

Mechanismy toxického účinku

Kapitola IV.

Interakce s biomakromolekulami Biomakromolekuly jsou definované chemické sloučeniny nebo jejich komplexy, které jsou stavebními a regulačními prvky každého biologického objektu. Jsou to např. polysacharidy, lipidy, proteiny, nukleové kyseliny a jimi vytvářené komplexy jako např. biologické membrány, enzymy, iontové kanály, receptory, cytoskelet apod. Všechny tyto látky a jimi tvořené struktury jsou samou podstatou každého živého organismu a zajišťují jeho integritu a funkčnost. Proto všechny chemické látky, které mohou s biomakromolekulami vstupovat do interakcí, které mění jejich chemické, fyzikální a biologické vlastnosti, mohou působit na organismus nepříznivě (toxicky). Materiální podstata toxického účinku chemických látek spočívá právě v jejich interakci s různými biomakromolekulami, kterými se mění jejich biologické vlastnosti. To vede k narušení integrity a funkčnosti organismu a může vyústit až v jeho zničení. Takové biomakromolekuly, které jsou cílem pro interakci s některými toxickými látkami, bývají označovány jako **cílové struktury** (target structure). **Interakce s enzymy** Enzymy jsou specifické biologické katalyzátory, které řídí v živých organismech metabolické pochody a podílí se na regulaci a vzájemné koordinaci životně důležitých funkcí. Enzymy jsou ve své podstatě proteiny, které jsou schopny snižovat aktivační energii některých chemických reakcí a tím je urychlit. Děje se tak složitými mechanismy na komplikovaných površích enzymů, které vytváří vhodné prostředí pro zdárný průběh chemických reakcí, které jsou součástí metabolismu. Významným místem každého enzymu je tzv. katalytické centrum, místo kde dochází k navázání chemické látky (**substrátu**) a její přeměně na látku jinou (**produkt**). Dnes je známo několik tisíc enzymů a každý organismus má své specifické enzymy, které se podílí na jeho metabolických procesech. Protože produkty reakcí katalyzovaných enzymy se stávají substrátem pro jiné enzymy, jsou tyto biomakromolekuly velmi často spřaženy do složitých, autonomně pracujících a samovolně se řídících enzymových systémů. Enzymovou aktivitu, tedy rychlost přeměny substrátu na produkt, je možno ovlivňovat (řídít) účinkem látek, tzv. **enzymových efektorů**, které se váží na katalytické centrum enzymu nebo na některá jiná vazebná místa (tzv. allosterická). Efektory mohou enzymovou reakci zpomalit (**enzymové inhibitory**) čili inhibovat, nebo naopak urychlit (**enzymové aktivátory**) čili aktivovat. Vazba efektorů na enzym může být reverzibilní či ireverzibilní a efektorová molekula může či nemusí soutěžit se substrátem o vazebné místo (kompetitivní a nekompetitivní inhibitory). Interakce enzymů s efekty, z nichž převážná část vystupuje ve funkci inhibitorů, lze popsat kinetickými rovnicemi a charakterizovat řadou enzymových konstant. Pro reversibilní inhibitory je nejdůležitější konstantou disociační konstanta komplexu enzym-inhibitor (K_i), jejíž obdobou u ireverzibilních inhibitorů je hodnota I_{50} , udávající koncentraci inhibitoru, při níž dochází k 50 procentní inhibici enzymu. Hodnota I_{50} je často vyjadřována v podobě záporného dekadického logaritmu (pI_{50}) a čím je tato hodnota vyšší, tím je látka silnějším inhibitorem. Pomocí efektorů lze významným způsobem ovlivňovat aktivitu enzymů a řídit tak biochemické reakce a jimi ovládané nebo řízené biologické funkce. Tímto způsobem je realizován farmakologický účinek řady léků a také toxický účinek mnoha chemických látek. Pokud působí nějaká látka jako inhibitor fyziologicky důležitého enzymu, lze očekávat, že bude silně toxická. Příkladem takového fyziologicky důležitého enzymu může být acetylcholinesteráza, bez níž by nemohl fungovat cholinergní nervový systém. Jeho mediátorem je neuromediátor acetylcholin, který je substrátem acetylcholinesterázy. Ta je lokalizovaná v oblasti nervových synapsí a nervosvalových zakončení (nervosvalových plotének), kde hraje klíčovou úlohu při přenosu nervového vzruchu. Jestliže je tento enzym inhibován, nemůže plnit svou fyziologickou úlohu, tedy hydrolyzovat a tím inaktivovat acetylcholin uvolňovaný na

