

Hlavní mechanismy toxicity cizorodých látek

J. Vondráček

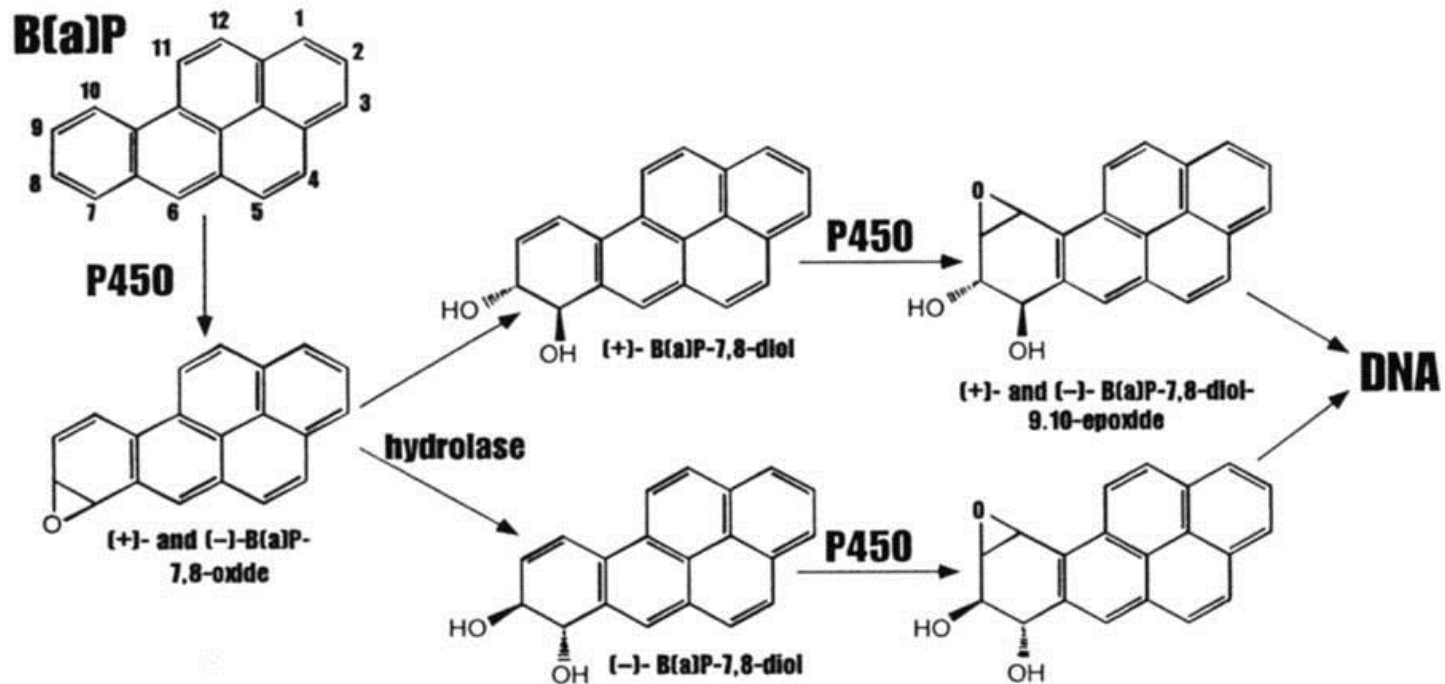
Hlavní mechanismy toxicity xenobiotik

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

Genotoxicita

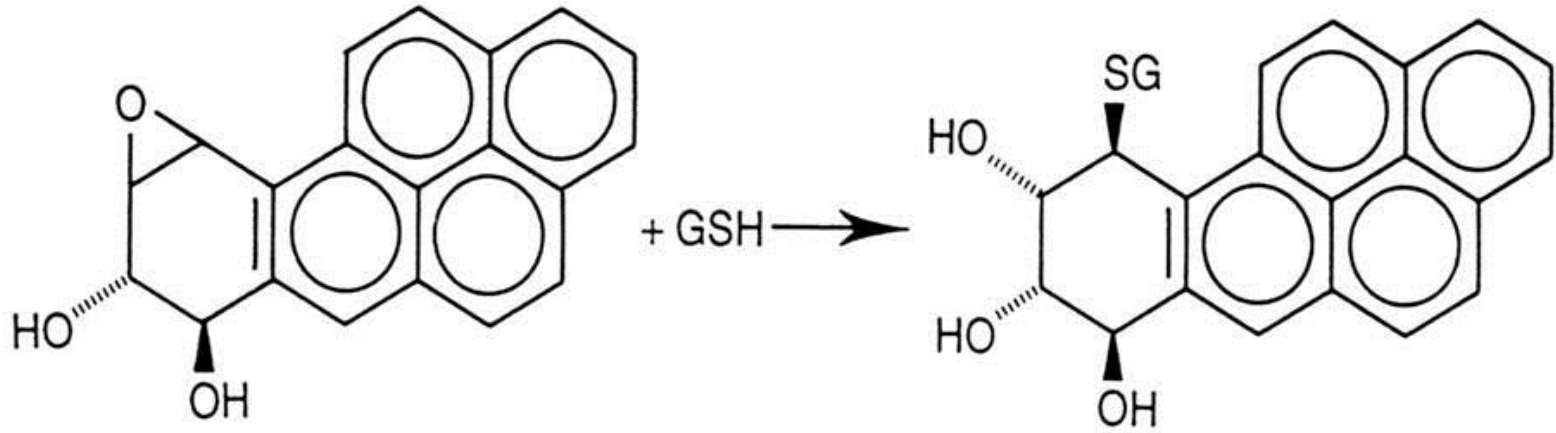
- ▶ **Genotoxicita** = potenciálně škodlivé účinky chemických látek nebo záření na genetický materiál; důsledkem nemusí být smrt buňky, ale trvalé genetické změny (mutace, chromosomální aberace aj.).
- ▶ Příklady hlavních genotoxinů: PAU (benzo[a]pyren), alkylované PAU, aromatické a heterocyklické aminy, nitro- a nitrososloučeniny, halogen. deriváty uhlovodíků (CCl₄), aldehydy a epoxidy, azobarviva a akridinová barviva, silná oxidační činidla, některé těžké a transnitní kovy (Cd, Cr) aj.
- ▶ Typy genotox. poškození: **bodové mutace** (ox. deaminací cytosinu vzniká uracyl, analoga bazí, alkylace bazí); **chromosomální aberace** (delece, inserce, duplikace, inverze úseku chromosomu, translokace úseku chromosomu na nehomologní chromosom); klastogeny = způsobují zlomy chromosomů (UV záření, interkalační látky); **euploidie** = změna počtu chromosomových sad, např. tetraploidie, **aneuploidie** = změna počtu jednotlivých chromosomů.
- ▶ Teratogeneze – vznik poškození plodu (vrozené vývojové vady apod.); způsobují to teratogeny (některá org. rozpouštědla, viry aj.; mutagenní látky mohou působit jako teratogeny).

1) Genotoxicita – metabolická aktivace polycyklických aromatických uhlovodíků



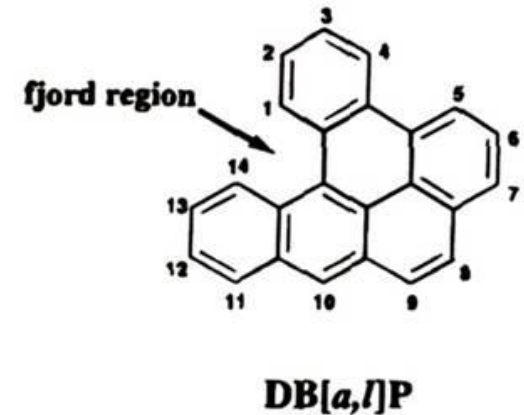
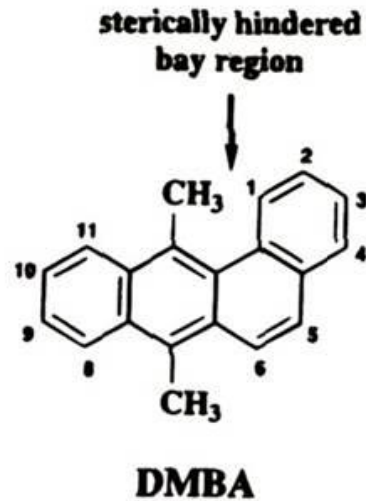
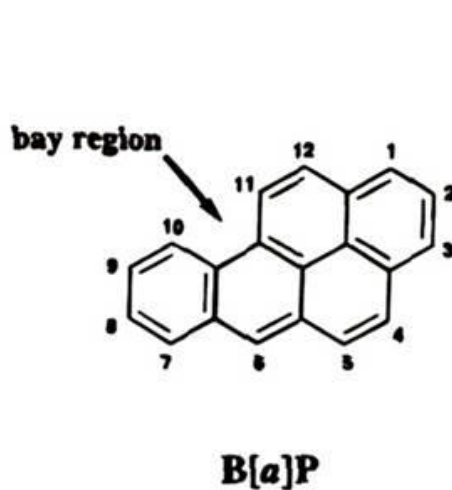
Detoxikace polycyklických aromatických uhlovodíků:

