

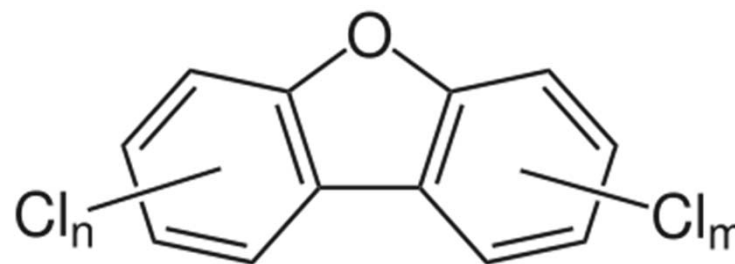
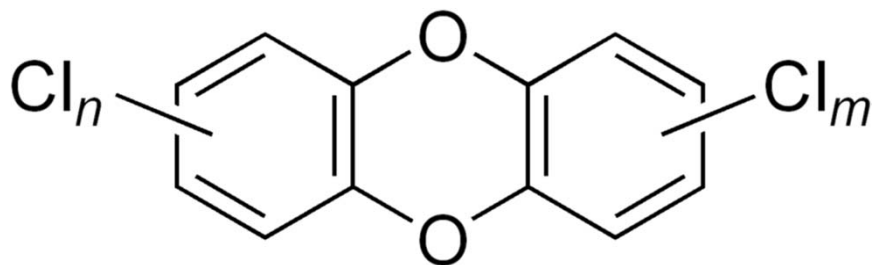
Přednáška č. 6
Organické polutanty 2 – dioxiny a PCB

Organické polutanty

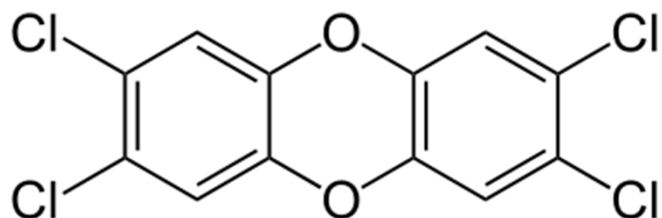
- perzistentní organické polutanty – látky definované Stockholmskou úmluvou, zahrnující pesticidy, průmyslové chemikálie a vedlejší produkty průmyslové výroby;
- polyaromatické sloučeniny a jejich deriváty, další produkty spalovacích procesů;
- další průmyslové kontaminanty – bisfenol A, ftaláty apod.

Polychlorované dibenzo-*p*-dioxiny a dibenzofurany

- vedlejší produkty průmyslové výroby a spalování;
- poloha a počet **Cl substitucí určuje perzistenci a toxicitu těchto látek;**



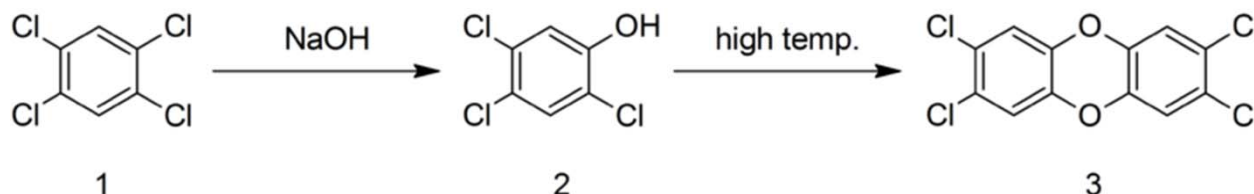
2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxin



- jedna z nejtoxičtějších látek vznikajících činností člověka;
- modelový zástupce této skupiny, definující jejich toxicitu;

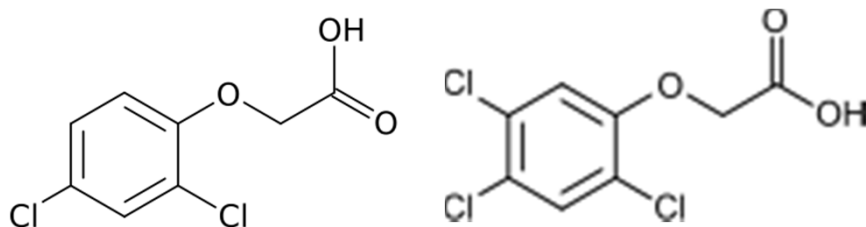
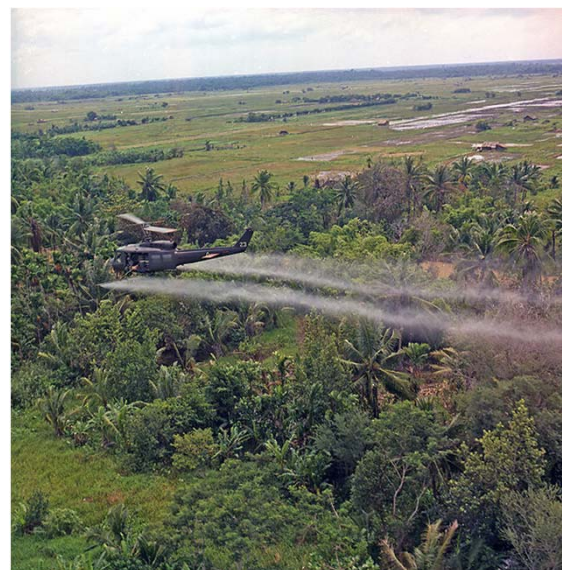
Seveso - 1976

Havárie v Sevesu, severní Itálie, 1976;
v malé chemické továrně došlo ke vzniku a následnému rozptýlu velkého množství TCDD – největší případ dokumentované expozice TCDD v historii;



Expozice herbicidy

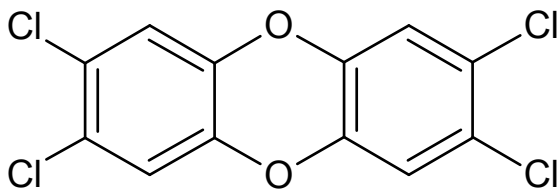
Vietnam – Agent Orange;
Spolana Neratovice – expozice
zaměstnanců;
otravy PCBs;



Langlebiges Gift

Ein **Dioxin-Skandal** erschüttert Deutschland:

Hühner, Puten und Schweine haben auf deutschen Bauernhöfen vergiftetes Futter gefressen. Ein Futtermittelhersteller hatte technische Fette aus der Diesel-Produktion für Tiernahrung genutzt. Über Eier oder Fleisch nehmen Menschen die Dioxine auf, wo sie sich in Leber und Gewebe einlagern.



Toxické účinky toxikantů dioxinového typu:

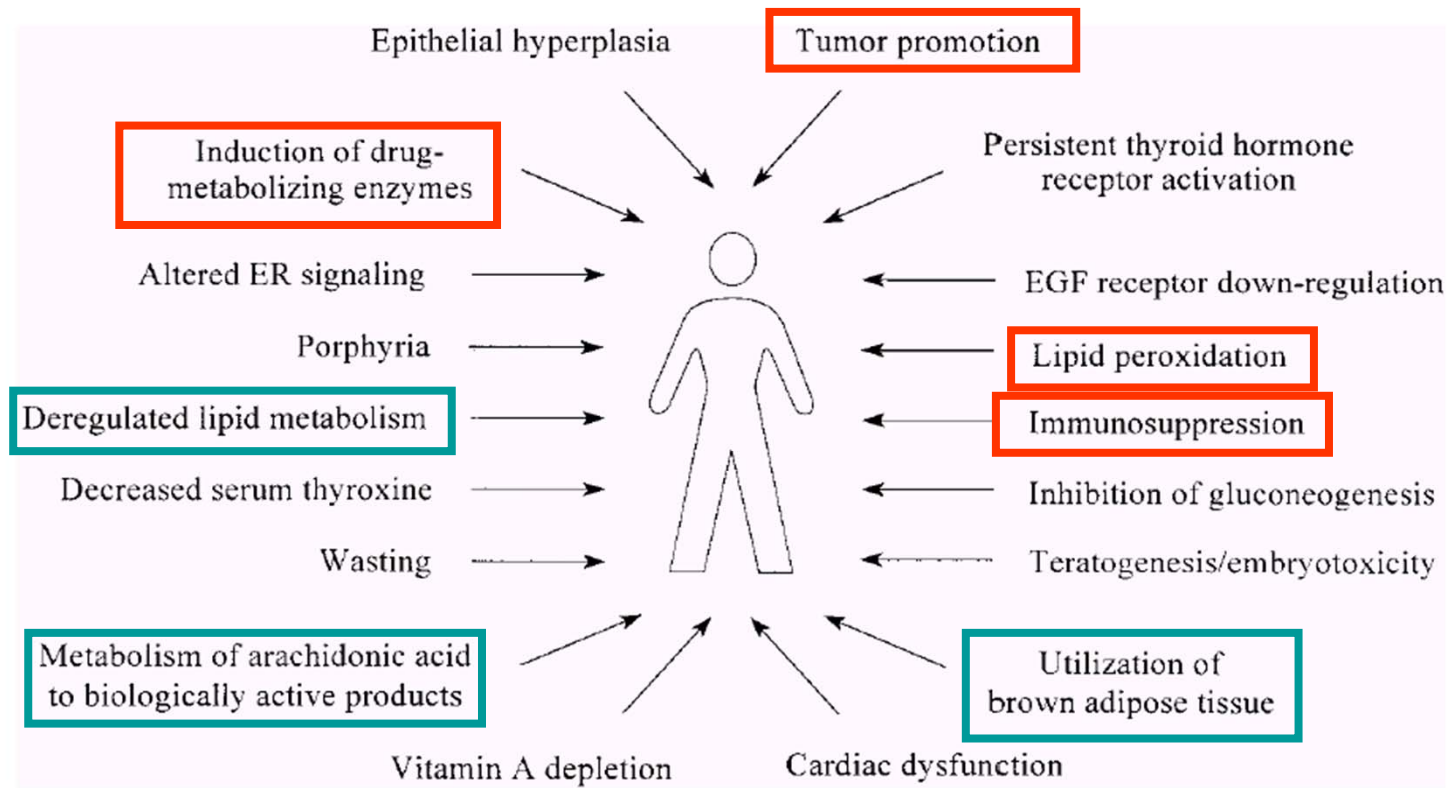
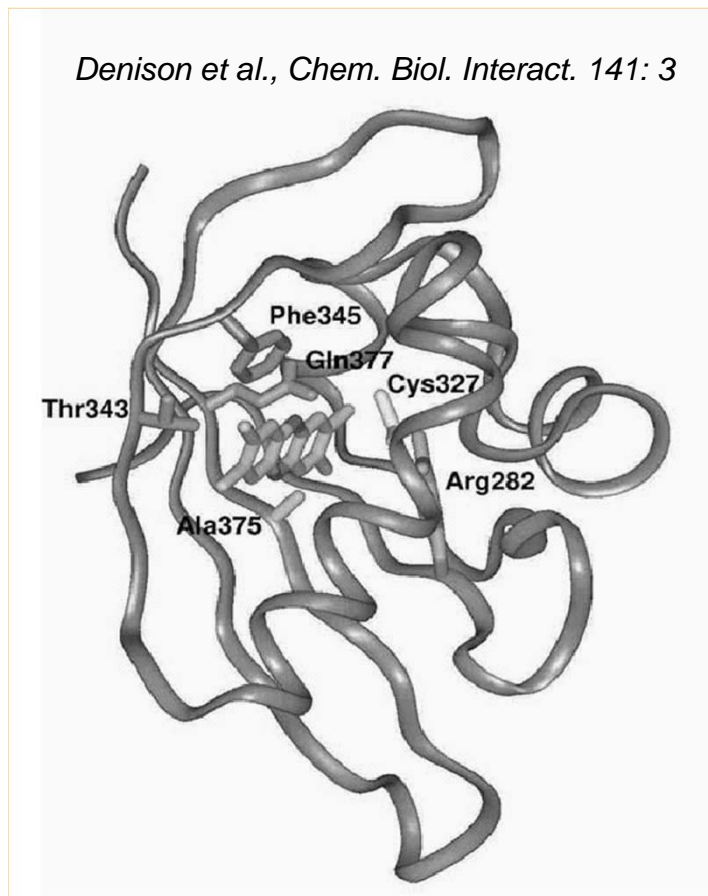