synapsích a nervosvalových zakončeních. Jeho hromaděním v těchto místech dochází k trvalému dráždění cholinergních receptorů a narušení cholinergního přenosu, což se projeví řadou příznaků jako je mióza, zvýšená sekrece žláz z vnější sekrecí, bronchospasmus, křeče a ochrnutí dýchacího svalstva. Ke smrti dochází v důsledku zástavy dýchání a selhání kardiovaskulárního systému. Takovými inhibitory acetylcholinesterázy jsou např. známé nervové plyny, toxické organofosfáty (tabun, sarin, soman, látka VX) vyvinuté jako látky vhodné pro chemické zbraně, četné organofosfáty a karbamáty používané jako insekticida (parathion, paraoxon, metathion) a také některé přirozeně se vyskytující jedy (toxiny), jako je např. alkaloid fysostigmin, neurotoxin cyanobakterií anatoxin-(s), toxický peptid z hadího jedu mamby zelené nazvaný fasciculín a další. Společným mechanismem toxického účinku všech těchto látek je tedy inhibice acetylcholinesterázy v nervovém systému živočichů. Inhibice acetylcholinesterázy organofosforovými sloučeninami spočívá v jejich ireverzibilní vazbě na hydroxylovou skupinu serinu, která je součástí jejich katalytického centra. Schéma inhibice acetylcholinesterázy sarinem (O-isopropyl-methylfluorofosfonátem) je na Obr. 5.

Obr. 5. Schéma ireverzibilní inhibice acetylcholinesterázy sarinem. Jiným příkladem může být vznik pozdní neurotoxicity, vyvolaný inhibicí tzv. "neuropathy target esterase" (NTE) některými triarylfosfáty (např. tri-o-tolylfosfátem) a pesticidy (např. permethrinem), který vede k postupnému narušení myelinové pochvy některých nervů (demyelinizaci) a vzniku svalové obrny. Toxicita solí arsenu je realizována přes inhibici glutathionreduktázy, toxicita některých nesteroidních antiflogistik přes inhibici cyklooxygenázy a toxicita totálního herbicida N-(glykofosfonomethyl)gycinu (glyphosatu, roundopu) přes inhibici 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát-syntázy. Protože tento posledně jmenovaný enzym je přítomen pouze v rostlinných, nikoliv živočišných organismech, je tato látka toxická pouze pro rostliny a živočichům neškodí.

Interakce s receptory Receptory jsou biomakromolekuly, specializované na přenos informací pomocí signálních molekul. Jsou to proteinové struktury procházející napříč biologickými membránami s vazebnými místy a funkčními vztahy (Obr. 5). Funkčními vztahy se při přenosu signálu rozumí **specifické procesy**, které jsou vyvolány vazbou chemické látky (např. neuromediátoru) nebo jeho **agonisty** či **antagonisty** (viz dále) a které vedou ke změně propustnosti membrány pro určité ionty. Receptory jsou často součástí receptorových komplexů, které obvykle zahrnují: 1) rozpoznávací místo, ke kterému se specificky váže látka, na níž je receptor citlivý; 2) transdukční prvek, který převádí signál o navázání aktivující látky; 3) efektorový systém, který zajišťuje buněčnou odezvu. Vztah chemické látky k nějakému receptoru je charakterizován dvěma pojmy. Tzv. **afinitou** a **vnitřní aktivitou**. Afinita představuje určitý stupeň korespondence obou molekul, umožňující tvorbu komplexu **chemická látka-receptor**. Tento komplex je charakterizován **disociační konstantou K_A** , která udává koncentraci látky (obvykle v mol/litr), při níž je jedna polovina v podobě komplexu s receptorem a druhá polovina ve volné formě. Afinitu látky k receptoru lze charakterizovat jako převrtnou hodnotu afinitní

konstanty ($1/K_A$). Čím vyšší je afinita chemické látky k receptoru, tím nižších koncentrací je třeba k aktivaci receptoru a dosažení specifické odpovědi. Vnitřní aktivita představuje schopnost látky vyvolat takovou změnu v uspořádání makromolekuly receptoru, která vede k jeho aktivaci a vyvolání fyziologických dějů souvisejících s touto

aktivací.