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



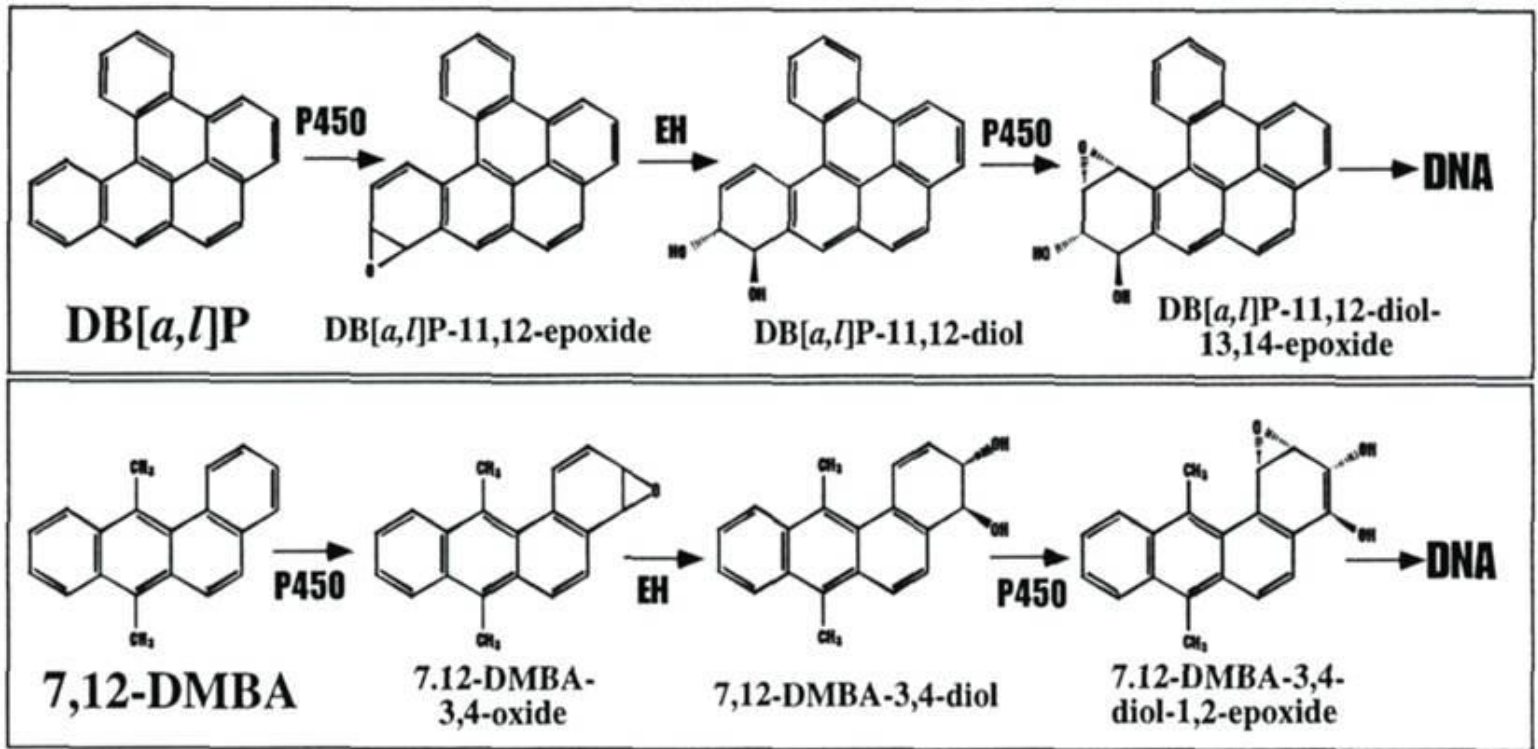
Glutathione-S-transferase

Genotoxicita – metabolická aktivace polycyklických aromatických uhlovodíků



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

Genotoxicita – metabolická aktivace polycyklických aromatických uhlovodíků



Akrylamid: detoxikace vs. tvorba aduktů

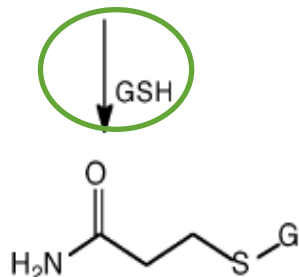
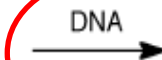
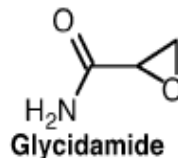
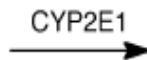
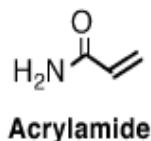
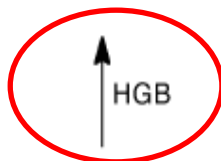
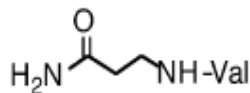
detoxikace

metabolická aktivace

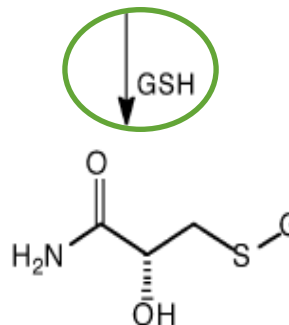
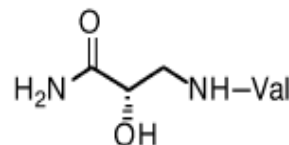
-tvorba aduktů s proteiny

-tvorba aduktů s DNA

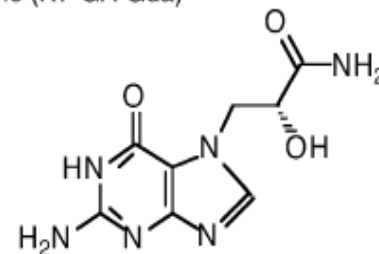
N-(2-carbamoyl-ethyl)-valine (AAVal)



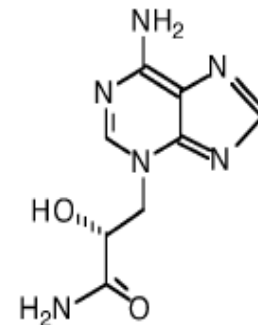
N-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-valine (GAVal)



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



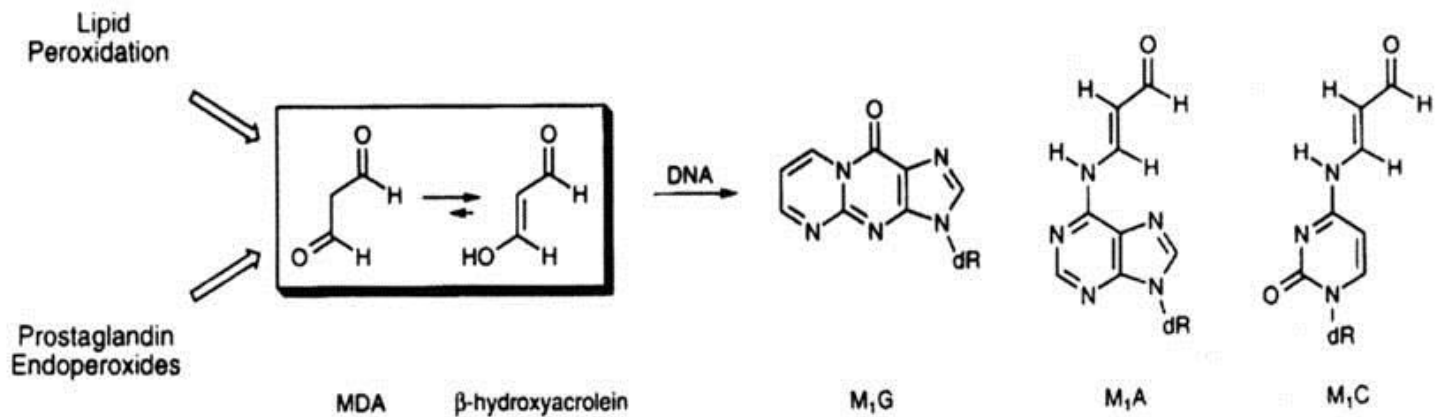
OR



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

Malondialdehyd

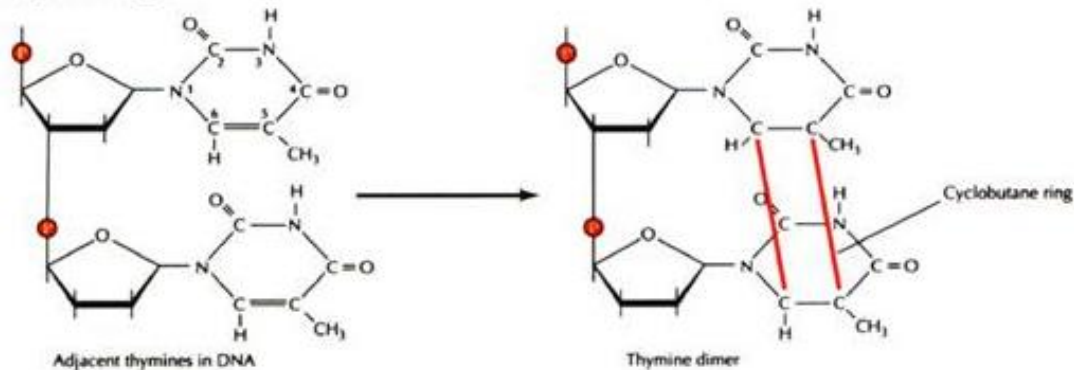
- Typický produkt peroxidace lipidů tvoří adukty s DNA



2) Hlavní typy poškození DNA

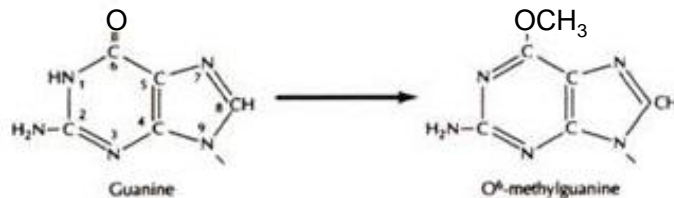
UV záření:
dimerizace

(A) Exposure to UV light



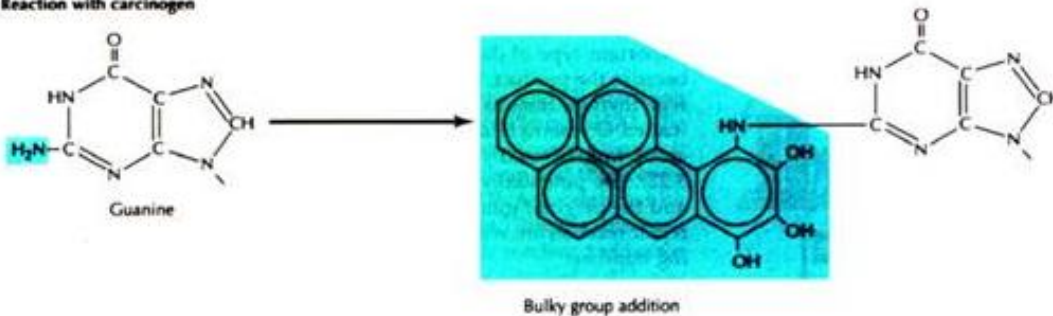
Alkylace (methylace)
= O \longrightarrow OCH₃

(B) Alkylation



Vznik objemných
aduktů
("bulky adducts")