Figure 1 Biological responses to TCDD. A wide variety of cellular processes have been shown to be affected by TCDD.

Toxicita dioxinů, dibenzofuranů a koplanárních PCB je dána aktivací receptoru pro aromatické uhlovodíky – Ah receptoru

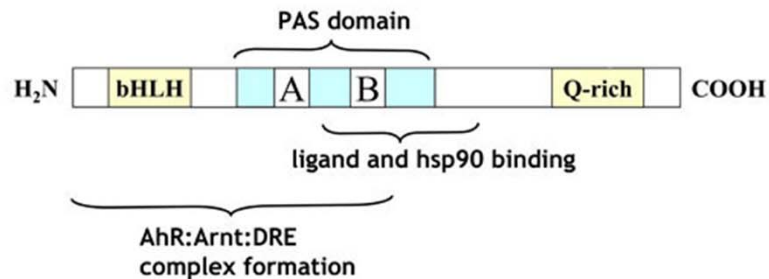
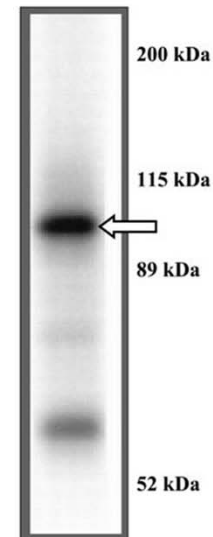
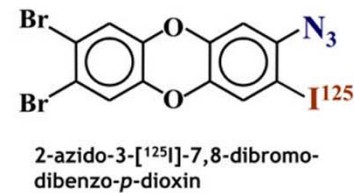
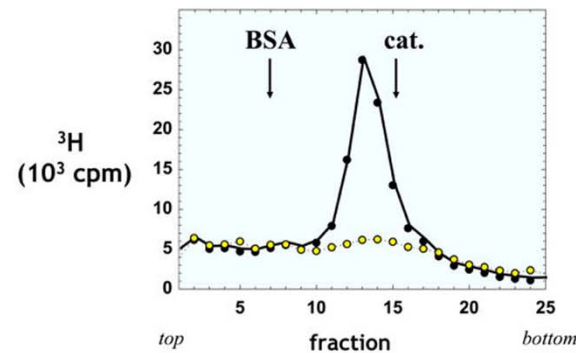


AhR =

- **transkripční faktor aktivovaný přírodními i toxickými látkami;**
- **zprotředkovává toxicitu POPs;**
- **regulátor metabolismu cizorodých látek, aktivace řady promutagenů;**
- **fyziologická úloha?**

Objev AhR

- inbrední myšší kmeny se výrazně liší citlivostí na TCDD a 3-MC – induktory metabolismu polycyklických aromatických sloučenin v jaterních mikrozómech;
- autozomálně dominantní dědičnost;
- izolace proteinu (80. léta); identifikace genu (90. léta);



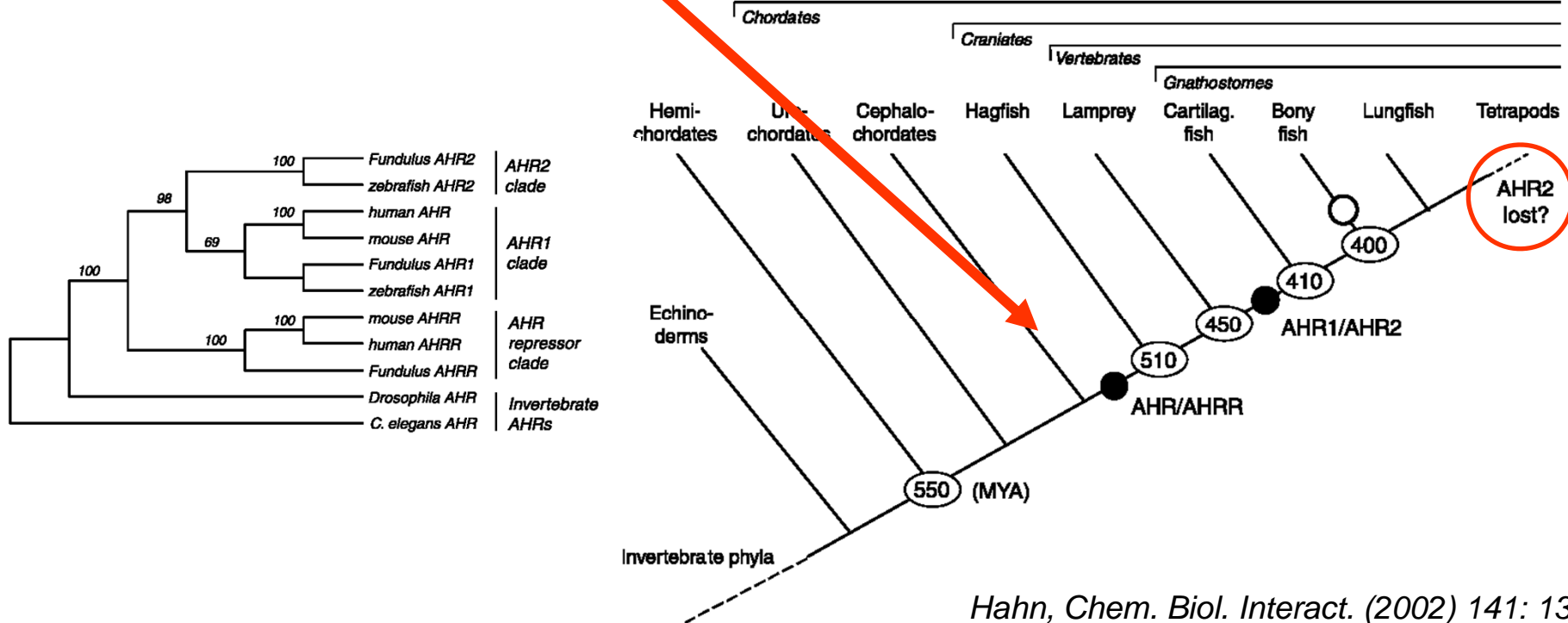
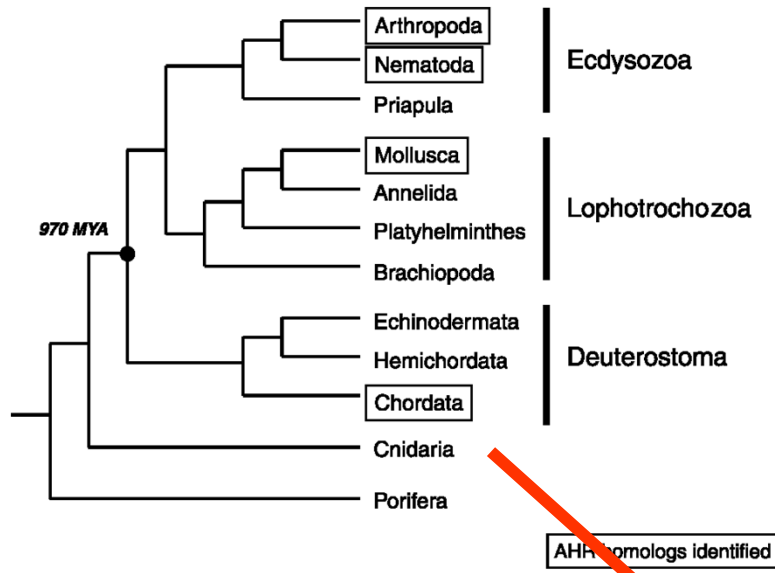
Molecular Toxicology,
2nd ed.

