrupce adherence buněk, angiogeneze, přechod z epiteliálního na mesenchymální fenotyp buňky

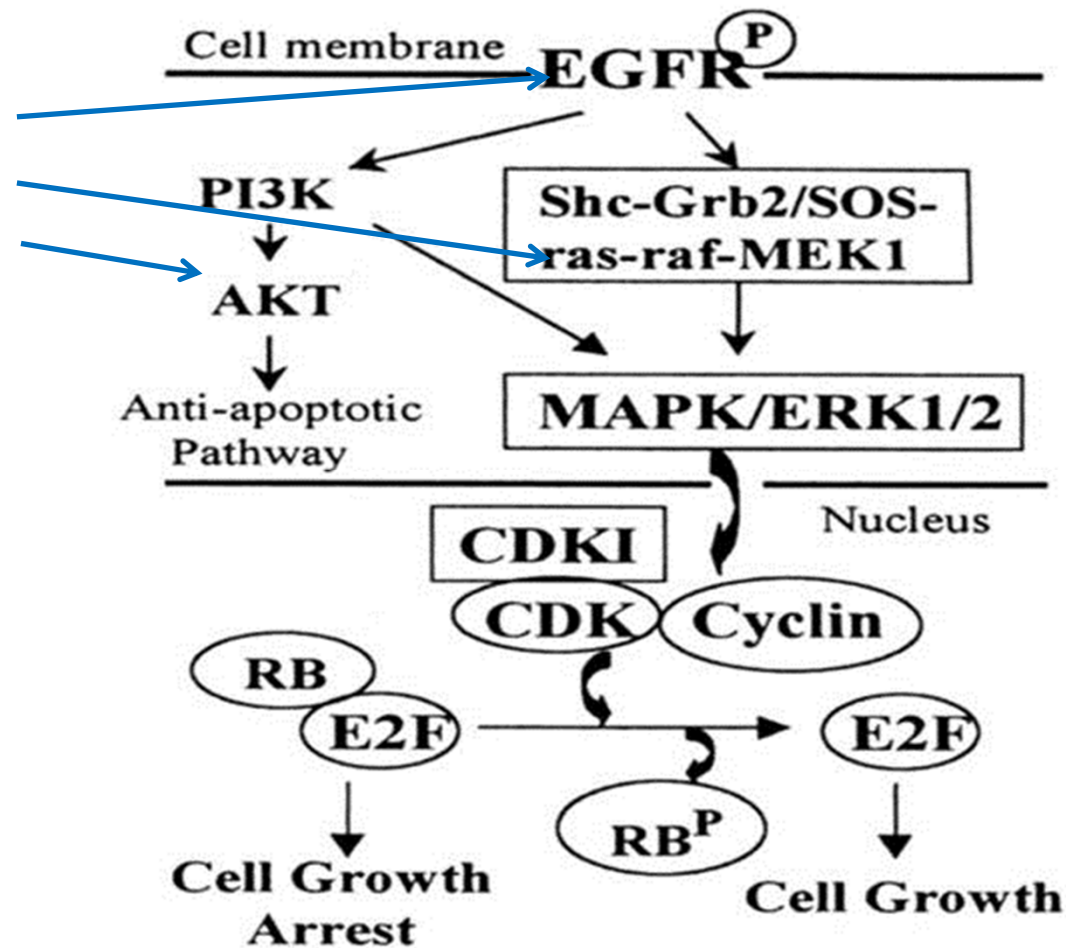


HLAVNÍ MECHANISMY TUMOR. PROMOCE XENOBIOTIK NA BUNĚČNÉ ÚROVNI (jsou výsledkem molekulárních procesů, např. změn genové exprese, v buňce a na povrchu buňky)

- Modulace buněčného cyklu, zvýšená proliferace buněk, modulace diferenciací, inhibice apoptózy
 - Disrupce mezibuněčných spojení (gap junctions, adherens junctions,...)
- ↓
- Přežívání, transformace buněk (komplexní mnohastupňový proces iniciace a promočních mechanismů - de/diferenciací, angiogeneze, ...)

