

Inovace studia molekulární a buněčné biologie reg. č. CZ.1.07/2.2.00/07.0354



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Investice do rozvoje vzdělávání

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



Investice do rozvoje vzdělávání

ZTOX / Základy toxikologie

ce do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



Investice do rozvoje vzdělávání

Orgánová toxicita II.

Nefro- a Neurotoxicita

Radim Vrzal

ce do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



Investice do rozvoje vzdělávání

Seznámit s projevy a podstatou toxických účinků na ledvinnou a neurální tkáň

Organofosfáty, Kovy, Amfotericin

ce do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

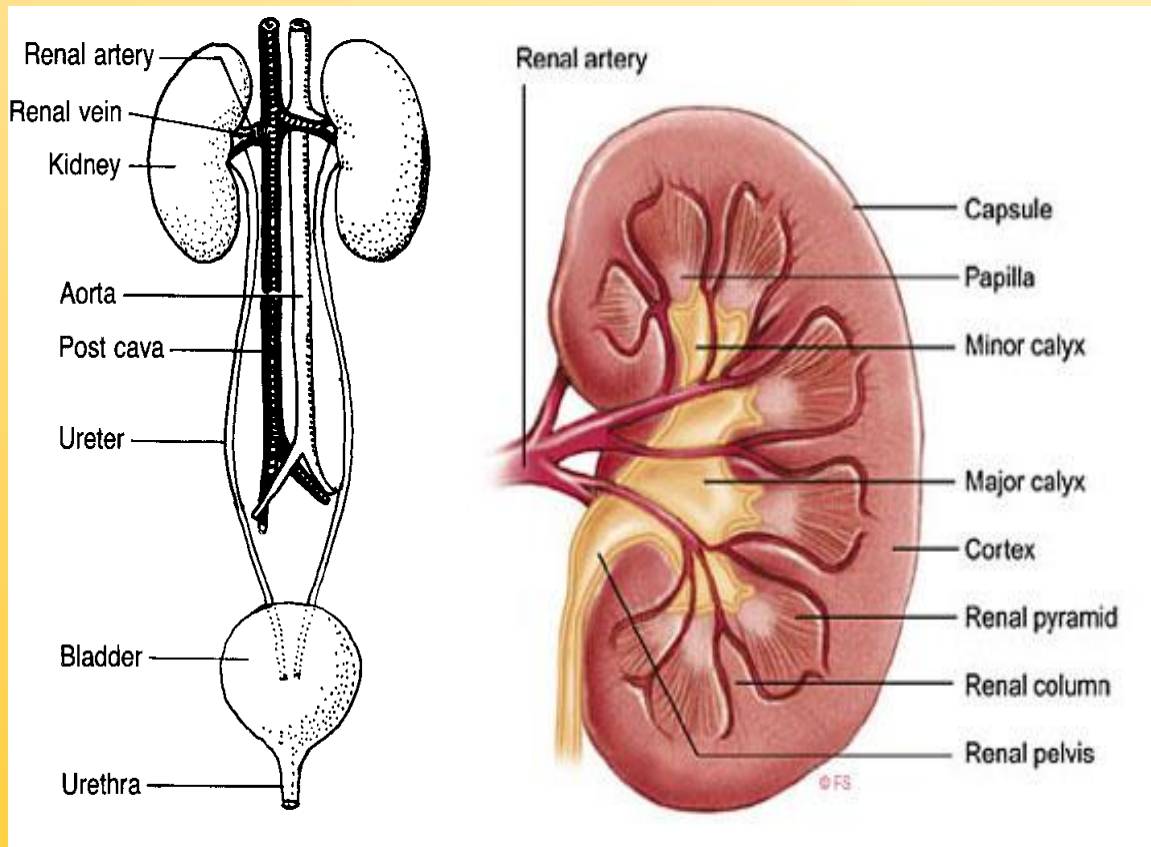


*Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a
státním rozpočtem České republiky.*

Nefrotoxicita I.