Evolve AhR:

AHR1
AHR2

AHRR

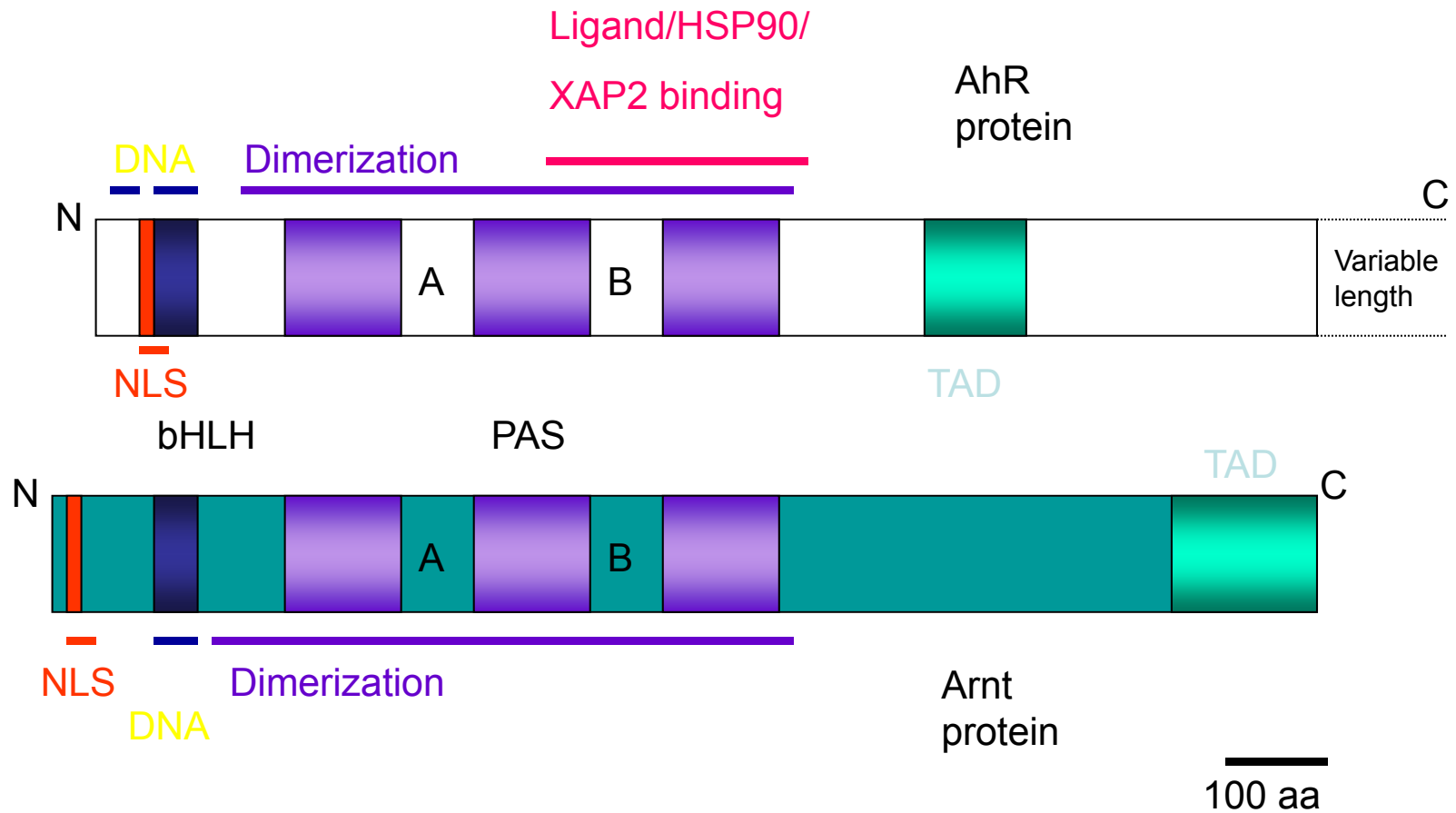
ARNT



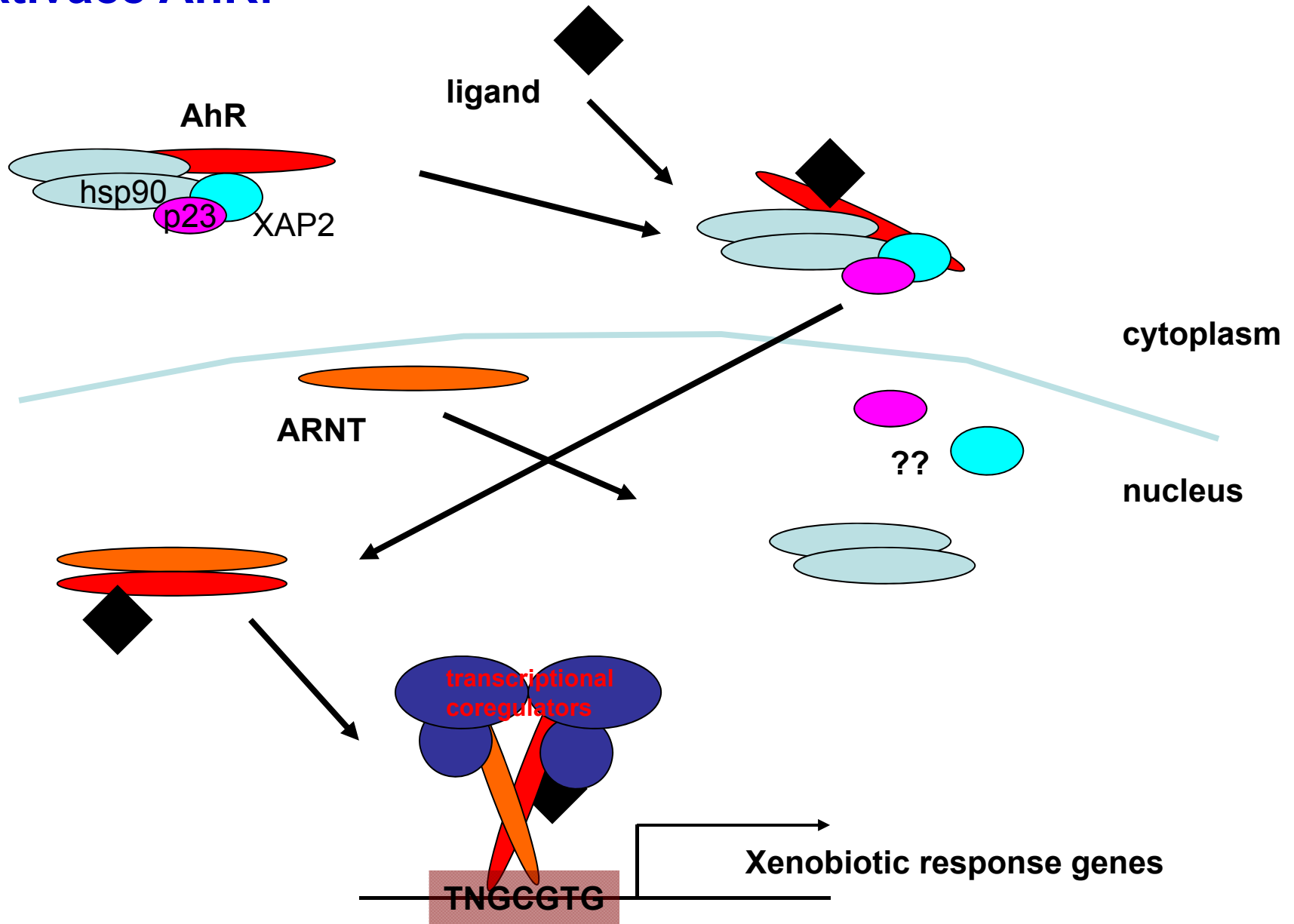
Evolve AhR:

Organism:	Name:	Ligand-binding:	Physiological function:
Nematodes: <i>Caenorhabditis elegans</i>	AHR-1	No	Neuronal development; Behavioral effects.
Insects: <i>Drosophila melanogaster</i>	Spineless (Ss)	No	Development; Regulation of homeobox genes and dendrite morphology
Vertebrates:	AhR (AhR1, AhR2)	Yes	Toxicity mechanisms; Liver and kidney development; Neuronal differentiation? Circadian rhythms?

Struktura AhR a ARNT:



Aktivace AhR:



Aktivace AhR vede k jeho rychlé translokaci do b. jádra a následné degradaci:

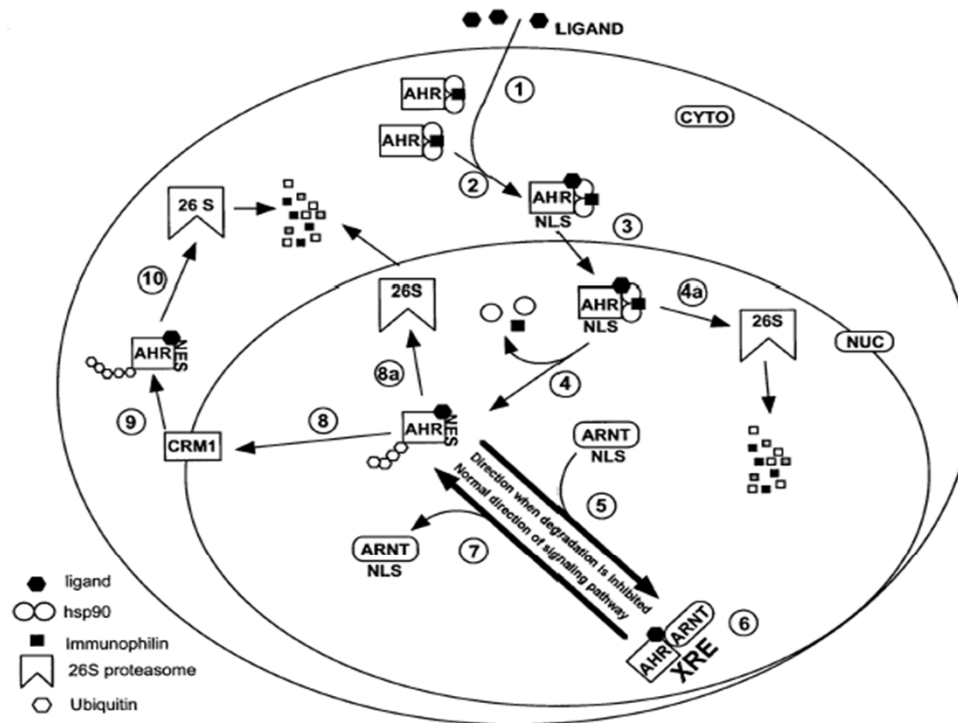
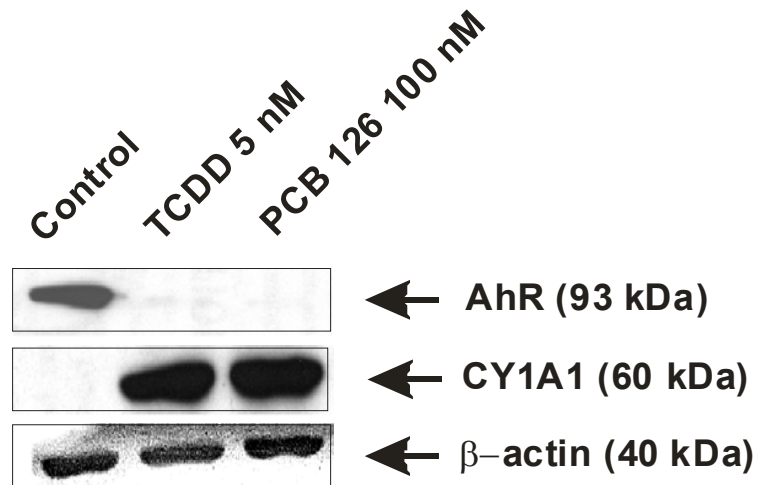
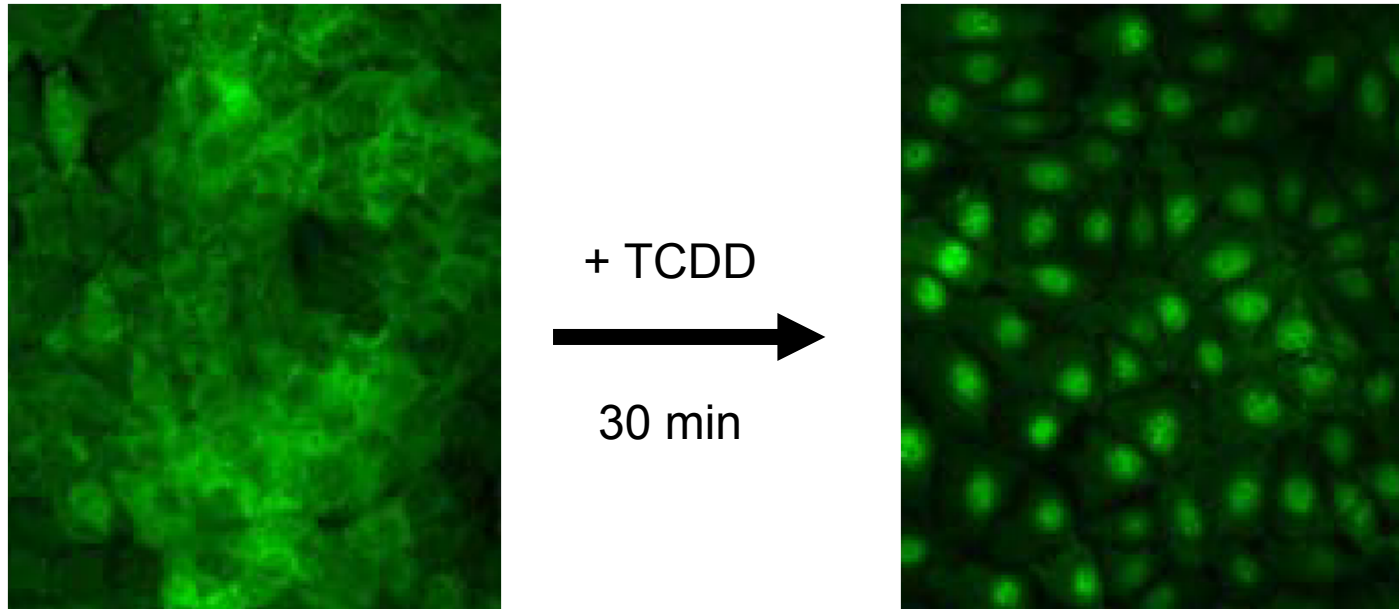


Fig. 1. Model of AHR-mediated signal transduction pathway. (1) Ligand enters cell. (2) Ligand binds to AHR·hsp90-immunophilin complex causing conformational change and exposing the NLS domain. (3) AHR complex is actively imported into the nucleus via NLS and nuclear import receptors. (4a) If receptor complex is in a misfolded conformation, it may be proteolytically degraded. (4) AHR dissociates from hsp90 and immunophilin exposing HLH/PAS domain and NES. (5) AHR dimerizes with ARNT-blocking NES sequence. (6) AHR·ARNT complex binds to XRE regions in DNA. (7) AHR·ARNT complex dissociates from DNA and ARNT exposing NES. (8a) AHR is ubiquitinated in the nucleus and degraded or (8) AHR is exported from nucleus via CRM-1 export receptor. (9) AHR is ubiquitinated in cytoplasm and (10) targeted to 26S proteasome for degradation. Note that the pathway is linear and also note the degradation of the AHR terminal step regardless of whether it occurs within the nucleus or cytoplasm. NLS, nuclear localization signal; CRM-1, chromosome region maintenance protein 1; 26S, 26S proteasome.

Aktivace AhR vede k jeho rychlé translokaci do b. jádra a následné degradaci:

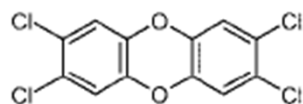


Geny regulované AhR

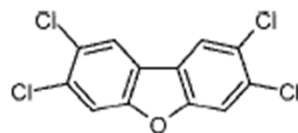
obsahují v promotorové nebo enhancerové oblasti tzv. xenobiotic response elements (XRE) / dioxin responsive elements (DRE):

- enzymy I. fáze biotransformace - *CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 1B1*;
- enzymy II. fáze biotransformace - *UDP-glucuronosyltransferase, GST-Ya, NADP(H):oxidoreductase*;
- regulátory buněčného cyklu, apoptózy, diferenciace, senescence – *Bax?*, *p27^{Kip1}*, *JunD*, *TGF-β*;
- AhRR.

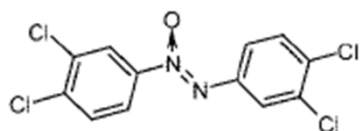
Toxické AhR ligandy:



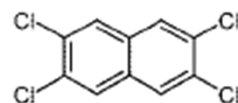
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin
(TCDD)



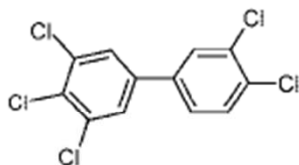
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran



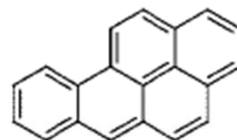
3,3',4,4'-Tetrachloroazoxybenzene



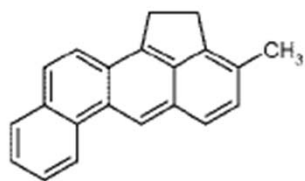
2,3,6,7-Tetrachloronaphthalene



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



Benzo[*a*]pyrene



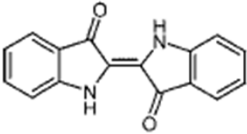
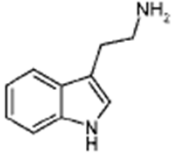
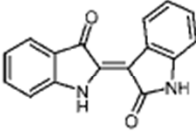
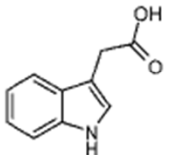
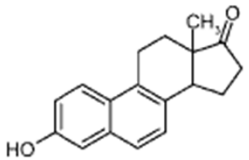
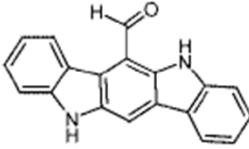
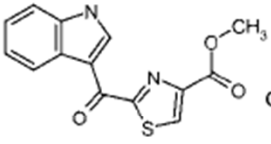
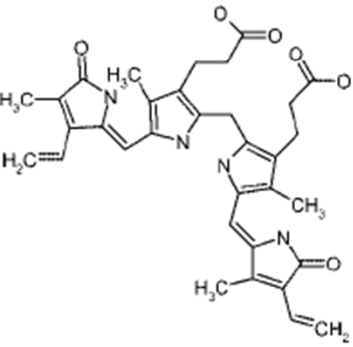
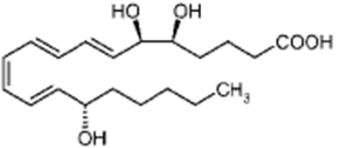
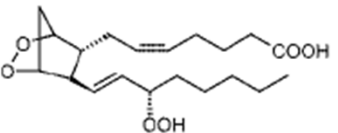
3-Methylcholanthrene

Figure 2. Classic AHR agonists. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran; 3,3',4,4'-tetrachloroazoxybenzene; and 2,3,6,7-tetrachloronaphthalene are representative HAHs. 3,3',4,4',5-Pentachlorophenyl is a potent PCB. Benzo[*a*]pyrene and 3-methylcholanthrene are PAHs.

Endogenní ligandy AhR?

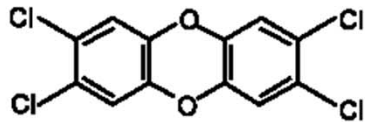
- deriváty tryptofanu;
- produkty metabolismu lipidů;
- přírodní látky – flavonoidy?, produkty bakterií a kvasinek;

Endogenous ligands AhR?