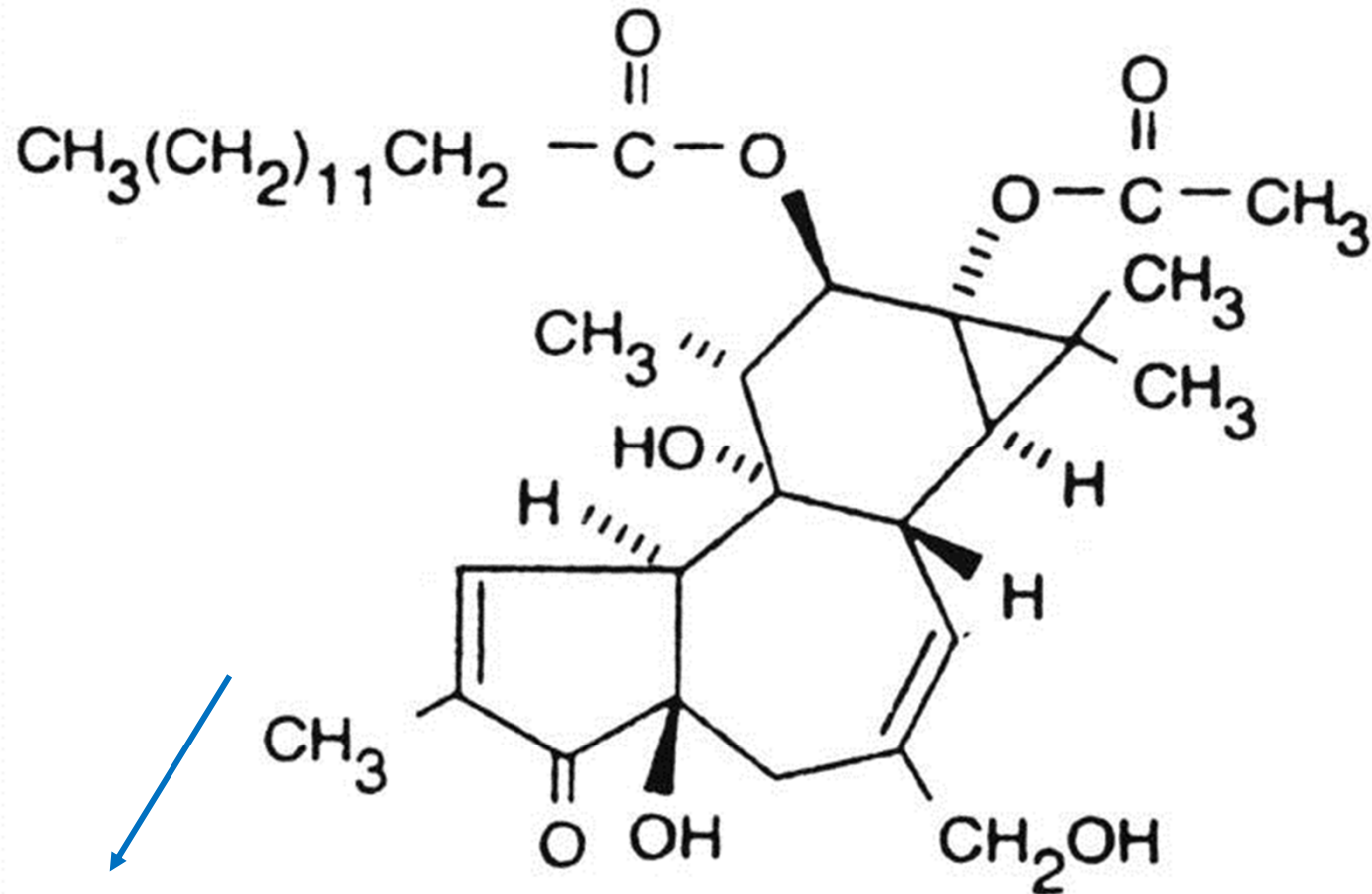
PŘÍKLAD AKTIVACE BUN. PROLIFERACE (aktivací signální transdukce)

velmi časté
mutace =
chronická
aktivace
proliferačních
drah



MECHANISMY NEGENOTOXICKÝCH PROCESŮ

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



chemická aktivace proteinkináz C a ERK1/2:

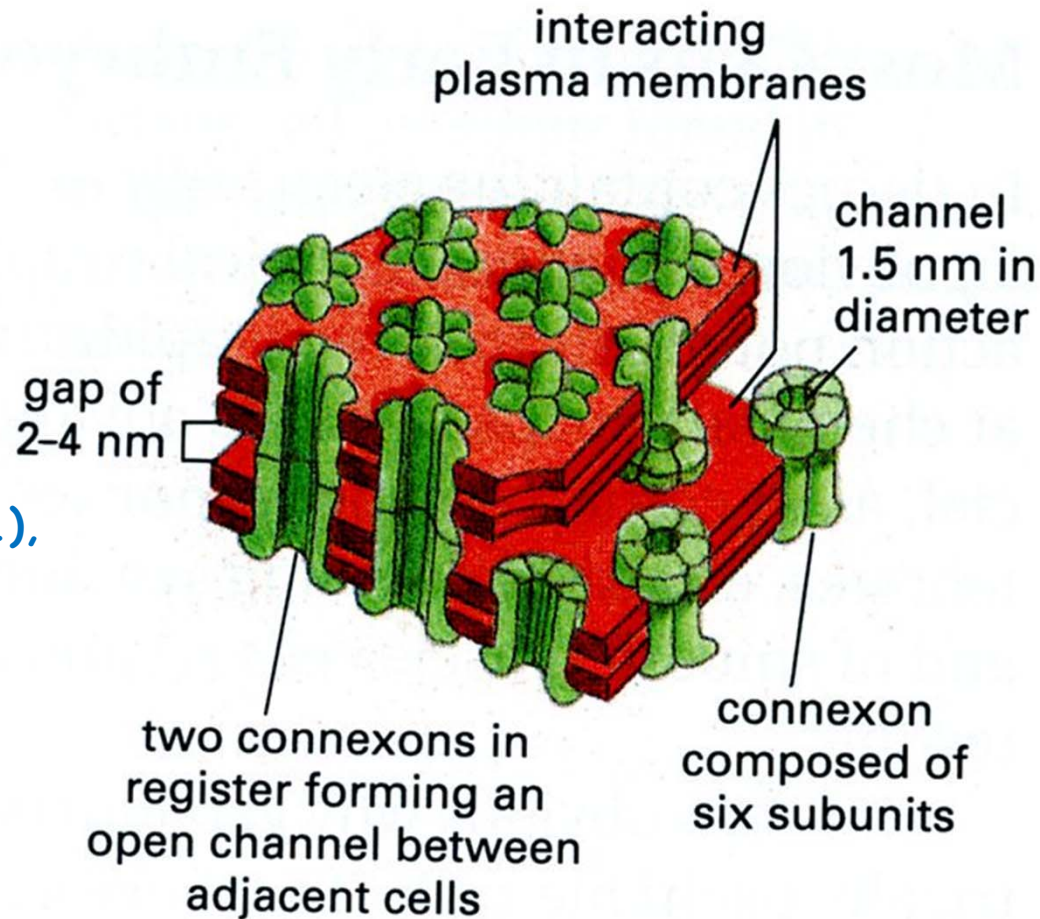
- hyperfosforylace Cx, inhibice GJIC
- mitogenní efekty