- Kortex – glomerulus, proximální, distální tubulus
- Medulla – Henleho klička, sběrné kanálky

- Papilla – místo uvolnění moči do minoritního kalyxu
- Tubulární tok v papille je koncentrovaný a snížený → extrémně vysoká koncentrace toxikantu



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

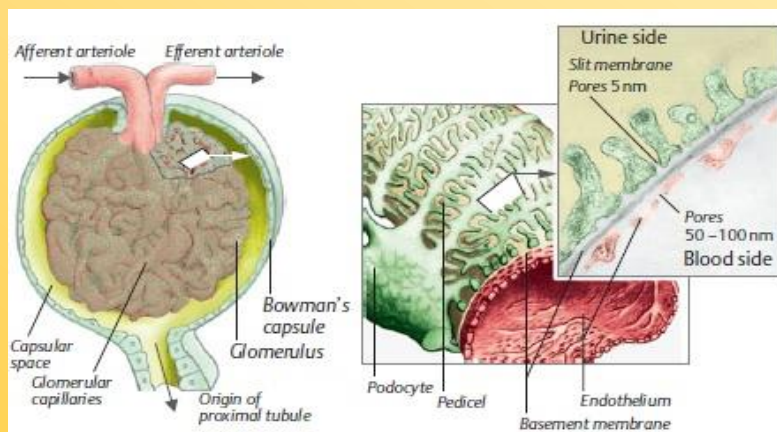
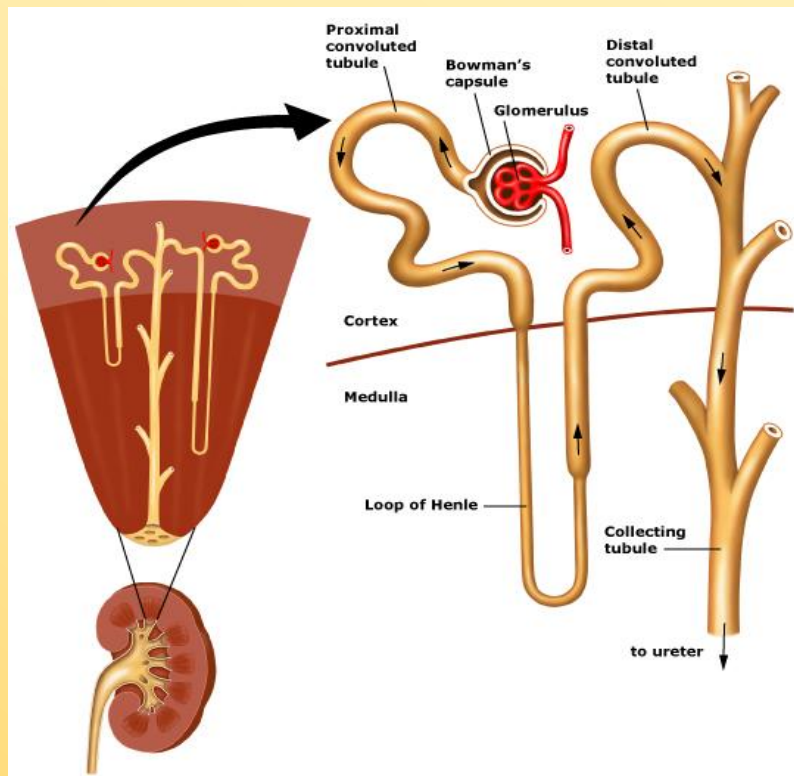
Nefrotoxicita II.

Krev přiváděna renální arterií.
Funkční jednotka = nefron
- síť kapilár = glomerulus

- vysoký tlak krve →
přestup póry glomerulu a sběr v
Bowmanově váčku (voda, glukosa,
AK, močovina, cizí sloučeniny)

- proximální tubul –
reabsorpce některých složek do
krve (aktivním transportem) –
glukosa, AK

- Henleho klička –
reabsorpce vody v klesající
části, iontů (Na^+ , K^+ , Cl^-) ve
stoupající části