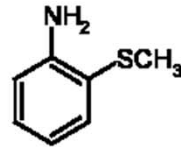
Compound structure	Name	AHR activation (EC ₅₀)	Compound structure	Name	AHR activation (EC ₅₀)
	Indigo	5 nM ⁽¹⁰¹⁾ 5 μM ⁽¹⁰²⁾		Tryptamine (TA)	0.2 mM ⁽¹¹⁹⁾
	Indirubin	0.2 nM ⁽¹⁰¹⁾ 1.26 nM ⁽¹⁰³⁾ 100 nM ⁽¹⁰²⁾		Indole Acetic Acid (IAA)	0.5 mM ⁽¹¹⁹⁾
	Equilenin	10 μM ⁽¹⁰⁸⁾		6-formylindolo-[3,2-b]carbazole (FICZ)	34-830 pM ⁽¹²⁸⁾
	2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester (ITE)	20 nM ⁽¹⁰⁷⁾		Bilirubin	30 μM ⁽¹¹⁷⁾
	Lipoxin 4A	100 nM ⁽¹¹⁴⁾			
	Prostaglandin G2	20 μM ⁽¹¹⁵⁾			

„Neobvyklé“ ligandy AhR

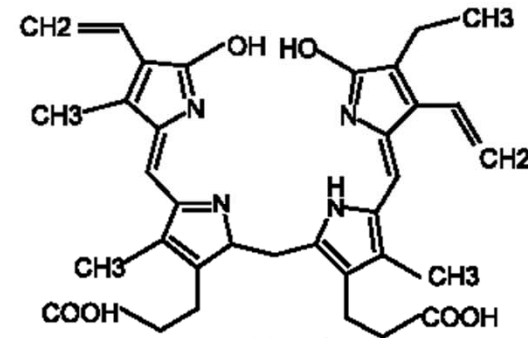
M.S. Denison et al. / Chemico-Biological Interactions 141 (2002) 3–24



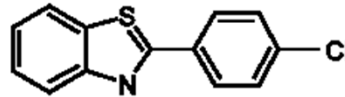
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin



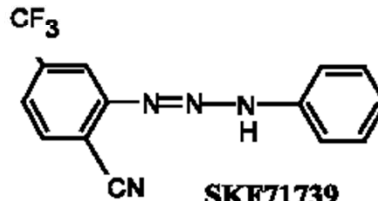
2-(Methylmercapto)aniline



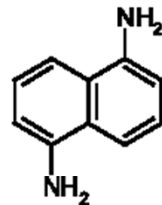
Bilirubin



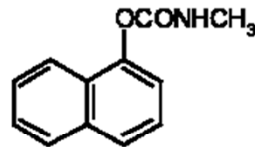
2-(4'-Chlorophenyl)benzothiazole



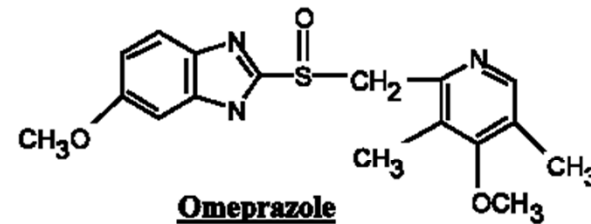
SKF71739



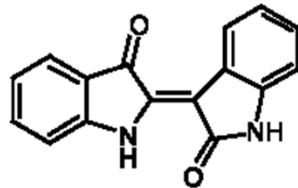
1,5-Diaminonaphthalene



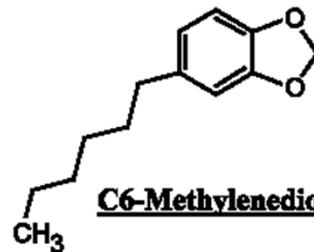
Carbaryl



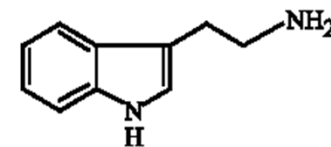
Omeprazole



Indirubin



C6-Methylenedioxybenzene



Tryptamine

AhR deficientní myši:

- růstová retardace;
- narušení vývoje jater a imunitního systému;
- hromadění retinoidů v játrech;
- abnormální vaskularizace ledvin a jater;
- řada efektů v imunitním systému a hematopoéze;
- odolné vůči karcinogenním účinkům BaP a teratogenitě TCDD;

Jaterní defekty:

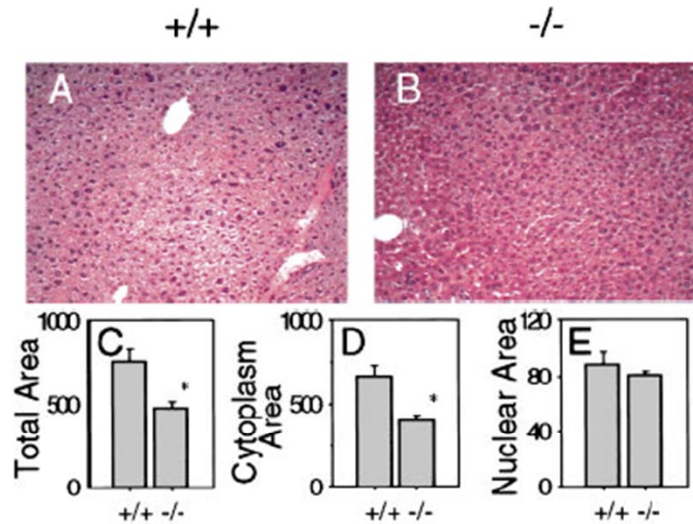
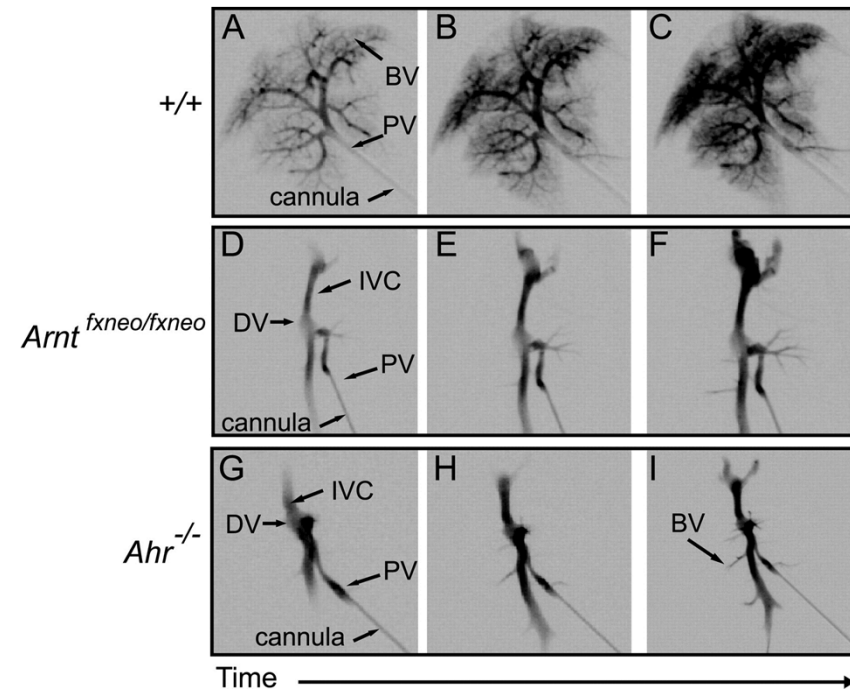


Fig. 1. *Ah*^{-/-} mice have smaller hepatocytes than wild-type mice. Livers of 1-year-old mice were fixed in formalin, and 6- μ m sections were examined after staining with hematoxylin/eosin. (A and B) Thin sections from wild-type (A) and age-matched *Ah* knockout (B) mice are shown, and results of morphometric analyses follow. (C) There is a significant decrease in the total area of the hepatocytes of *Ah*^{-/-} mice. (D and E) Whereas the cytoplasmic area of *Ah*^{-/-} hepatocytes is significantly decreased (D), the nuclear areas of *Ah*^{+/+} and *Ah*^{-/-} hepatocytes are not different (E). Mean and standard errors generated from comparison of six 1-year-old male *Ah*^{+/+} and six age- and sex-matched *Ah*^{-/-} mice are shown; asterisks indicate significance ($P < 0.05$).



Walisser et al., *J Biol Chem* 2004;279:16326-31

BaP není karcinogenní v AhR KO myších:

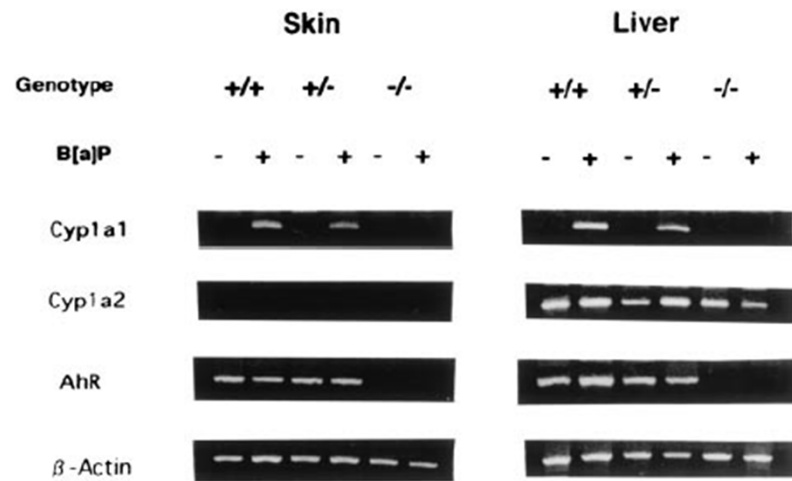


Fig. 1. *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, and AhR gene expression in the skin and liver of AhR(+/+), AhR(+/-), and AhR(-/-) mice, with and without B[a]P treatment. One-microgram aliquots of RNA extracted from skin and liver of control and B[a]P-treated mice of the three genotypes were reverse-transcribed and analyzed by PCR using specific primers for the *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, and AhR and β-actin genes.