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

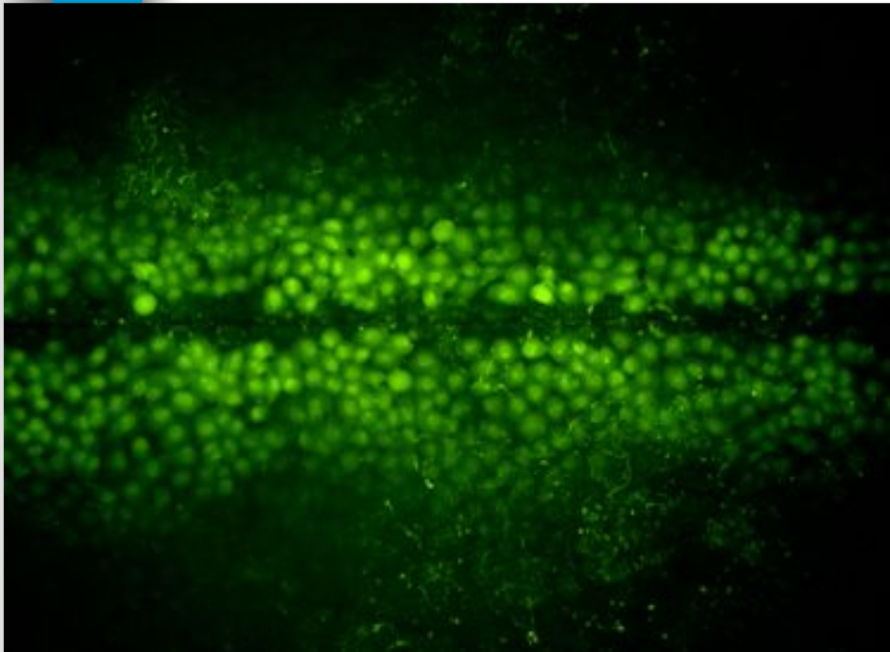
INTERCELULÁRNÍ SPOJENÍ GJIC ("gap junction intercellular communication")