Zbýlý materiál ve filtrátu = moč

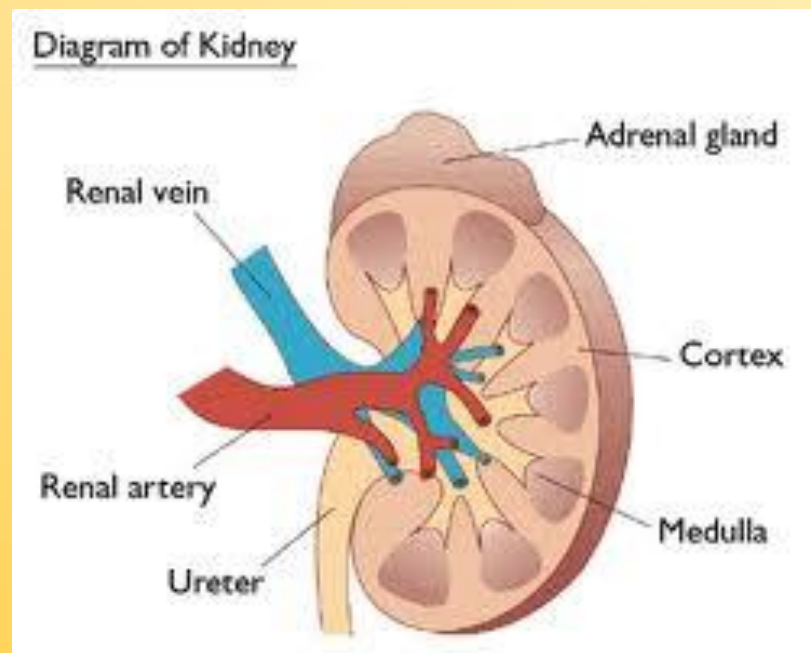
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Nefrotoxicita III.

- Transport oběhovým systémem
 - rozpustné látky difusí a cirkulací k místům eliminace
 - lipofilní látky – vazba na proteiny či lipoproteiny – v místě eliminace difuze k membránám či vazba na receptory membrány s proteinem (endocytosa) a intracelulární procesy vedoucí k eliminaci

Ledviny – místa eliminace ve vodě rozpustných sloučenin

- velikost - < 65000 Da projdou
- rozpustnost - lipofilní látky transportovány do ledvin vázané na proteiny – neschopné eliminace – nutnost biotransformace



Nefrotoxicita IV.

Ledviny - dostávají 25% kardiálního výstupu – přísun xenobiotik

- schopnost koncentrovat tubulární kapalinu
- biotransformace – podobné játrům - (acetaminofen, bromobenzen, chloroform, tetrachlormethan)
- P450 – proximální tubul = tvorba reaktivních metabolitů – interakce s makromolekulami

KOVY – v nízkých koncentracích

– aminoacidurie, glukosurie, polyurie

- akumulace v lysosomech

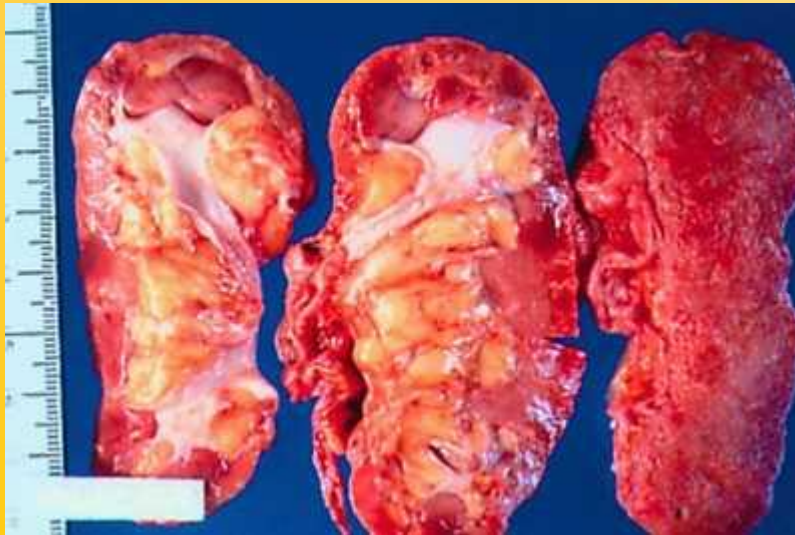
- ve vyšších koncentracích – renální nekrosa, anurie, zvýšený BUN (blood-urea-nitrogen)



Nefrotoxicita V.