Obr. 6. Model nikotinového cholinergního receptoru. Receptor je složen z pěti podobných proteinových podjednotek, které procházejí napříč membránou a vytváří iontový kanál. Pokud má chemická látka k určitému receptoru afinitu i vnitřní aktivitu a je schopna jej aktivovat, označujeme ji jako **agonistu**. Pokud má však pouze afinitu, ale nikoliv vnitřní aktivitu, není schopna receptor aktivovat, ale může bránit agonistovi v navázání na receptor a působí tak jako **antagonista**.

Interakce s iontovými kanály

Iontové kanály jsou složité proteinové struktury, uložené uvnitř biologických membrán tak, že spojují vnější a vnitřní stranu membrány pomocí kanálku, kterým mohou procházet malé ionty (zejména Na^+ , K^+ , Ca^{2+}). Iontové kanály fungují jako jakési branky (gates), protože kanálky je možno uzavírat a regulovat tak průnik malých iontů z jedné strany biologické membrány na druhou stranu. Iontové kanály, které mohou být:

1. Integrální součástí receptoru - např. GABA_A , nikotinový acetylcholinový receptor, glutamátové ionotropní receptory, 5-HT_3 receptor, glycinový receptor;
2. Regulovány přímo alfa aktivovanými podjednotkami G proteinů - např. adrenergní (α_{2A} , α_{2B}), dopaminové (D_2), serotoninové (5-HT_{1A}), GABA_B ;
3. Regulovány prostřednictvím systémů druhých posílů aktivovaných G proteiny (např. adenylátcyklázový systém) - beta-adrenergní receptor, muskarinový acetylcholinový receptor, atd.

Iontové kanály jsou tedy bezprostředně spojeny s ději odehrávajícími se na membránách, které souvisejí s přenosem signálů přes biomembrány. Hrají proto důležitou úlohu v řadě fyziologických procesů a zásah do jejich funkce je často spojen s jejich narušením. Jeden ze způsobů jak funkci iontových kanálů ovlivnit, je vazba chemických látek (ligandů) na jejich vazebná místa. Pomocí takové vazby jsou kanály ovládnuty, tj. otevírány a zavírány. Mnoho toxických látek uplatňuje svůj negativní vliv na organismus právě přes iontové kanály, tím že obsadí jejich vazebná místa a kanál buď na trvalo otevře nebo naopak natrvalo zavře. Vysokou afinitu k některým iontovým

kanálům mají zejména toxiny, přírodní jedovaté látky, které jsou např. součástí mnoha živočišných jedů. Ty interagují zejména se sodíkovými (některé hadí jedy, jedy mořských sasenek, akonitin, brevetoxiny), s draslíkovými (jedy homolic, některých mořských ryb a štírů) nebo vápníkovými kanály (jedy některých pavouků, calciseptin, imperatorin A apod.). Právě vysoká afinita toxinů k iontovým kanálům je důvodem jejich extrémní jedovatosti. Některé druhy proteinových toxinů jsou schopny vytvářet polymerní komplexy, které mohou být zabudovány do struktury biologické membrány a vytvořit v ní arteficiální kanál nebo pór, kterým může nekontrolovaně vstupovat vápník u mezicelulárního prostoru do buňky a způsobit tak její smrt. Takovým způsobem fungují např. některé peptidy nalezené v hmyzích jedech (vosa, včela). To je také častý mechanismus toxického účinku některých antibiotik na mikroorganismy.