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

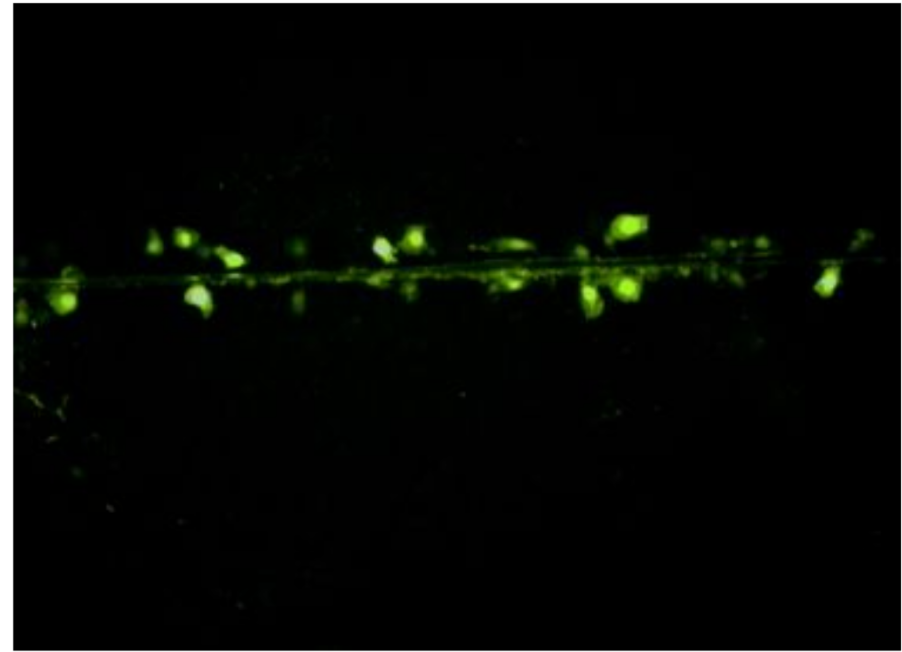


INHIBICE GJIC

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

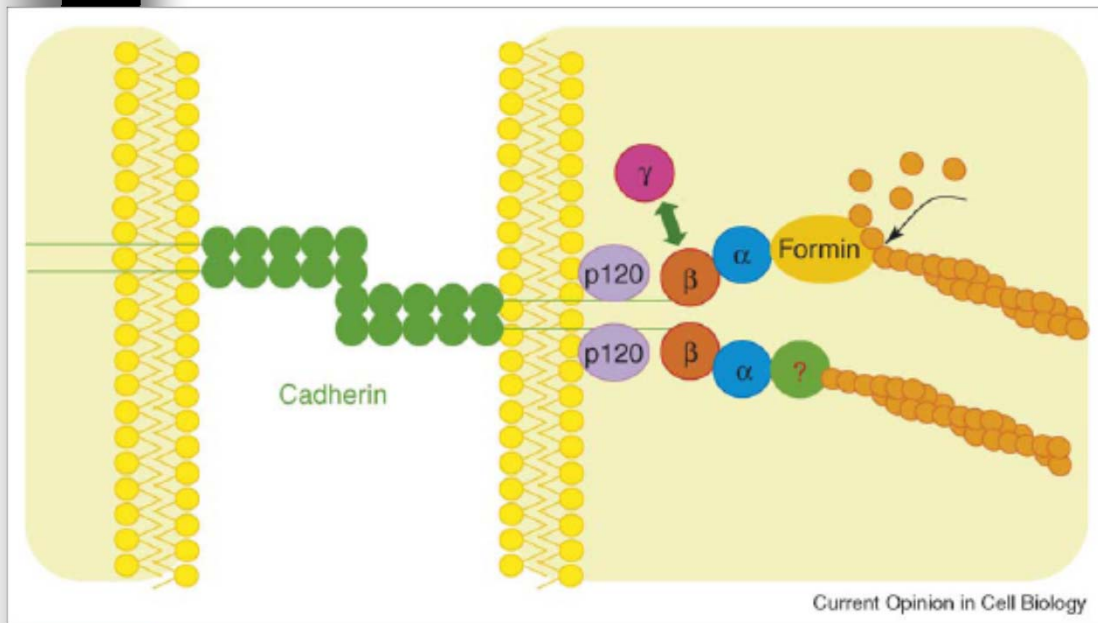


kontrola

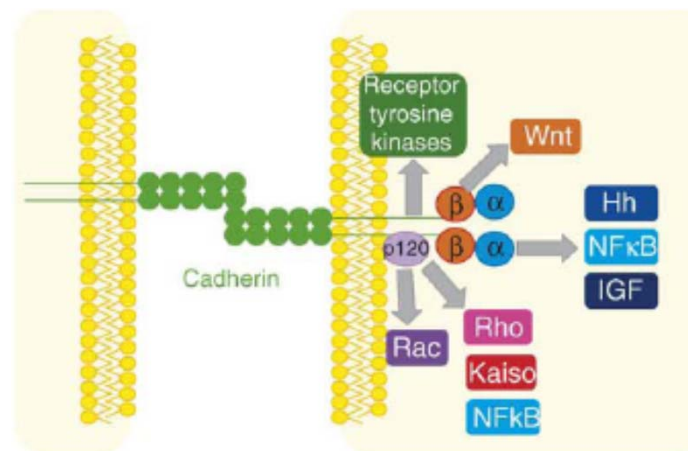


expozice TPA (aktivace PKC a ERK1/2,
hyperfosforylace konexinu)

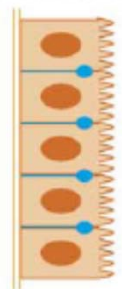
DISRUPCE ADHERENTNÍCH SPOJENÍ (ADHERENS JUNCTIONS)



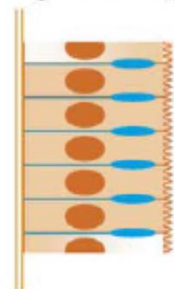
signálování beta- kateninu -
vývoj tkání, nádor. promoce