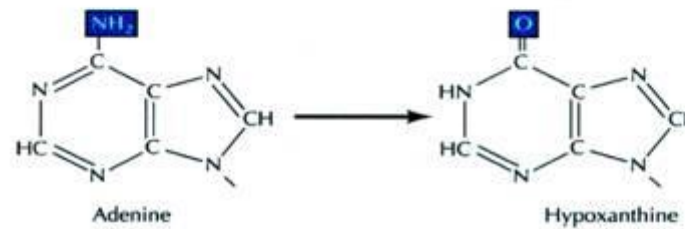
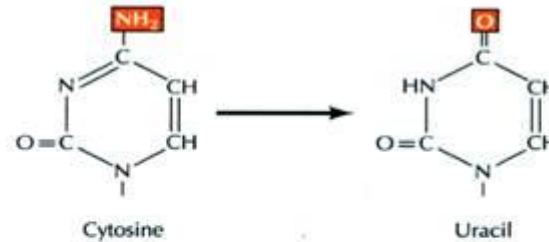
(C) Reaction with carcinogen



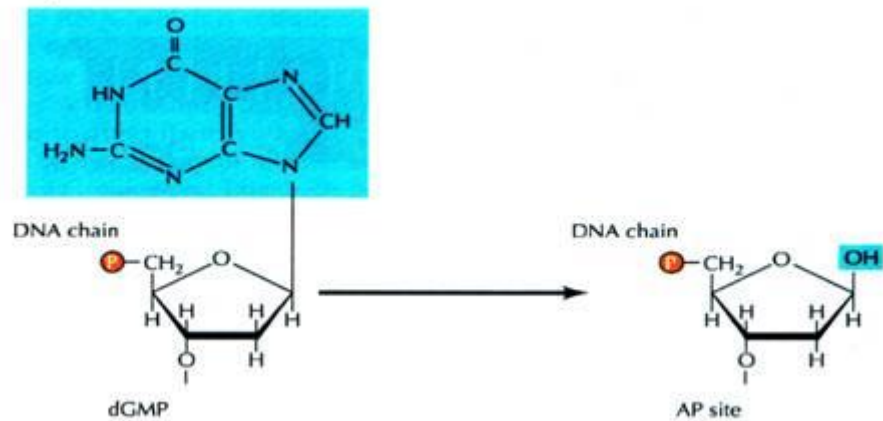
Hlavní typy oxid. poškození DNA (“apurinic sites“)

Oxidativní poškození DNA – deaminace

(A) Deamination

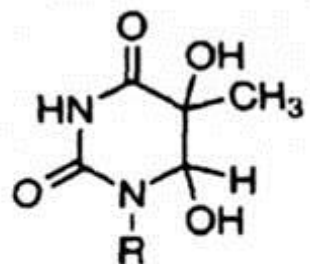


(B) Depurination

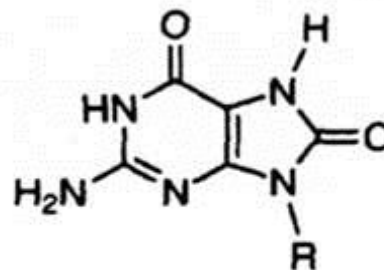


Depurinace (nestabilní modifikované nukleotidy)

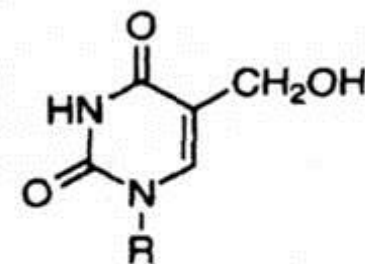
Produkty oxidativního poškození DNA



thymine glycol

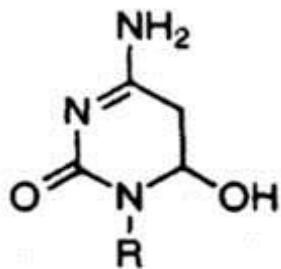


8-oxo-dG

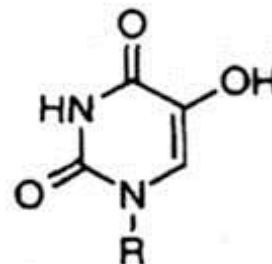


5-hydroxymethyluracil

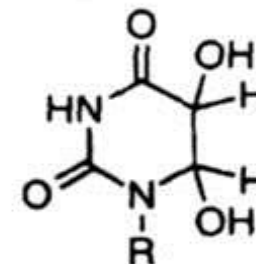
Biomarker
oxidativního
poškození
DNA
(stanovení
HPLC)



6-hydroxy-5,6-dihydrocytosine

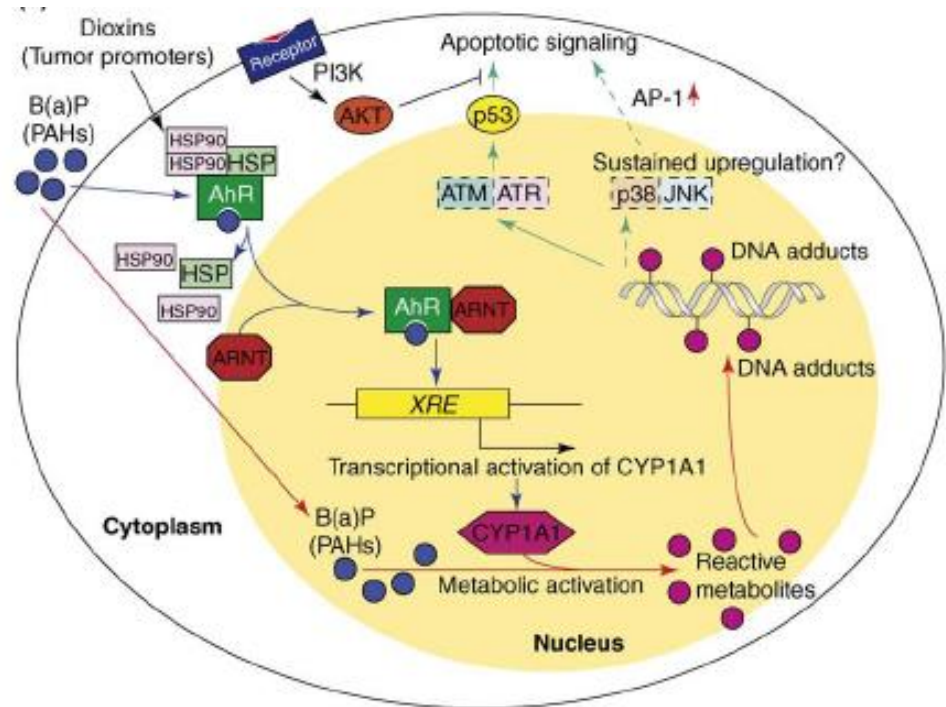
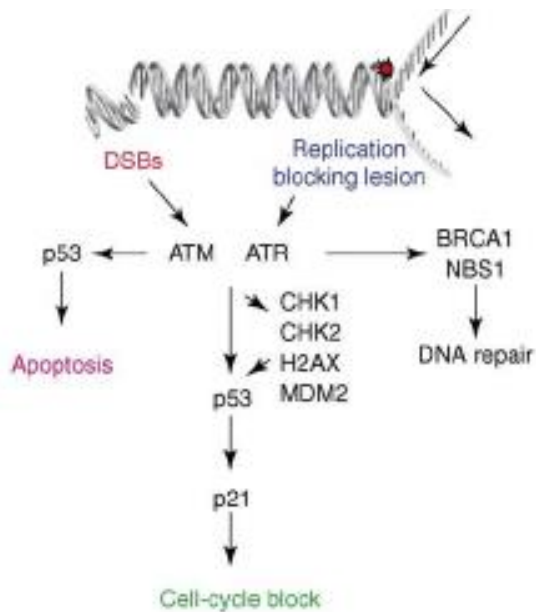