Cd – jídlo, prach, kouř, kouření

- Japonsko – Itai-Itai – rýže z půdy s vysokým obsahem Cd
- anémie, poškození proximálních tubul, ztráta kostí a minerálů
- exkrece spolu s metalothioninem (–SH skupiny)
- 10-12 let je poločas u člověka



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

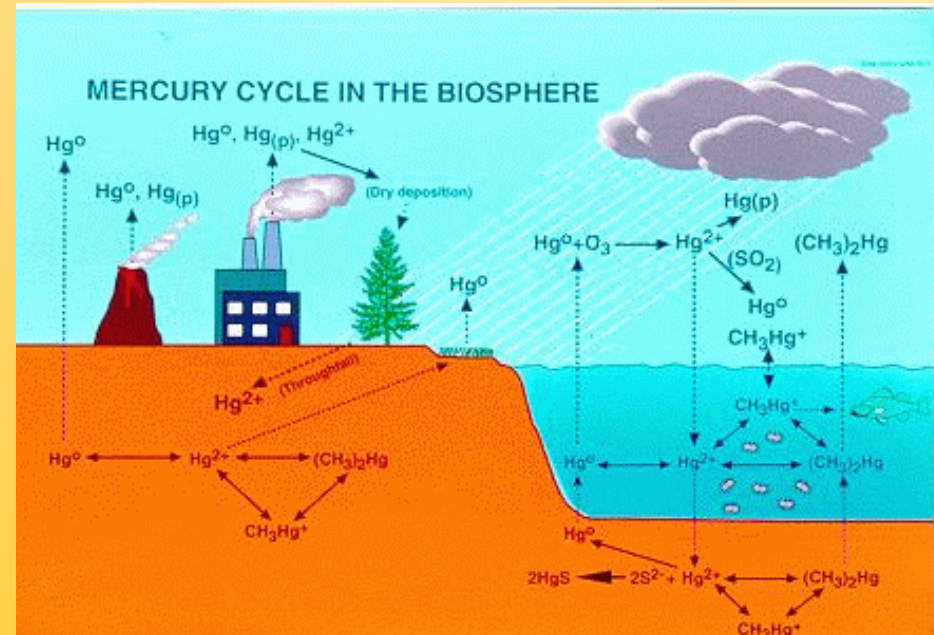
Nefrotoxicita VI.

Pb – barvy, voda, jídlo, prach, olovnatý benzín

- absorpce proximálními tubuly, inhibice mitochondrií
- komplexy s kyselými proteiny tvoří inkluzní tělíska tubulárních epiteliálních buněk

Hg – vazba na –SH skupiny membránových proteinů – inhibice Na^+ reabsorpce = diuretikum (20.- 60.léta 20. st. v klinické praxi organické komplexy s Hg)

U - cca 50% vázáno jako $(\text{UO}_2)^{2+}$ na hydrogenuhličitán – filtrace glomerulem, disociace v proximálním tubulu a vazba na membrány proximálního tubulu – zvýšená koncentrace glukosy, AK, proteinů v moči

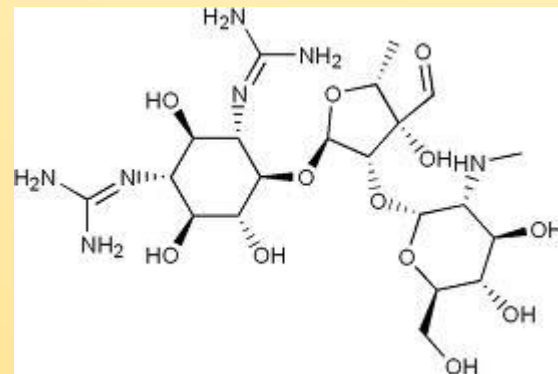


Nefrotoxicita VII.

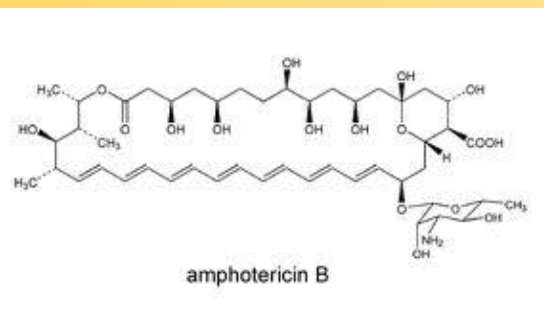
Aminoglykosidy – streptomycin, neomycin, kanamycin