Low cell density

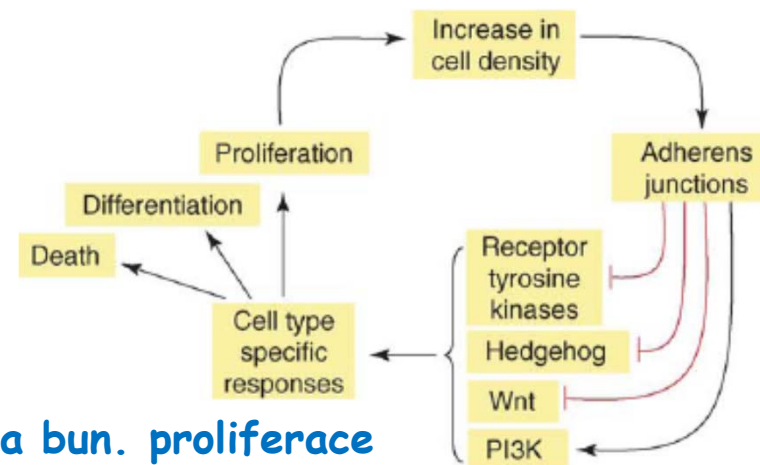


High cell density



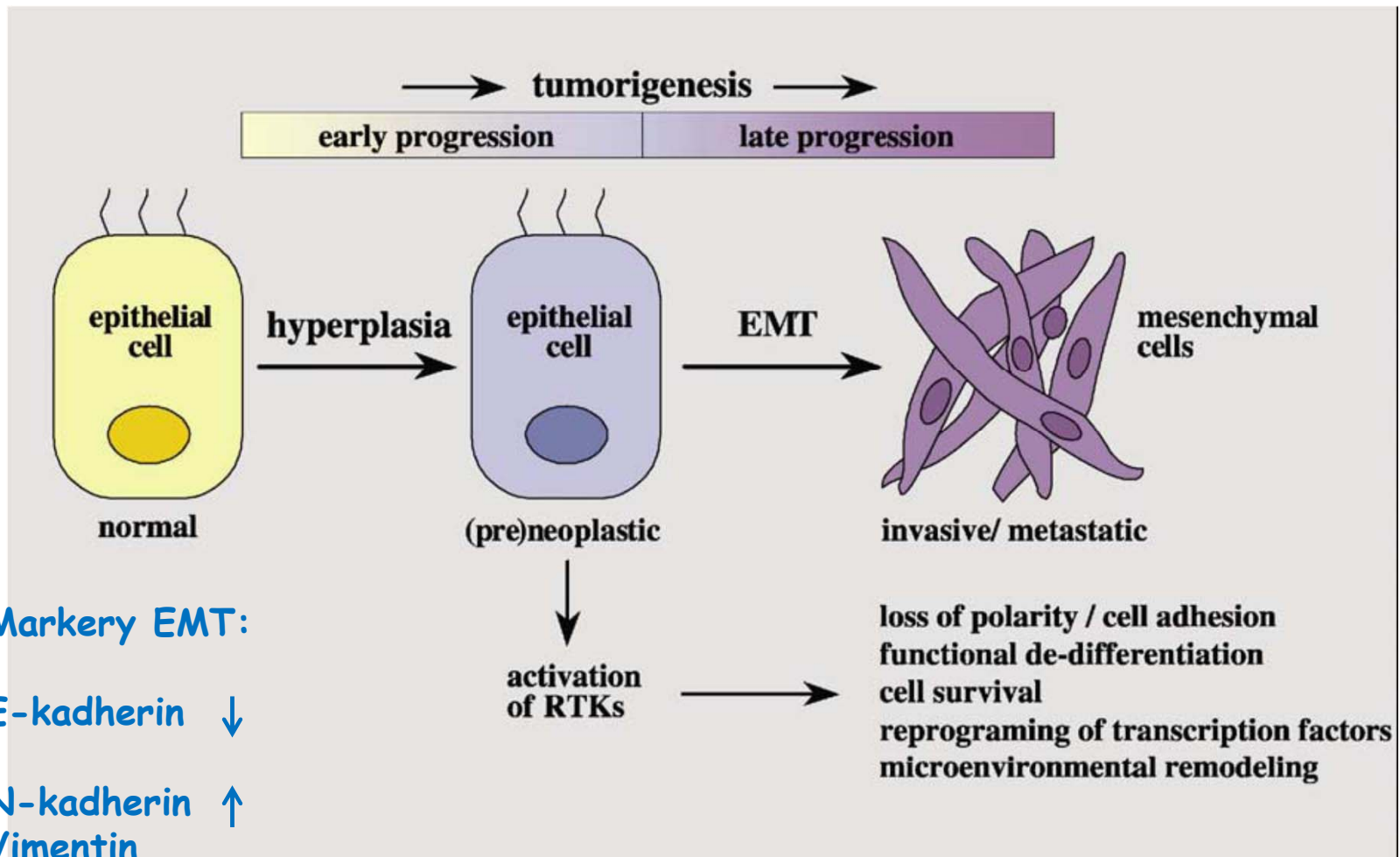
Increase in per cell area
occupied by AJs