5-hydroxyuracil



uracil glycol

3) Aktivace signálních drah detekujících poškození DNA

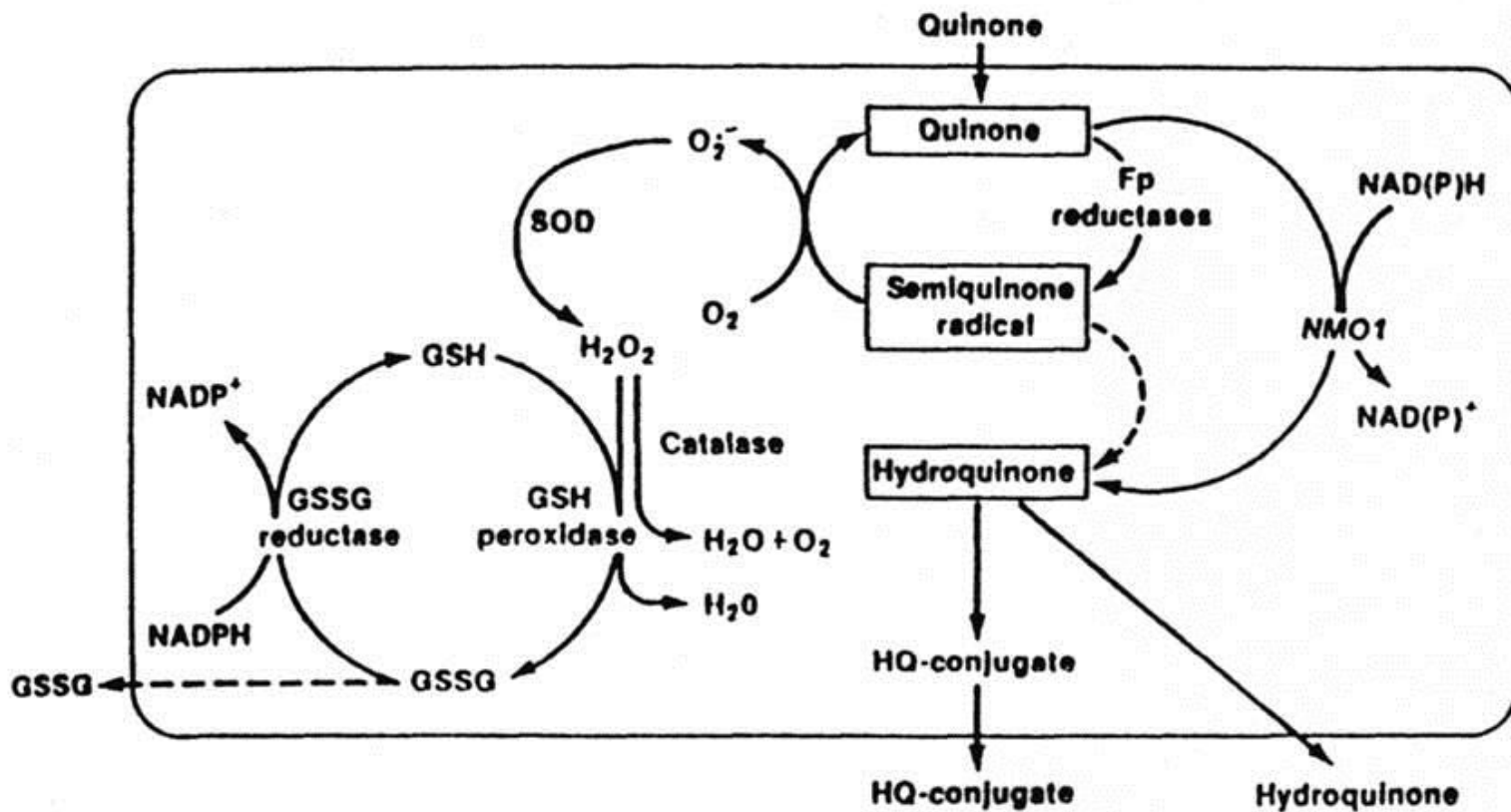


OXIDATIVNÍ STRES

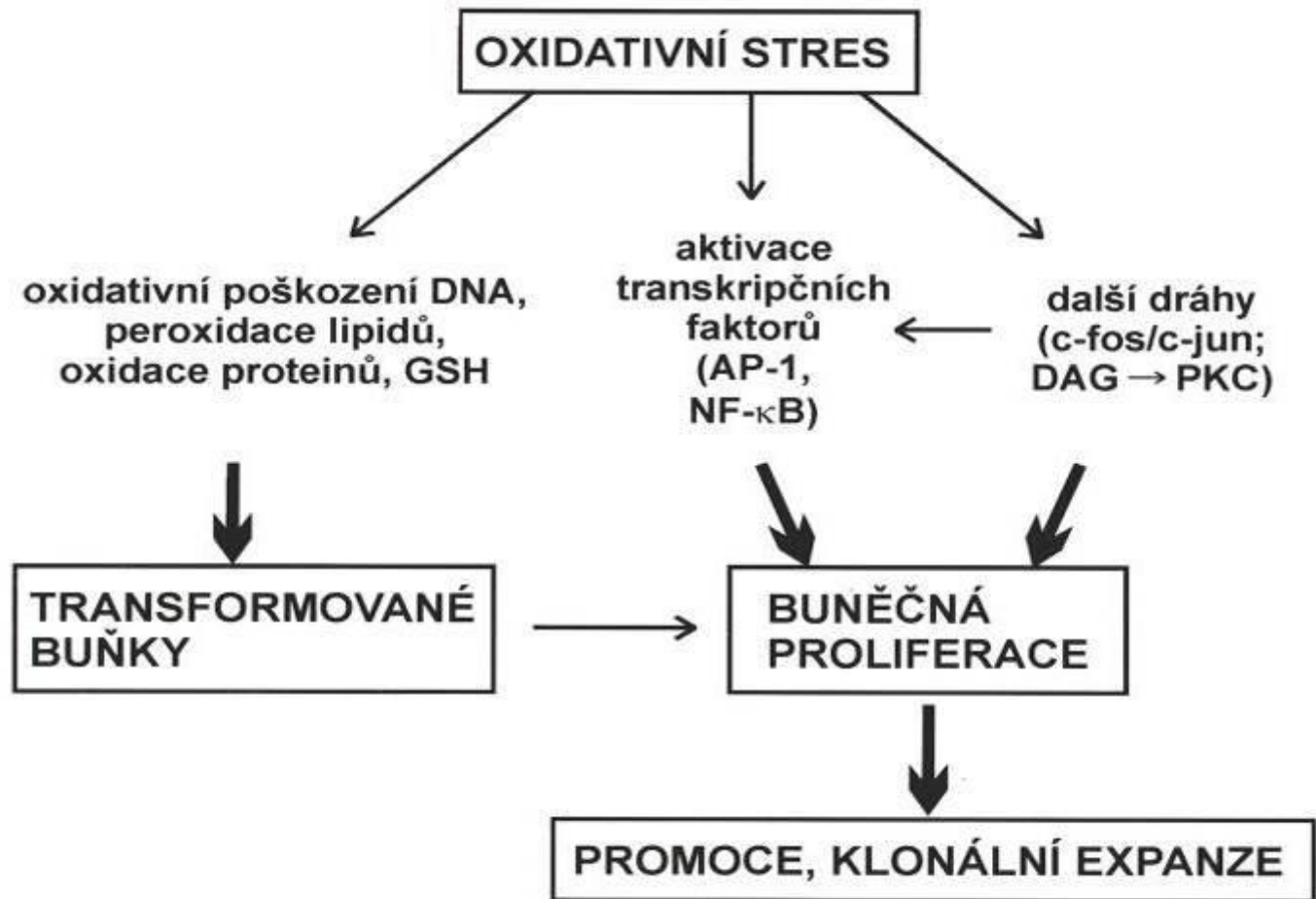
Oxidativní stres

- ▶ **Oxidativní stres** je nerovnováha mezi (zvýšenou) produkcí ROS a oxidovaných metabolitů a limitovanou kapacitou antioxidačních mechanismů.
- ▶ **Hlavní mechanismy vzniku ROS:**
 - chorobné stavy (reumatoidní choroby, záněty...)
 - vedlejší produkty respirace a dalších metabolických procesů (prostaglandin H syntáza, diaminooxidáza, xanthinooxidáza)
 - 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



Důsledky oxidativního stresu



(různé role ox. stresu v chemické karcinogenezi)

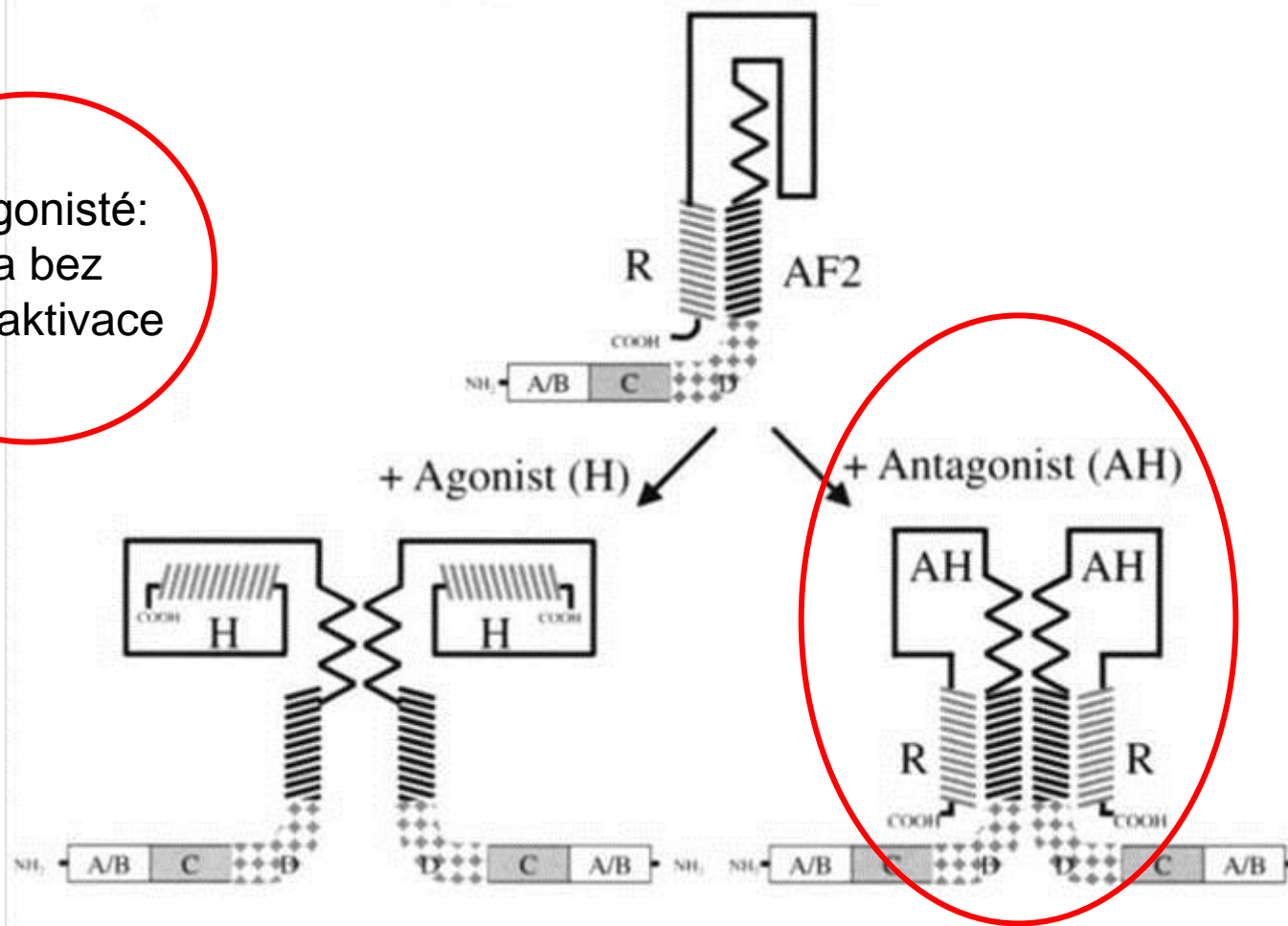
ENDOKRINNÍ DISRUPCE

Mechanismy endokrinní disrupce

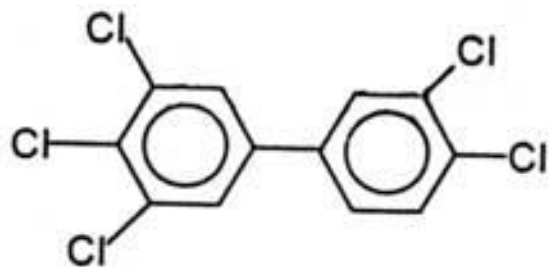
- ▶ biosyntéza steroidních hormonů (např. inhibice CYP19 – aromatázy snižuje hladinu estrogenů);
- ▶ transport steroidních a thyroïdních hormonů (kompetice vazby hormonů na transportní bílkoviny snižuje hladinu hormonů v cílových tkáních);
- ▶ aktivace nebo suprese nukleárních receptorů (AR, ER, TR aj.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