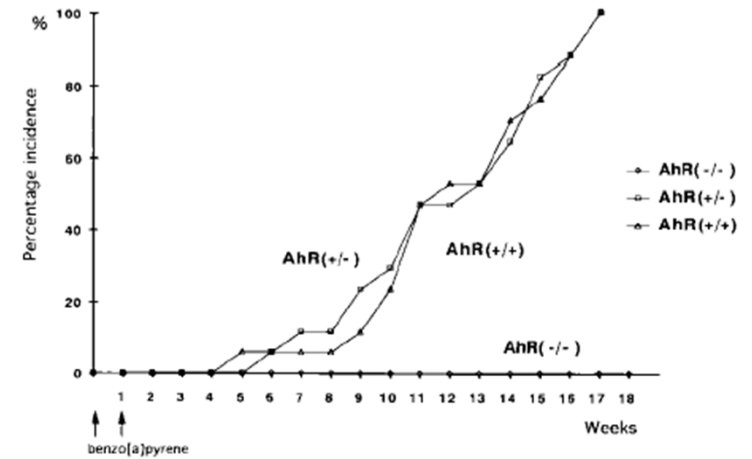


Fig. 2. Subcutaneous tumor induction in wild-type (△) and AhR-deficient male mice (+/-, □; -/-, ○) injected with B[a]P.

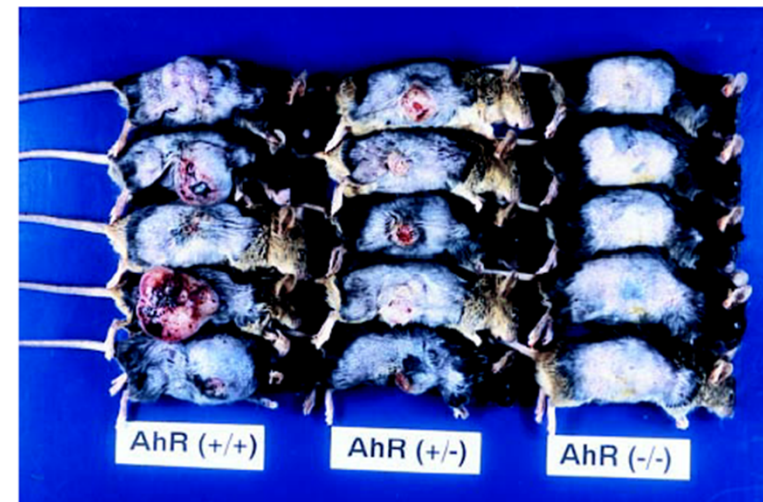
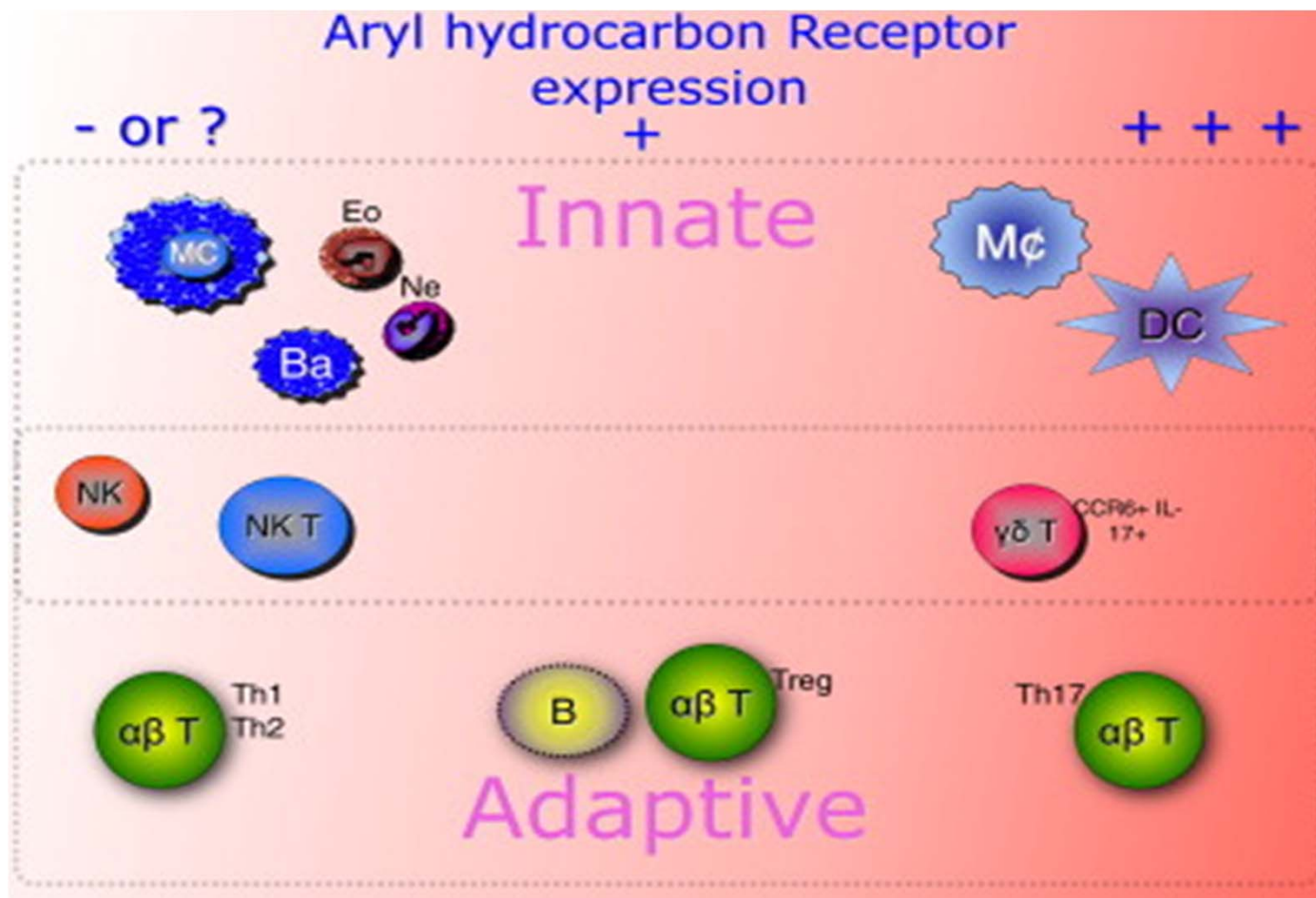
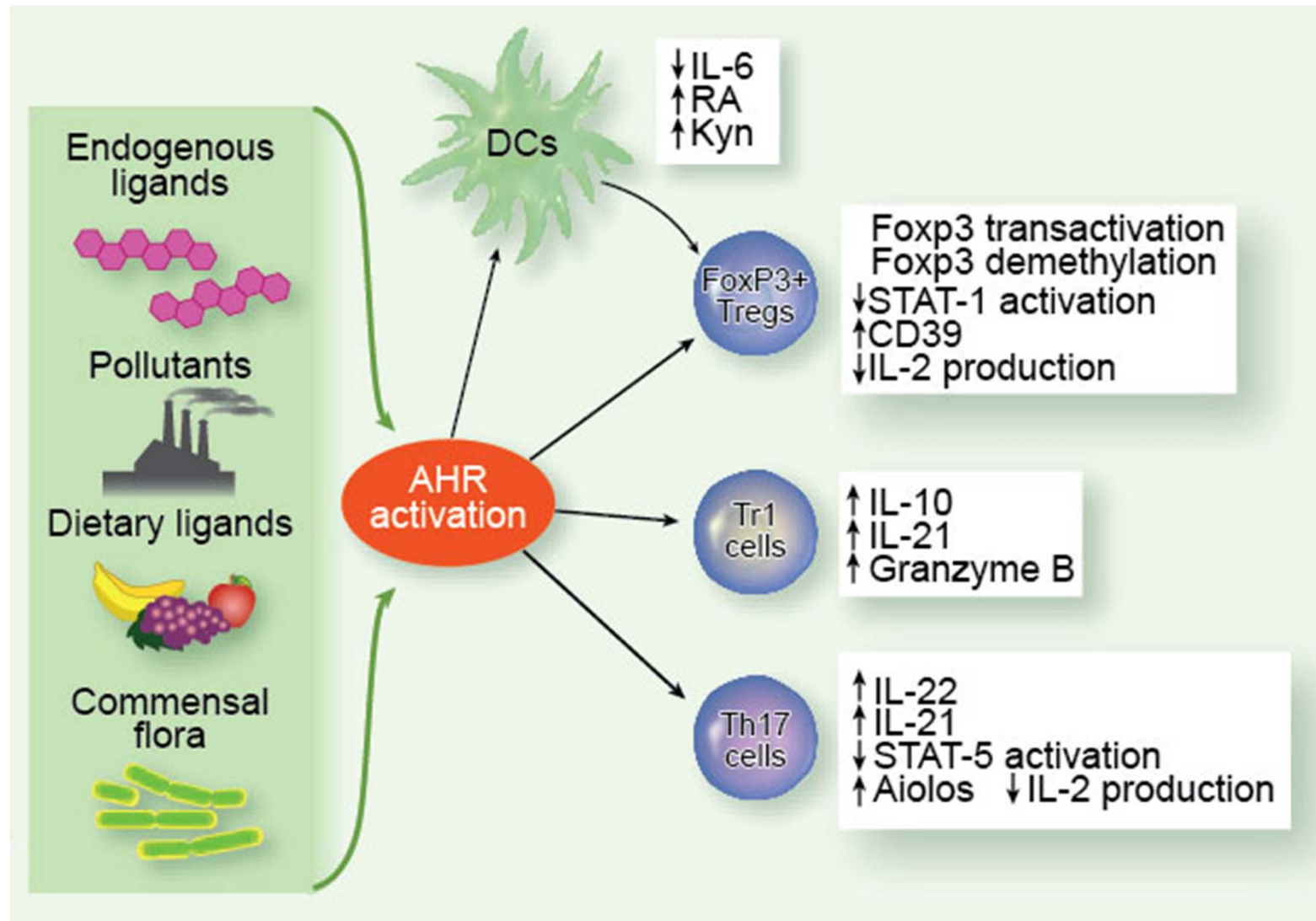


Fig. 3. Gross appearance of flank skins in AhR-wild-type mice (+/+), AhR-heterozygous mice (+/-), and AhR-deficient mice (-/-) injected subcutaneously with B[a]P.