biosensor density



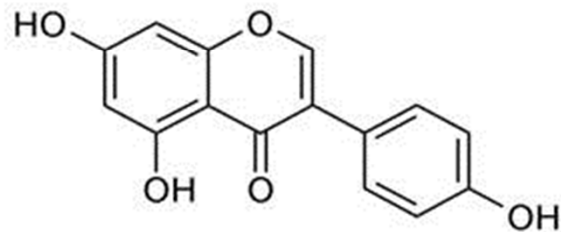
kontrola bun. proliferace

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

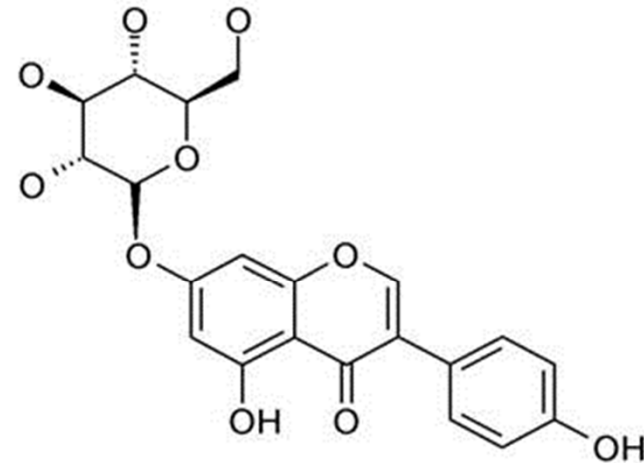


CHEMOPROTEKTIVNÍ LÁTKY

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