NUKLEÁRNÍ RECEPTORY: vazba antagonistického a agonistického ligandu

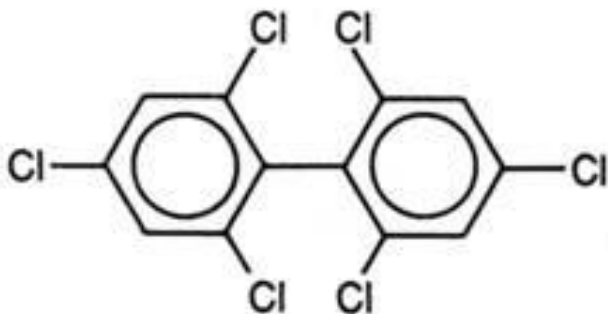
Antagonisté:
vazba bez
transaktivace



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



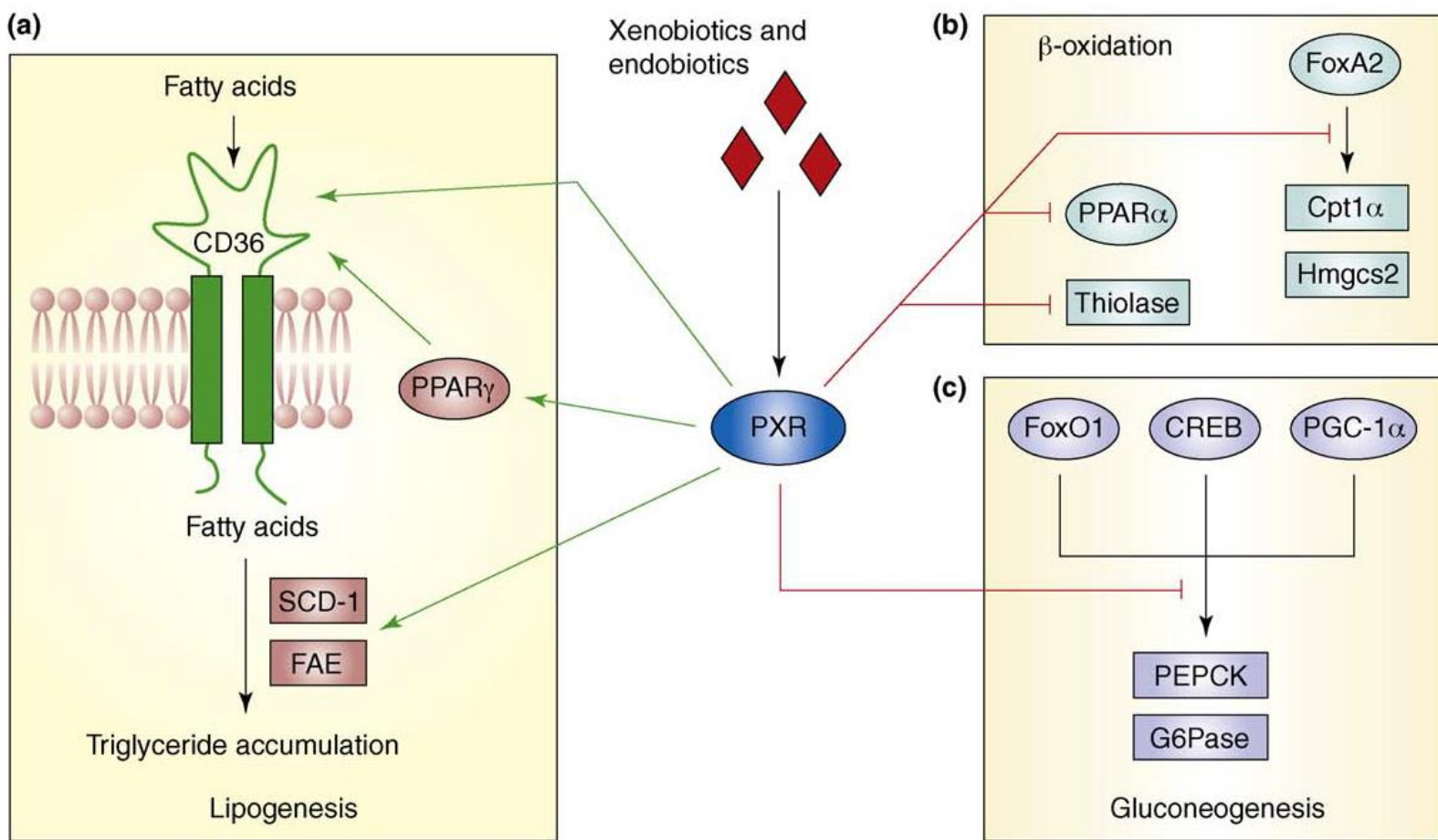
3,4,5,3',4',5'-pentachlorobifenylyl
(PCB)



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

- **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
- **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)

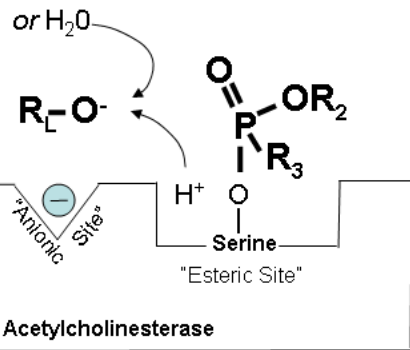
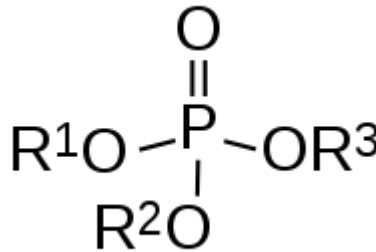
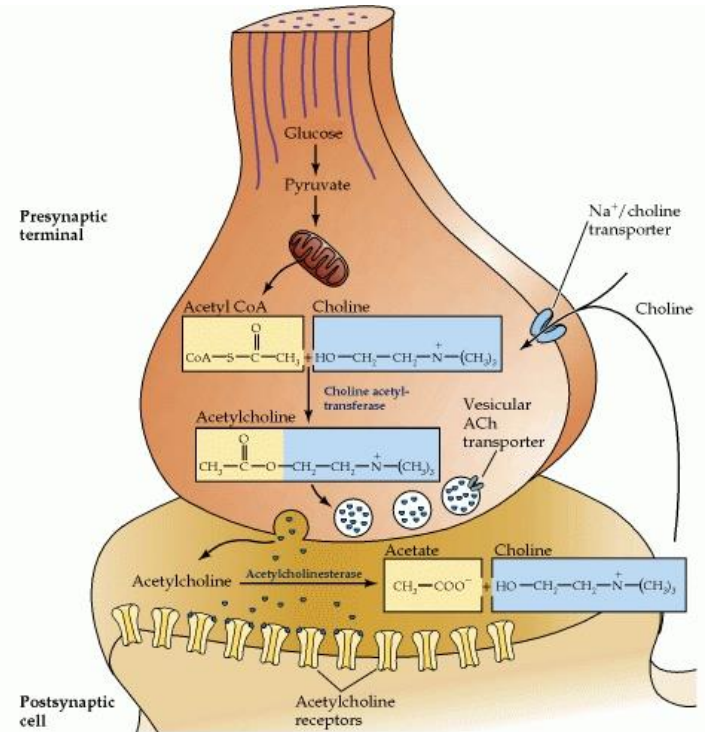
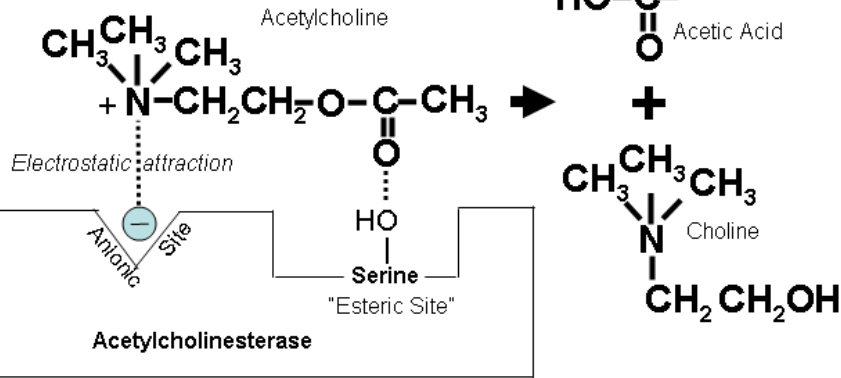
Vliv cizorodých látek na energetický metabolismus (metabolismus cukrů a lipidů)



Neurotoxicita

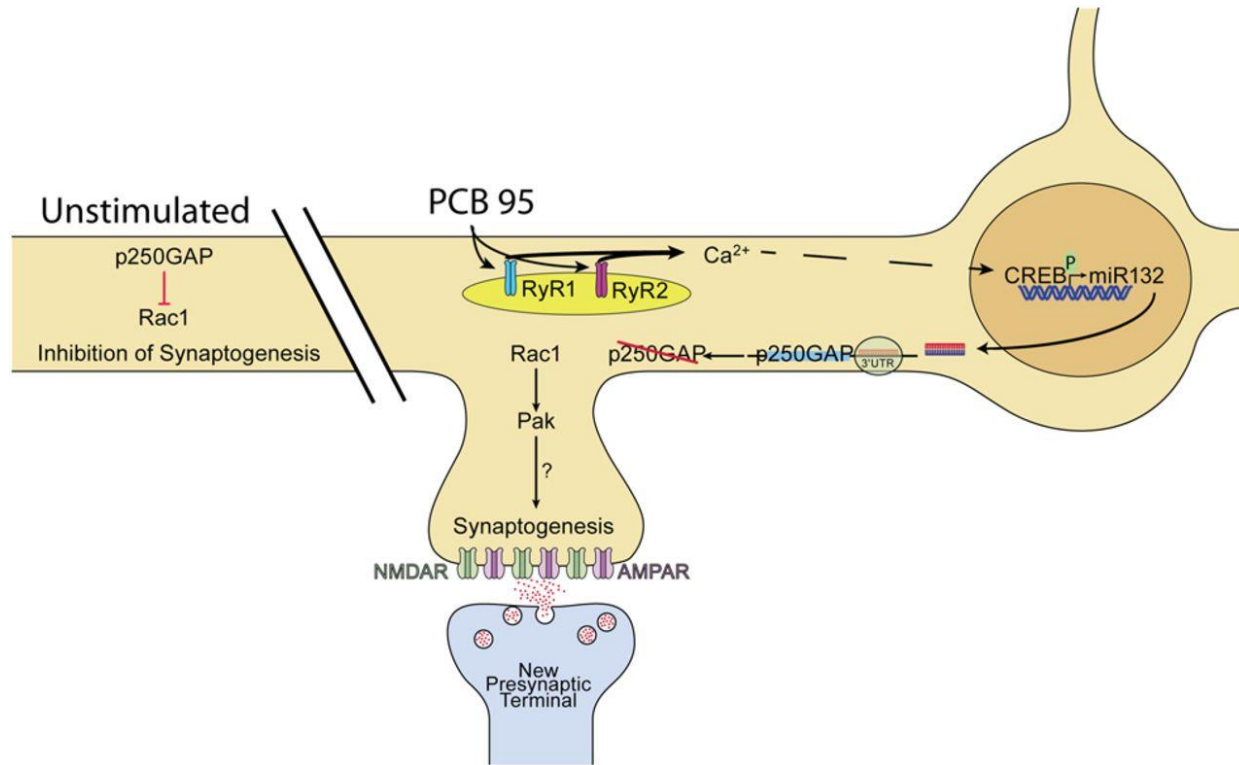
- ▶ Cytotoxicita xenobiotik studovaná v nervových buňkách
- ▶ Inhibice acetylcholinesteráz (např. karbamáty, organofosfáty, ..)
- ▶ Modulace uvolňování dopaminu; efekty na další signalizaci pomocí neurotransmiterů (efekty na cholinergní receptory apod.)
- ▶ Interakce s ryanodinovým receptorem (RyR) – deregulace Ca^{2+} koncentrací = modulace Ca^{2+} -dependentní enzymů
- ▶ Poruchy diferenciací a růstu nervové tkáně (inhibice GJIC, další interakce, např. s TR); komplexněji lze sledovat efekty xenobiotik jako developmentální neurotoxicitu v modelech in vitro;