AhR a imunitní systém



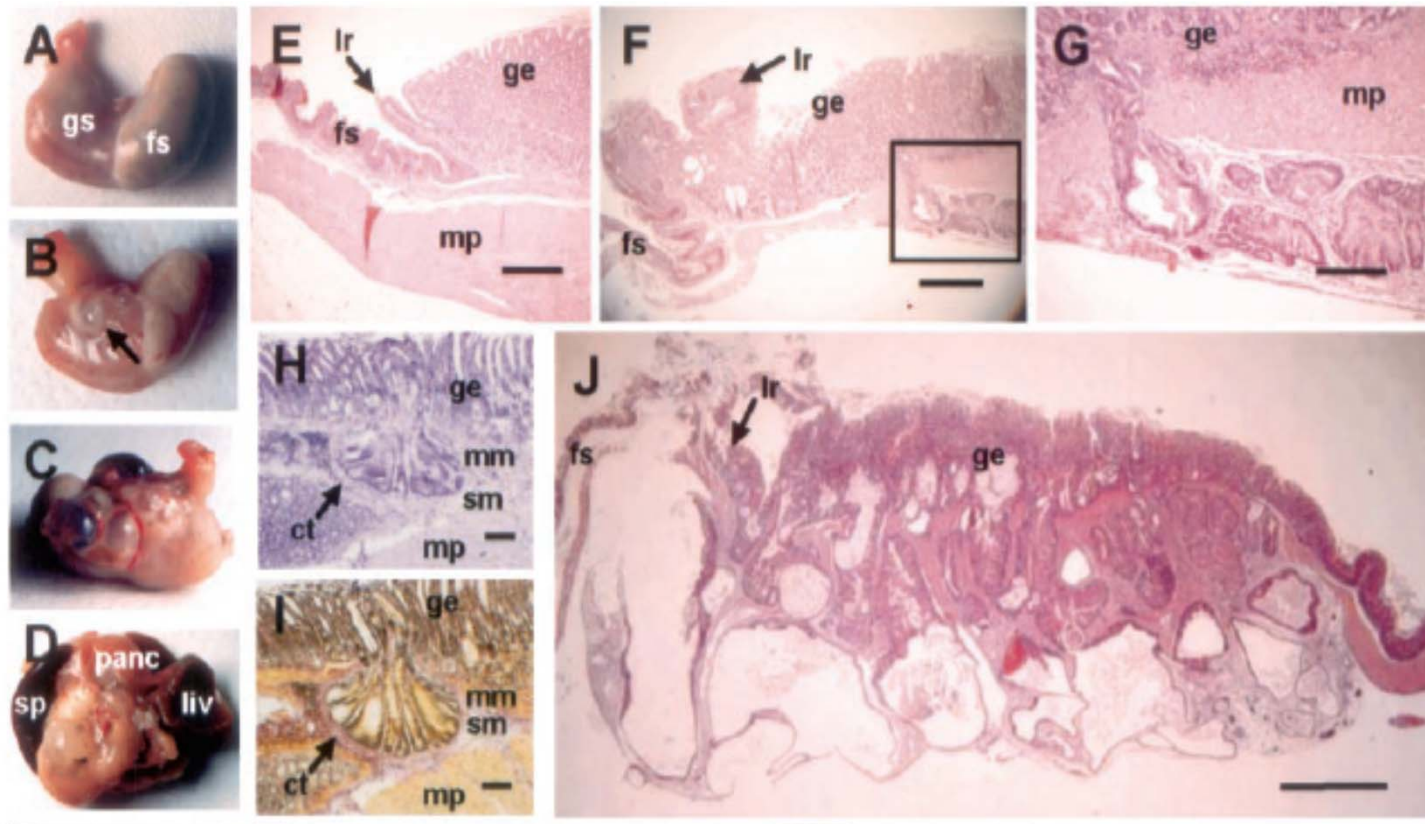
AhR a imunitní systém



AhR a imunitní systém střev

- hladina AhR je významně snížena ve střevní tkáni pacientů prodávajících chronické zánětlivé onemocnění střev; signalizace AhR signaling, via IL-22, inhibuje zánět a kolitidu v GIT myší;
- Ahr zprostředkovává udržování populace *retinoic acid related orphan receptor γ t-expressing innate lymphoid cells (ROR γ t⁺ ILC)* ve střevě a tvorbu lymfoidních folikulů;
- dietární AhR ligandy a sloučeniny produkované komensálními bakteriemi modulují diferenciaci a funkce imunitních buněk GIT;

Fenotyp CA-AhR myši – nádory žaludku a jater:



Neoplastic lesions and intestinal metaplasia in the stomach of CA-AhR mice. (A) Normal stomach from a 12-month-old wild-type male. (B) At 3–4 months of age single small cysts. (C) In older CA-AhR animals (6–12 months old) the number of cystic tumors increased and occupied a larger area of the stomach. (D) In the most severe cases (9–12 months of age), the stomach was adherent to adjacent organs such as spleen (sp), pancreas (panc), and liver (liv).

Koncepce toxických ekvivalentních faktorů (TEF)

- vzhledem k tomu, že látky dioxinového typu mají společný mechanismus účinku – aktivaci AhR, lze předpokládat, že jejich schopnost aktivovat tento receptor je úměrná jejich toxicitě;
- referenční toxikant – TCDD;
- $TEF = EC50 \text{ (daná látka)} / EC50 \text{ (TCDD)}$;
- TEF pro jsou definovány WHO;

$$\text{Toxicita směsi - TEQ} = \sum [C_i] \times TEF_i$$

Toxické ekvivalentní faktory (TEF)

TABLE 1
Summary of WHO 1998 and WHO 2005 TEF Values

Compound	WHO 1998 TEF	WHO 2005 TEF
Chlorinated dibenzo- <i>p</i> -dioxins		
2,3,7,8-TCDD	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	0.01
OCDD	0.0001	0.0003
Chlorinated dibenzofurans		
2,3,7,8-TCDF	0.1	0.1
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	0.03
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	0.3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	0.1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	0.01
OCDF	0.0001	0.0003
Non- <i>ortho</i> -substituted PCBs		
3,3',4,4'-tetraCB (PCB 77)	0.0001	0.0001
3,4,4',5-tetraCB (PCB 81)	0.0001	0.0003
3,3',4,4',5-pentaCB (PCB 126)	0.1	0.1
3,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB 169)	0.01	0.03
Mono- <i>ortho</i> -substituted PCBs		
2,3,3',4,4'-pentaCB (PCB 105)	0.0001	0.00003
2,3,4,4',5-pentaCB (PCB 114)	0.0005	0.00003
2,3',4,4',5-pentaCB (PCB 118)	0.0001	0.00003
2',3,4,4',5-pentaCB (PCB 123)	0.0001	0.00003
2,3,3',4,4',5-hexaCB (PCB 156)	0.0005	0.00003
2,3,3',4,4',5'-hexaCB (PCB 157)	0.0005	0.00003
2,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB 167)	0.00001	0.00003
2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB (PCB 189)	0.0001	0.00003

Bold values indicate a change in TEF value.

AhR-ER α crosstalk

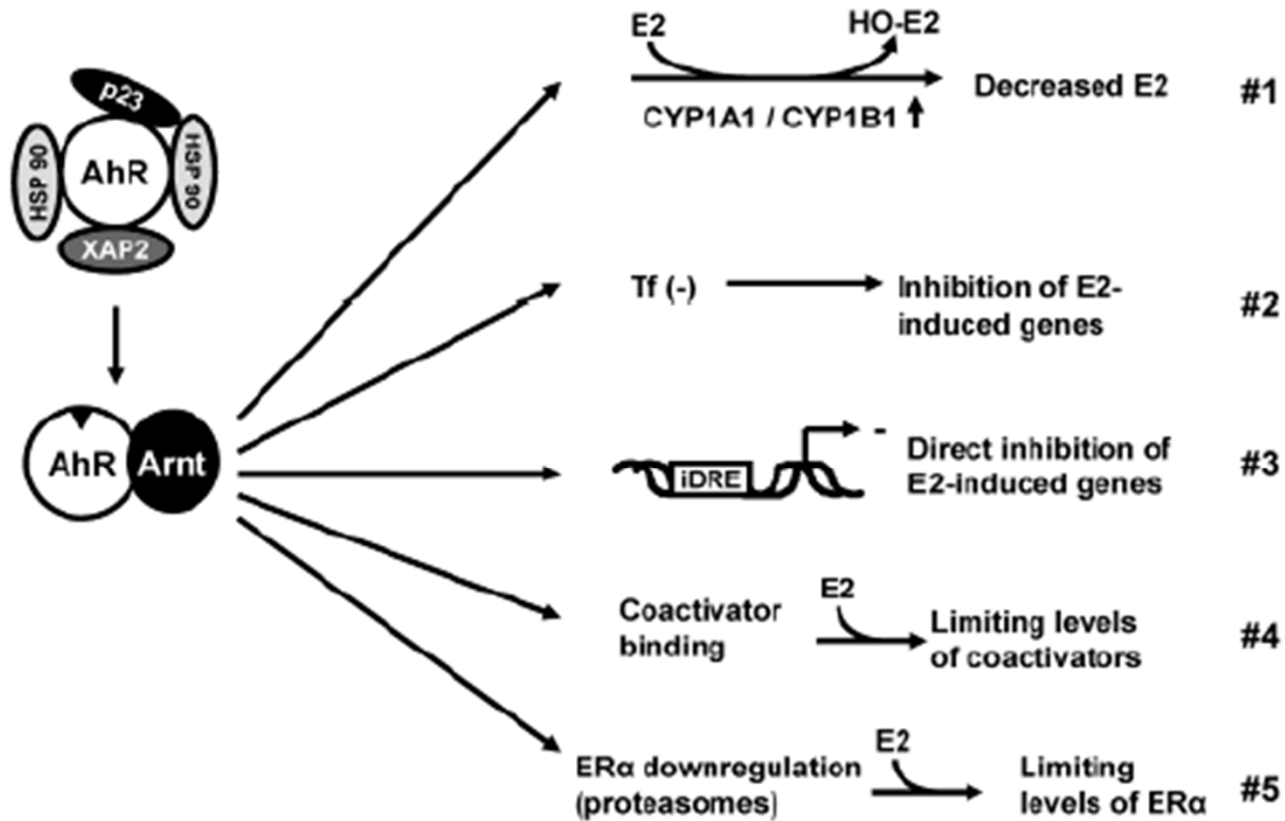
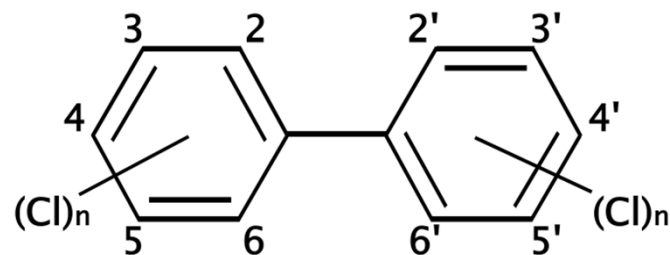