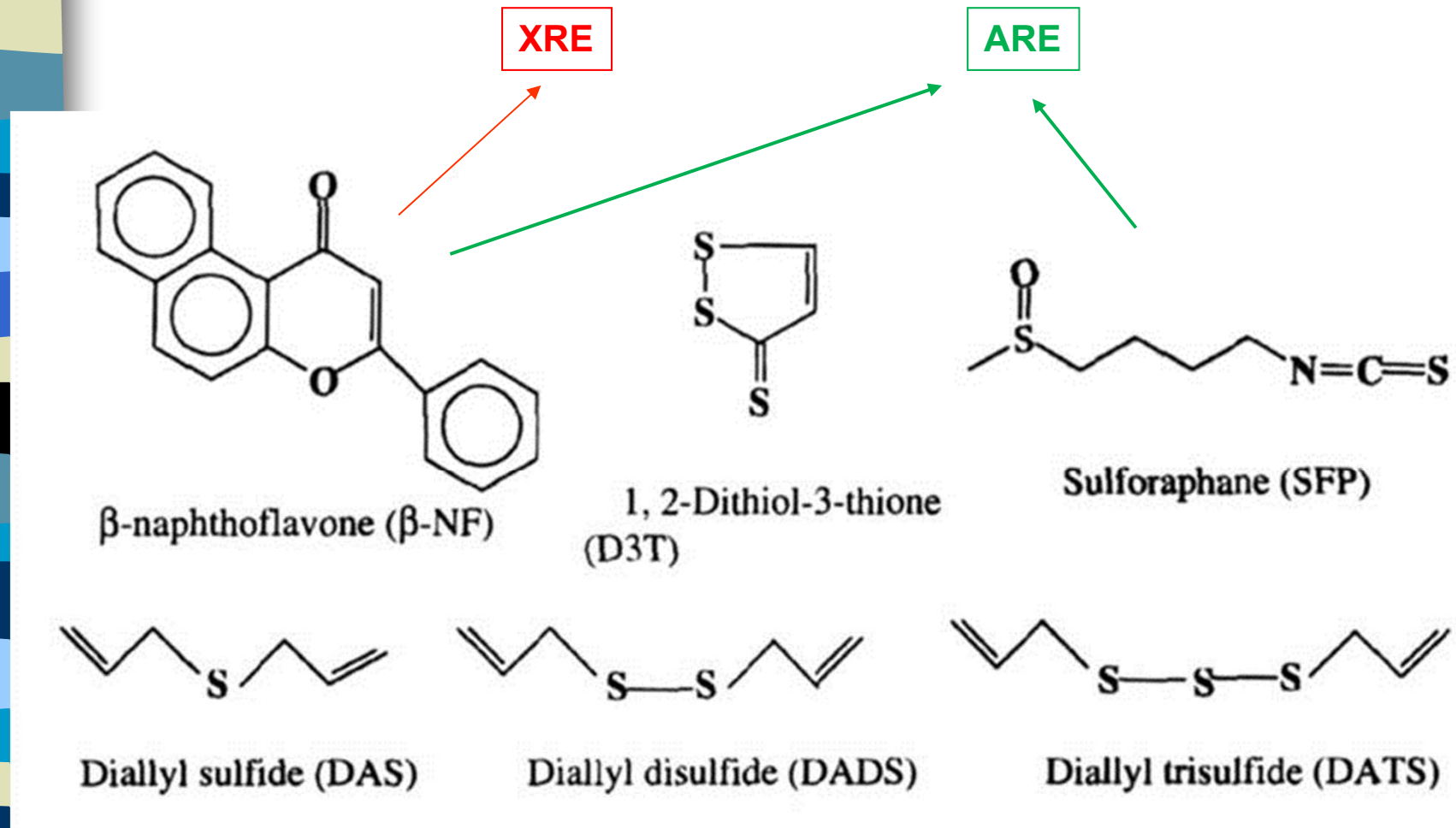


Genistein



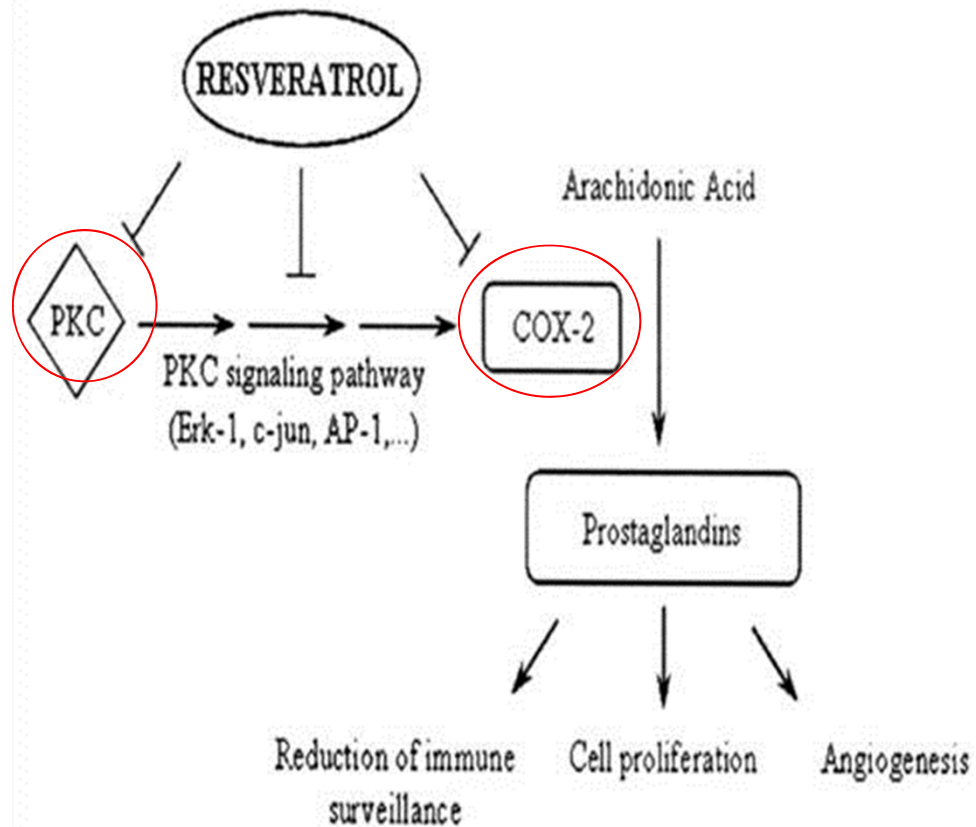
Genistin

INDUKTORY / INHIBITORY 1. A 2. FÁZE BIOTRANSFORMACE



MECHANISMY PROTEKTIVNÍCH VLASTNOSTÍ RESVERATROLU

protizánětlivá aktivita RES



aktivační vlastnosti RES