Neurotoxicita – inhibice AChE



Neuroscience. 2nd edition.
 Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors.
 Sunderland (MA): [Sinauer Associates](http://www.sinauer.com); 2001.

NEUROTOXICITA: interakce s RyR a modulace cytosolového Ca^{2+}



PCB 95 exposure sensitizes RyR1 and RyR2 to increase release of internal Ca^{2+} stores. Increased cytoplasmic Ca^{2+} triggers phosphorylation of CREB, stimulating CREB-dependent transcription. CREB activation increases transcription of miR132, a transcriptional repressor that suppresses p250GAP translation. The decreased translation of p250GAP effectively releases inhibition on Rac1 activity to increase synaptogenesis.

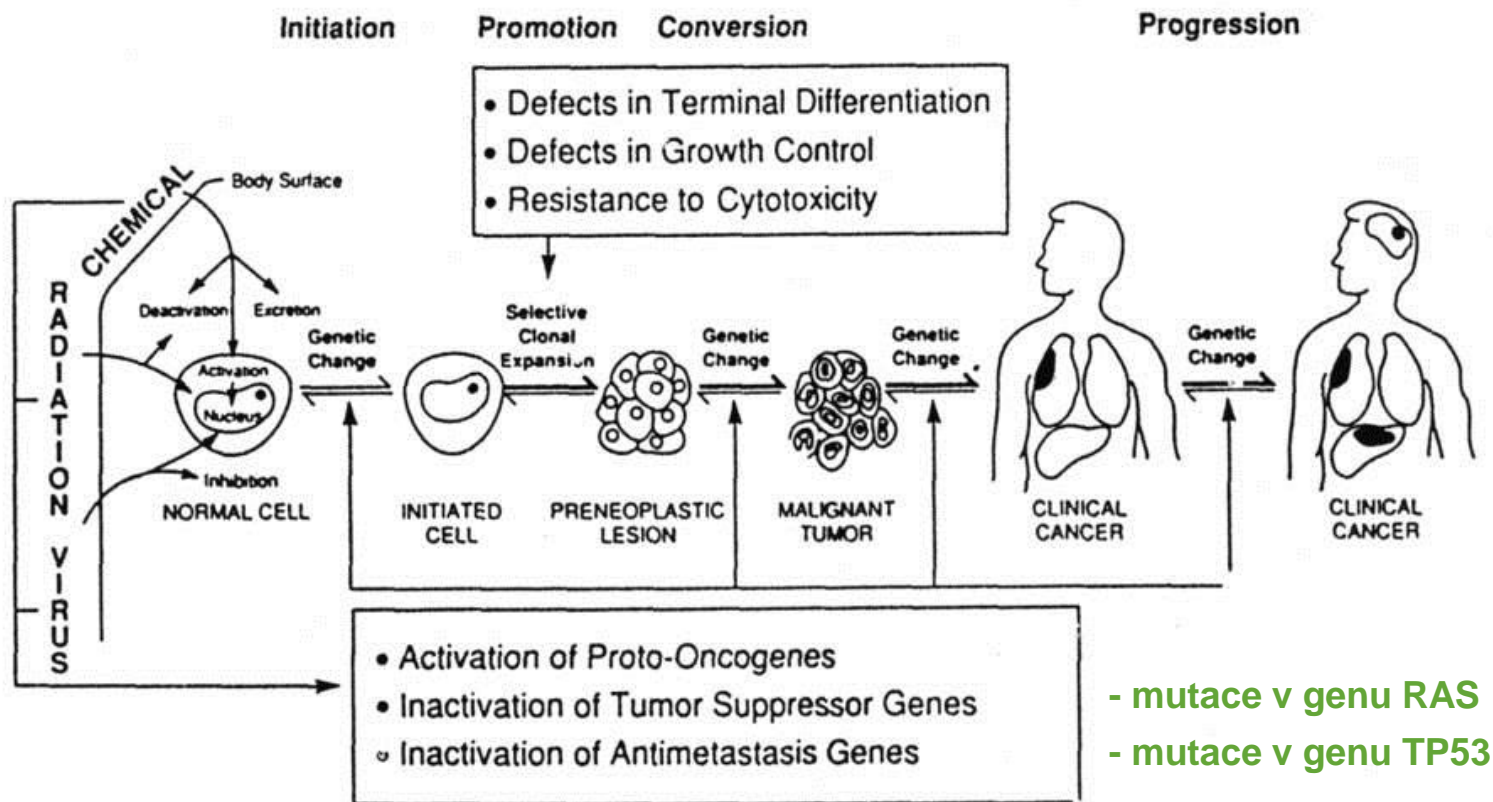
Imunotoxicita

- 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, koplanárními PCB a jinými 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



SUSCEPTIBILITA

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

ENVIRONMENTÁLNÍ EXPOZICE

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

(PRE)KLINICKÉ EFEKTY

- ▶ chromos. aberace, genové mutace, aktivace onkogenů, inaktivace tumor. supresor. genů

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 spojených s karcinogenezí

- ▶ aktivace nebo suprese transkripčních faktorů (AhR, NF-kB,...), „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 nádorové promoce

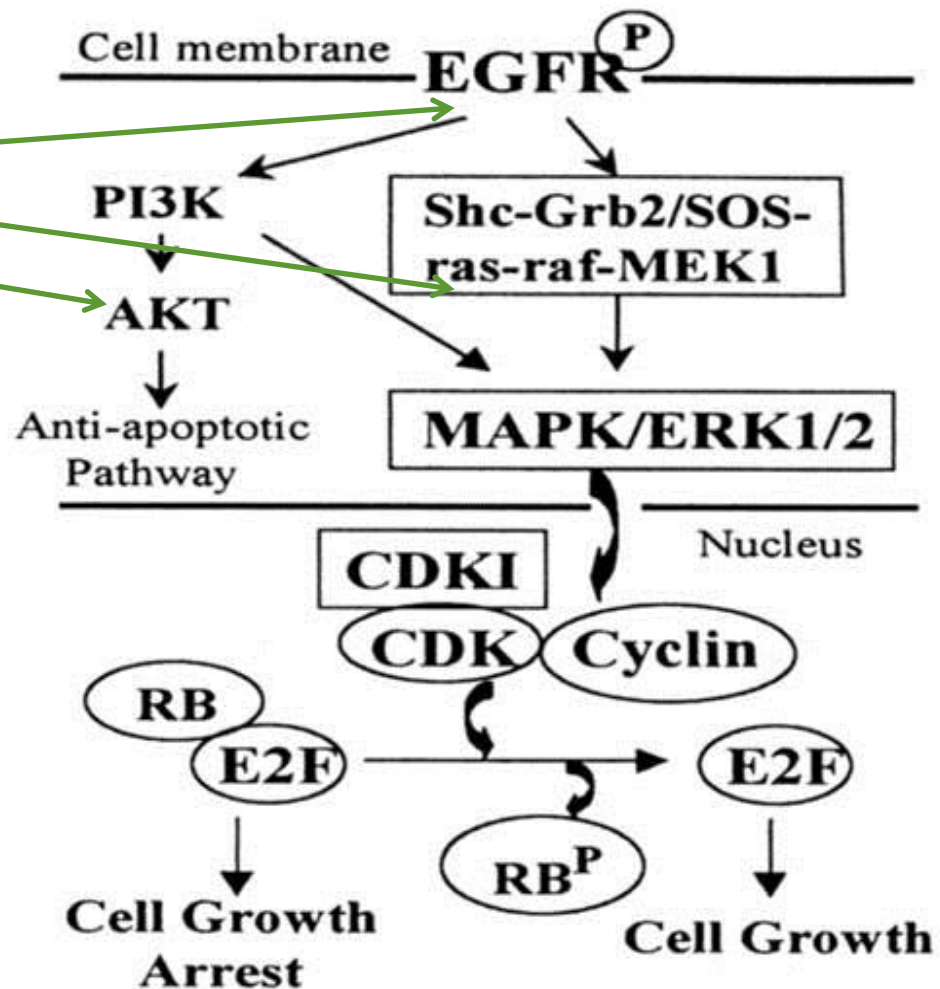
- mitogenní efekt, zvýšení buněčné proliferace, vyvázání z kontaktní inhibice růstu (role onkogenů a inaktivace tumorových supresorů);
 - interference s transdukčními signály, které kontrolují normální buněčný růst a diferenciaci (aktivace EGFR/ErbB2-ras-ERK, aktivace protein kinázy C, produkce ROS,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