Figure 3. Proposed mechanisms of inhibitory AhR-ER α crosstalk (123-126).

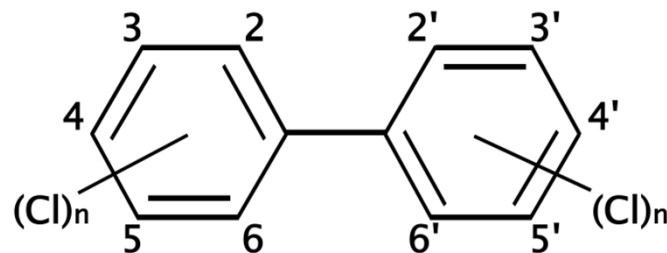
Polychlorované bifenyly (PCB)

- chemicky stálé, nehořlavé látky využívané v minulosti v řadě průmyslových aplikací – výroba transformátorů, kapacitátorů, el. motorů, ale i řada dalších;
- 209 kongenerů; vyráběny jako směsi od zač. 20. st. do r. 1979 (USA), 1984 (ČSSR), celosvětově byla jejich produkce zkázána SÚ (2001);
- globální produkce cca 1,5 mil. tun;
- jako env. polutanty identifikovány v 60. letech (S. Jensen);



Polychlorované bifenyly (PCB)

- jsou velmi persistentní a akumulují se v tělech konzumentů, především v tukové tkáni;
- i přes zákaz produkce, zůstává lokální hladina v kontaminovaných oblastech poměrně vysoká a navíc některé práce poukazují na možnost jejich vzniku v chem. výrobě např. barviv (PCB 11) a šíření vzduchem;
- 2 základní typy – koplanární (dioxinové) PCB a PCB nedioxinového typu – liší se množstvím i toxickým působením;



Toxické ekvivalentní faktory (TEF)

TABLE 1
Summary of WHO 1998 and WHO 2005 TEF Values

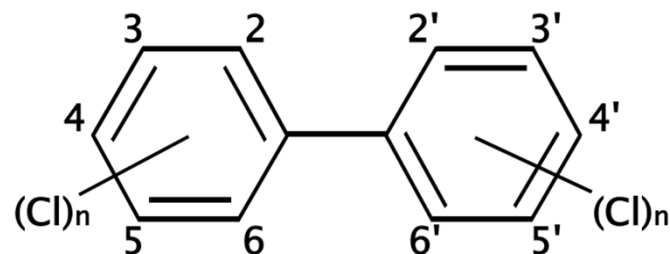
Compound	WHO 1998 TEF	WHO 2005 TEF
Chlorinated dibenzo- <i>p</i> -dioxins		
2,3,7,8-TCDD	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	0.01
OCDD	0.0001	0.0003
Chlorinated dibenzofurans		
2,3,7,8-TCDF	0.1	0.1
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	0.03
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	0.3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	0.1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	0.01
OCDF	0.0001	0.0003
Non- <i>ortho</i> -substituted PCBs		
3,3',4,4'-tetraCB (PCB 77)	0.0001	0.0001
3,4,4',5-tetraCB (PCB 81)	0.0001	0.0003
3,3',4,4',5-pentaCB (PCB 126)	0.1	0.1
3,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB 169)	0.01	0.03
Mono- <i>ortho</i> -substituted PCBs		
2,3,3',4,4'-pentaCB (PCB 105)	0.0001	0.00003
2,3,4,4',5-pentaCB (PCB 114)	0.0005	0.00003
2,3',4,4',5-pentaCB (PCB 118)	0.0001	0.00003
2',3,4,4',5-pentaCB (PCB 123)	0.0001	0.00003
2,3,3',4,4',5-hexaCB (PCB 156)	0.0005	0.00003
2,3,3',4,4',5'-hexaCB (PCB 157)	0.0005	0.00003
2,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB 167)	0.00001	0.00003
2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB (PCB 189)	0.0001	0.00003

Bold values indicate a change in TEF value.

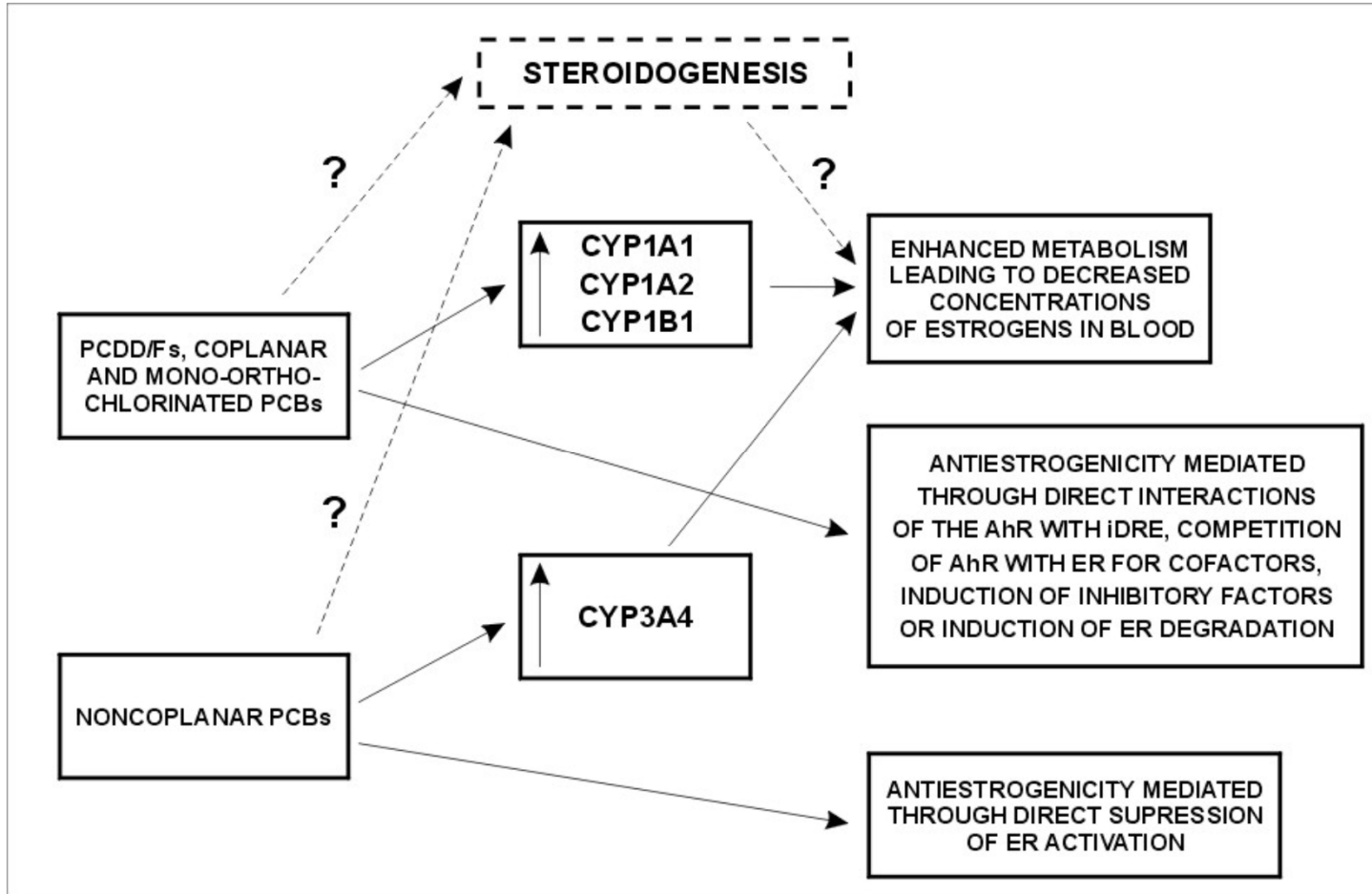
Toxické účinky nedioxinových PCB

- jaterní toxicita – jen ve velmi vysokých dávkách;
- dopad na neuroendokrinní a endokrinní systém;
- funkce nervového systému a chování;
- funkce imunitního systému;

Vzhledem k různým mechanismům působení nelze v současné době využít koncepci TEF. Je třeba další výzkum.



Interakce PCB a příbuzných látek se steroidní signalizací = velmi složitý proces:



Bromované zpomalovače hoření

- pro inhibici vzplanutí a hoření hořlavých organických látek – textilní průmysl, elektronika, výroba nábytku;
- bromované difenylethery (PBDE), tetrabrombisfenyl A, hexabromcyklododekan,
- od 90. let – předmět intenzivního studia – vysoká perzistence a lipofilita; potenciální endokrinní disruptory a imunotoxikanty; bioakumulace;