Interakce s cytoskeletem

Cytoskelet eukaryotických buněk je tvořen komplikovaným pletivem vláknitých proteinových struktur tří druhů: mikrofilamenty, intermediálními filamenty a mikrotubuly. Cytoskelet buňky není rigidní kostrou, nýbrž neobyčejně dynamickým útvar, který je zodpovědný za její mechanické vlastnosti a podílí se na všech fyziologických pochodech odehrávajících se v každé živé buňce. Odpovídá za všechny druhy buněčného i vnitrobuněčného pohybu, dělení buněk, přesun organel v buňce, pohyb bičků a řasinek, atd. Cytoskelet propojuje navzájem jednotlivé buněčné struktury a vytváří vysoce sofistikovaný prostor s velkým a neobyčejně diferencovaným povrchem, na němž dochází k interakci různých proteinů a signálních molekul. Cytoskelet je zcela nezbytný pro regulaci buněčných pochodů a zachování integrity buňky, čímž zajišťuje její životaschopnost (viabilitu). Dynamika cytoskeletárních změn je podmíněna vratnou a rychlou polymerizací základních proteinových subjednotek do podoby vláken. To je spojeno s neustálým zkracováním a prodlužováním vláken cytoskeletu. Nejvýznamnější složkou cytoskeletu jsou mikrotubuly. Mikrotubuly se podílejí na všech procesech spojených s dělením buňky. Polymerace a s ní spojené prodlužování mikrotubulů je podmíněno navázáním GTP na heterodimer tubulinu. Vazebné místo pro GTP se nachází na β -subjednotce tubulinu. Prodlužování mikrotubulu se děje postupným navazováním heterodimeru α -tubulin_ β -tubulin na tzv. plus konec vlákna, které se šroubovicově stáčí a vždy 13 dimerů vytvoří jeden úplný závit. Při hydrolýze GTP za vzniku GDP dochází k zablokování dalšího růstu vlákna. Oddělováním dimeru z minus konce vlákna dochází k postupné depolymeraci a zkracování mikrotubulů. Stabilita mikrotubulů ve zdravé buňce je regulována proteiny, nazývanými "microtubule-associated proteins" (MAP), které kontrolují koncentrace Ca^{2+} v buňce. Látky, které se váží na mikrotubuly a brání jim v polymeraci či depolymeraci, mají cytotoxický účinek a jsou označovány jako mitotické jedy, anti-tubulinové látky, nebo inhibitory mikrotubulů. Mnohé z těchto látek se nachází v různých přírodních zdrojích, mikroorganismech, rostlinách, mořských organismech a pod. a jsou příčinou jejich vysoké toxicity. Jejich účinek na buňku je smrtící, ale cíleným zásahem mikrotubulárních inhibitorů do dělení nádorových buněk lze dosáhnout zastavení jejich dalšího růstu. Proto našly tyto látky praktické uplatnění v medicíně jako významná léčiva různých forem zhoubného bujení (např. paclitaxel, podofylotoxiny, apod) a zájem o ně se neustále zvyšuje. V poslední době jsou z různých přírodních zdrojů izolovány a chemicky identifikovány stále nové inhibitory mikrotubulů, které by mohly posunout možnosti terapie zhoubných nádorů a které se stávají vzorem pro syntézu ještě účinnějších derivátů a analogů.

Interakce s DNA Do interakce s DNA mohou vstupovat některé chemické látky, které molekulu DNA modifikují takovým způsobem, že tato nemůže plnit svou fyziologickou úlohu spočívající v předávání genetické informace dalším buňkám při jejich dělení.

Takové látky mohou zpomalit nebo zcela zabrzdit buněčné dělení a bývají nazývána cytostatika. Cytostatický účinek mohou mít např. některá silná alkylační či arylační činidla (např. yperity), která tím, že alkylují nukleotidové báze DNA, mohou způsobit chybné čtení tripletů při přepisu genetické informace z DNA na RNA a způsobit tak zánik některých buněk. Některé chemické látky s planární strukturou mohou být vmezeřeny do dvojité šroubovice DNA (interkalátory) a zabránit jejímu rozplétání, které je nezbytnou součástí buněčného dělení. Takovými látkami jsou např. některé mykotoxiny, jako např. aflatoxiny, některá antibiotika, např. actinomycin D, ethidium bromid a další látky. Mechanismus jejich toxického účinku je založen právě na tomto

principu.

Aflatoxin-B₁ Kontrolní otázky ke kapitole IV: 1. Které jsou nejčastější mechanismy toxického působení chemických látek? 2. Charakterizujte interakce chemických látek s enzymy. 3. Charakterizujte interakce chemických látek s receptory. 4. Charakterizujte interakce chemických látek s iontovými kanály. 5. Jak mohou působit genotoxicky účinné chemické látky?