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

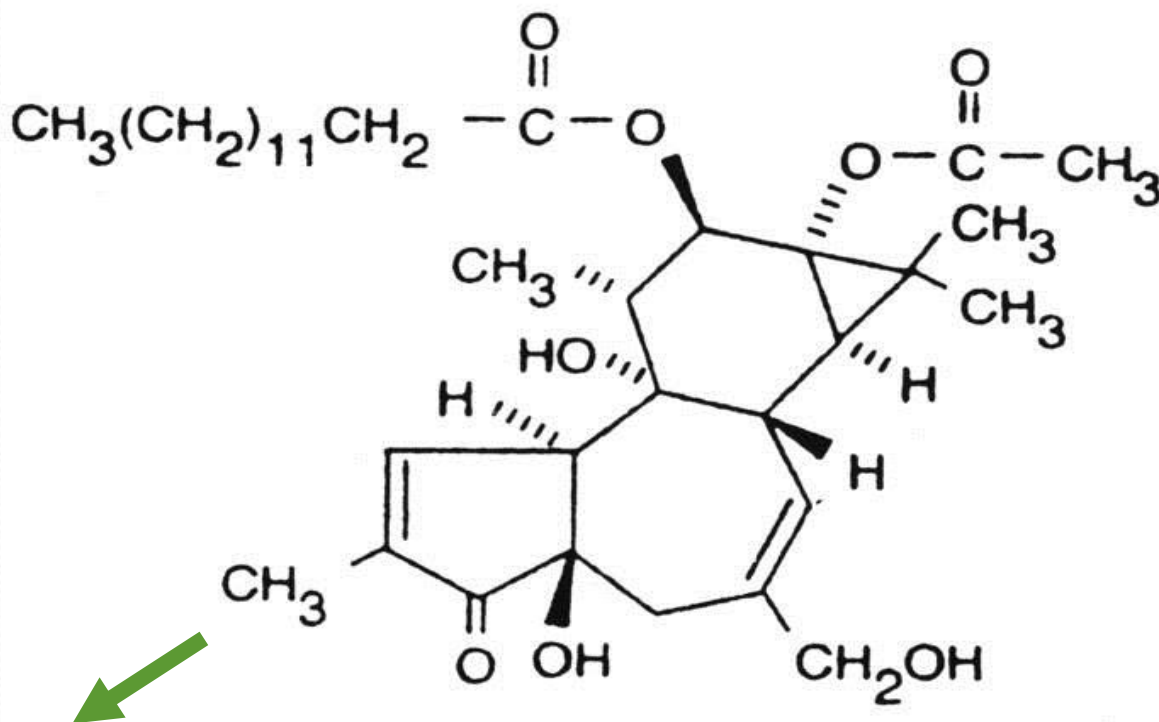
Aktivace buň. proliferace

velmi časté
mutace =
chronická
aktivace
proliferčních
drah



Mechanismy negenotoxických procesů

- ▶ Forbol-myristátacetát = PMA, TPA (modelový tumorový promotor)

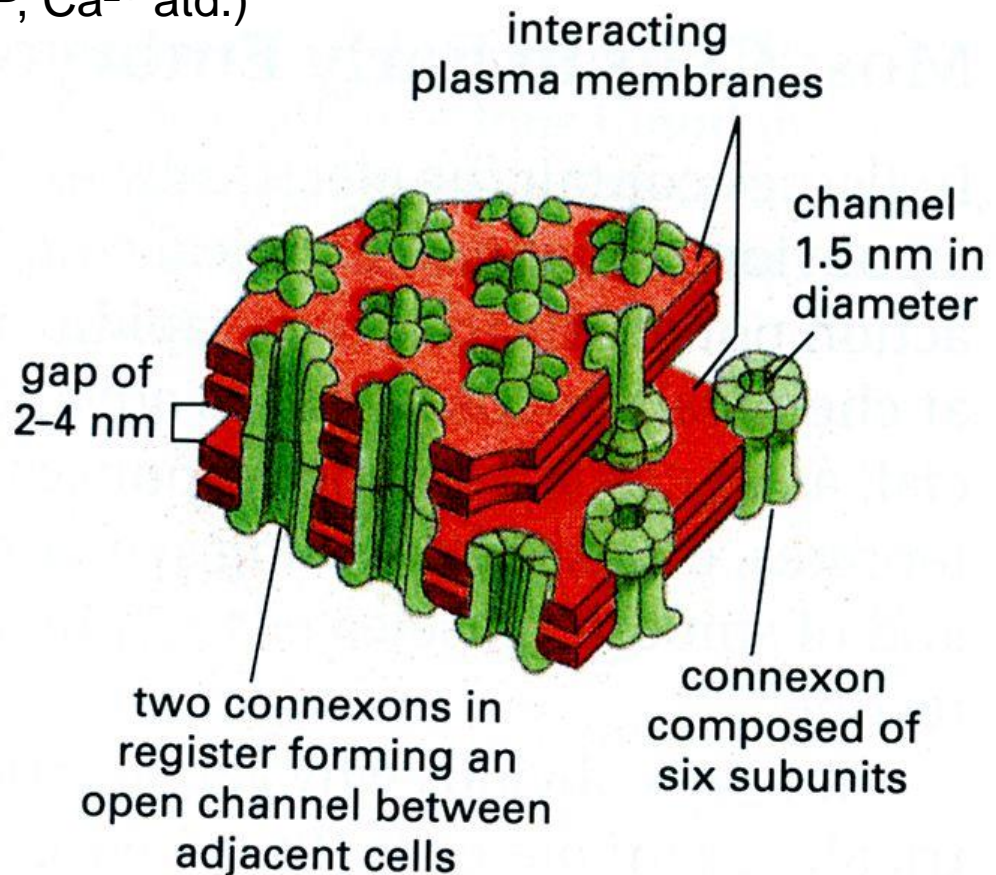


- chemická aktivace proteinkináz C a ERK1/2:
- hyperfosforylace Cx, inhibice GJIC
 - mitogenní efekty

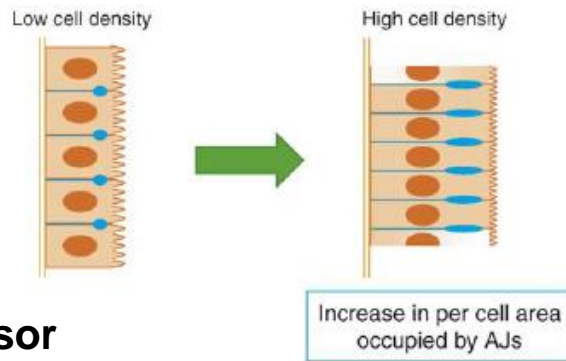
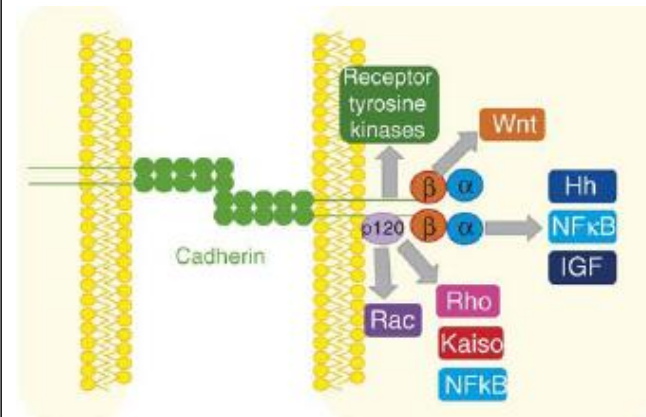
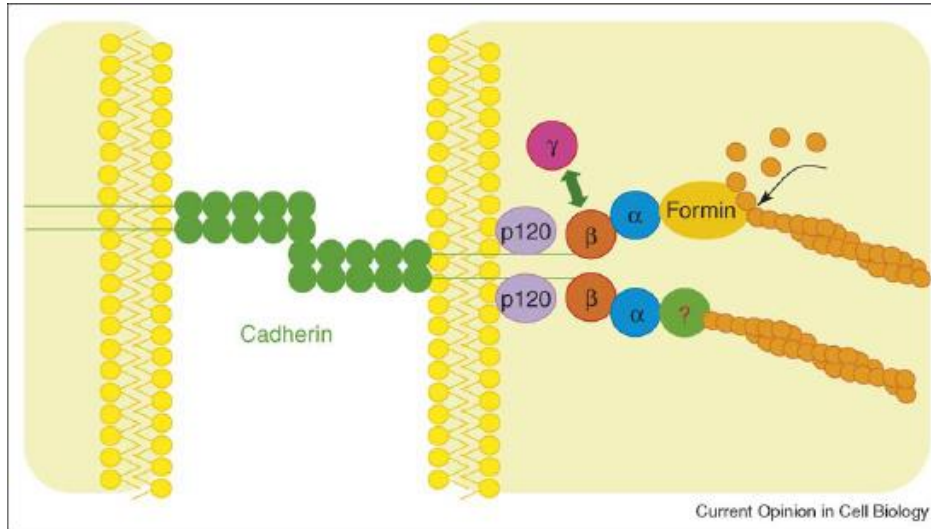
**DISRUPCE MEZIBUNĚČNÝCH SPOJENÍ –
VEDE K NÁDOROVÉ PROMOCI, INVAZITĚ A
TVORBĚ METASTÁZ**

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.)

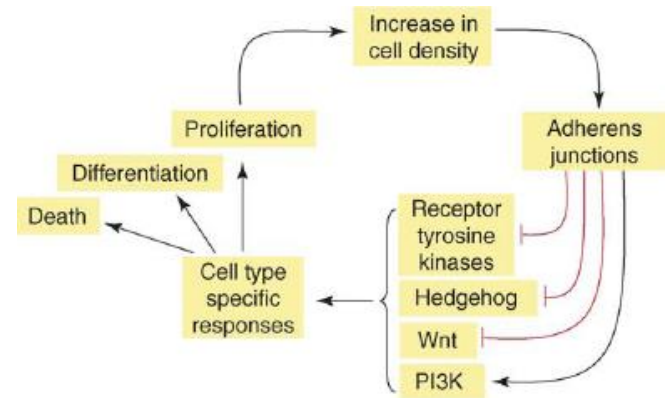


Disrupce adherentních spojů (adherens junctions)

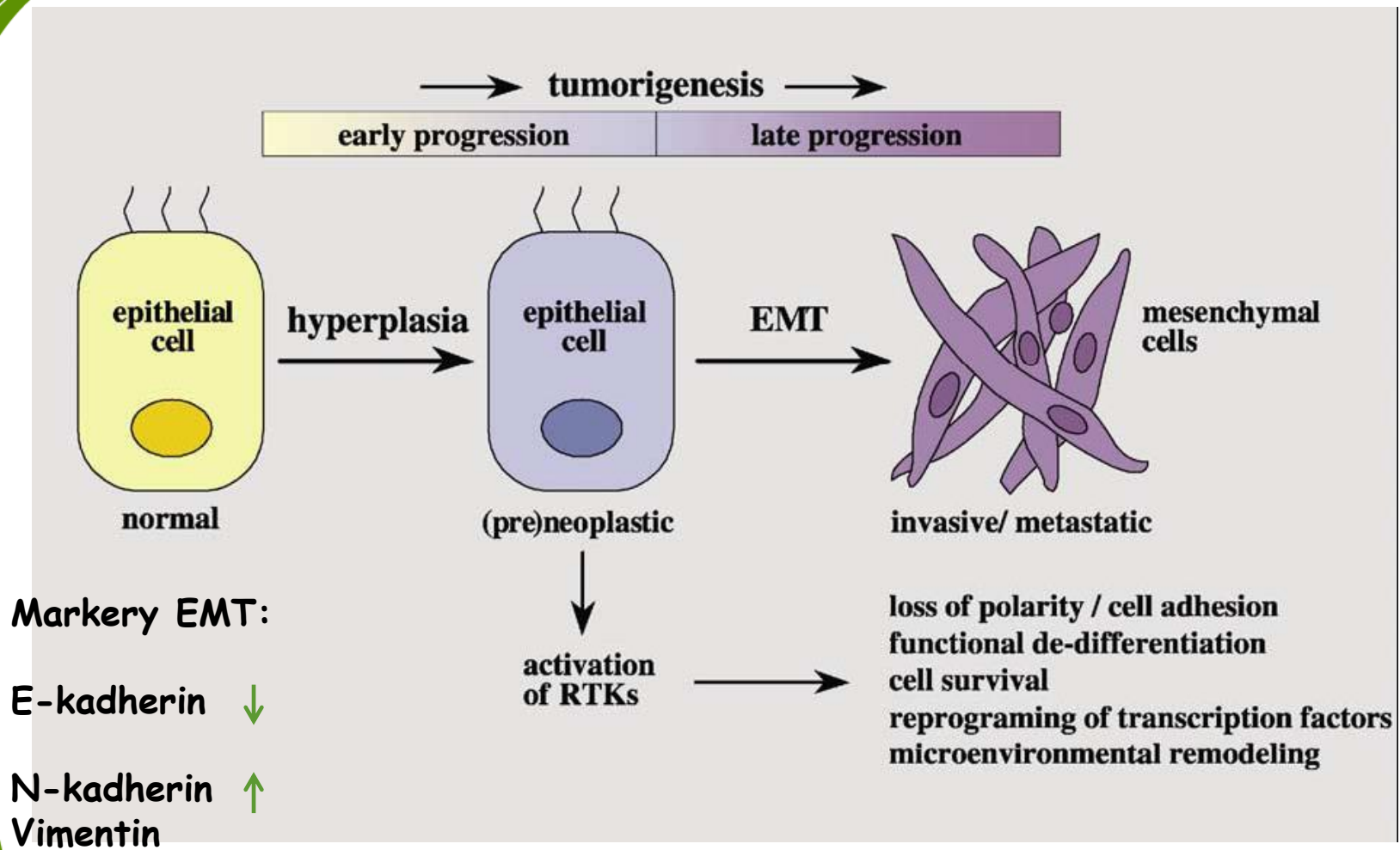


biosensor
density,
kontaktu
buněk,

kontrola bun.
proliferace

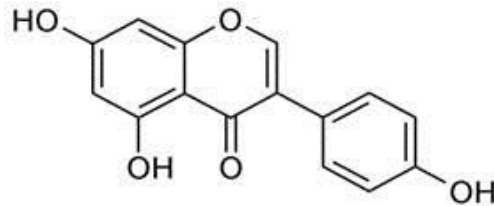


Disrupce adherentních spojů vede ke změně fenotypu buňky

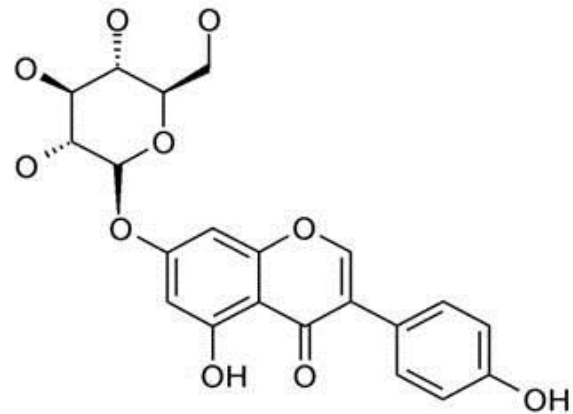


Chemoprotektivní látky

- 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.)

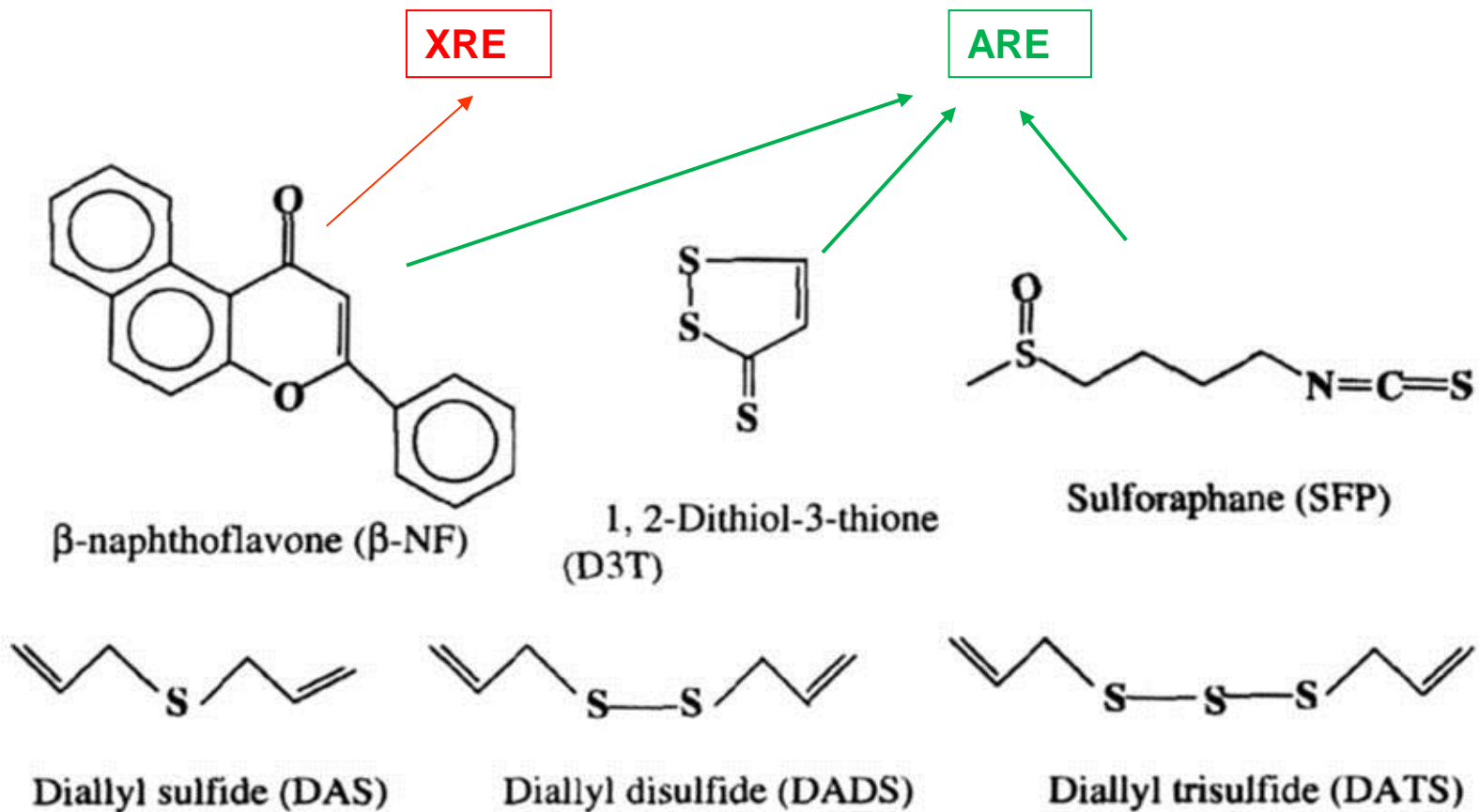


Genistein



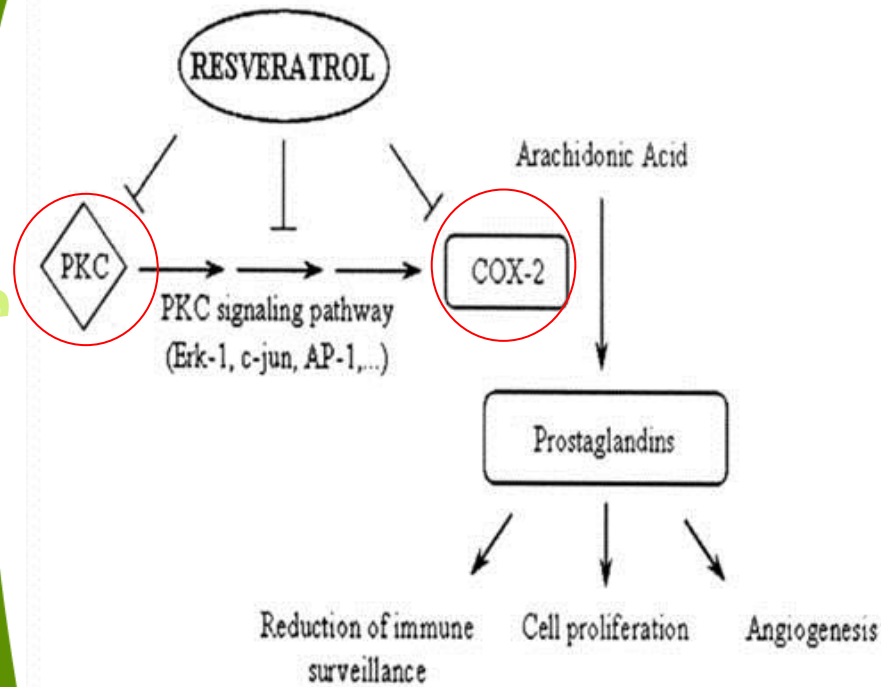
Genistin

Induktory / inhibitory 1. a 2. Fáze biotransformace



Mechanismy protektivních vlastností resveratrolu

protizánětlivá aktivita RES



aktivační vlastnosti RES