- polární kationty reabsorbovány vazbou na aniontové fosfolipidy v membráně s následnou endocytosou a uschováním v lysosomu

- překročení kapacity lysosomů – vylití enzymů a nekroza



Amfotericin B – (polymyciny) vazba na fosfolipidy membrány a rozrušení integrity



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



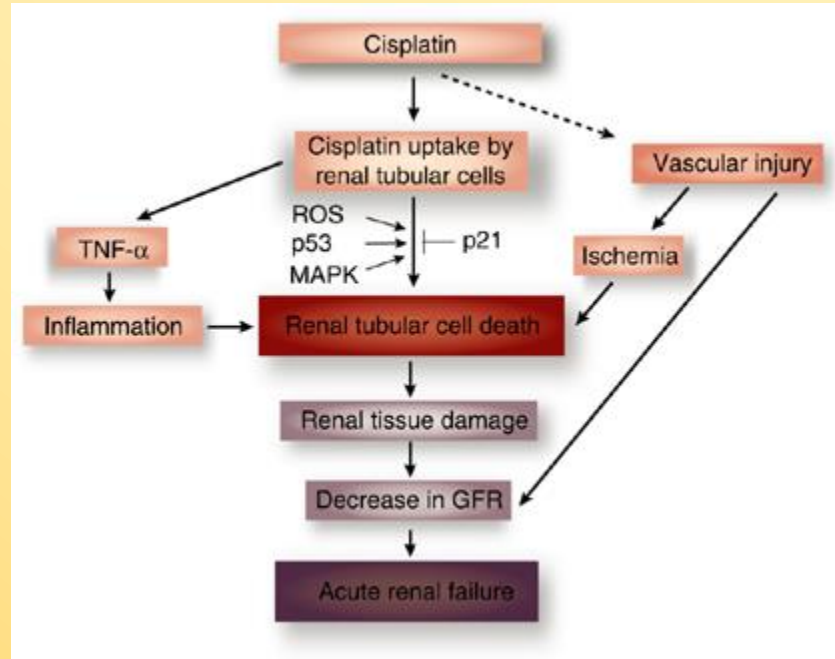
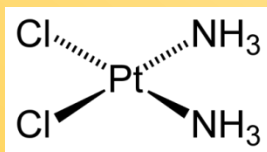
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

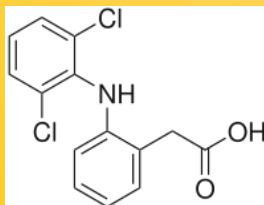
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Nefrotoxicita VIII.

Cisplatina – tvorba DNA aduktů
– tvorba ROS → nekrosa



NSAIDs – acetaminofen, *Diclofenac* – Indie - úmrtnost supů po konzumaci mršín domácího zvířectva – nálezy krystalů urátu a nekrosa endotelia proximálních tubul



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

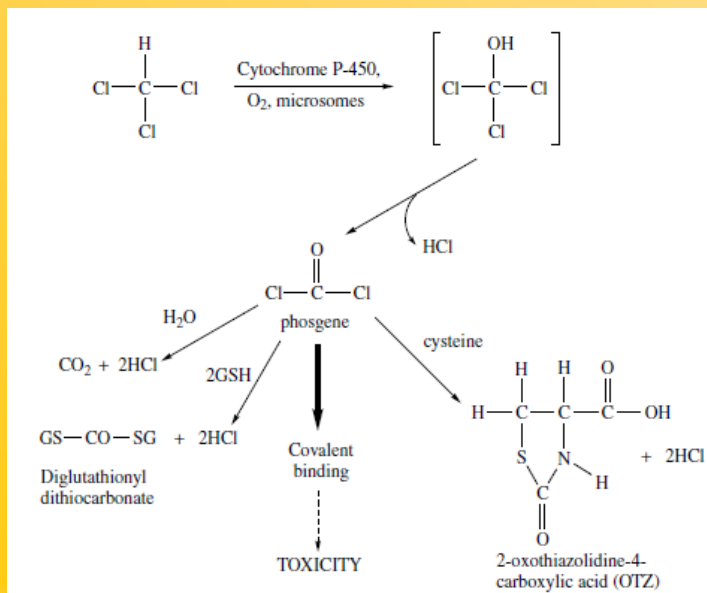
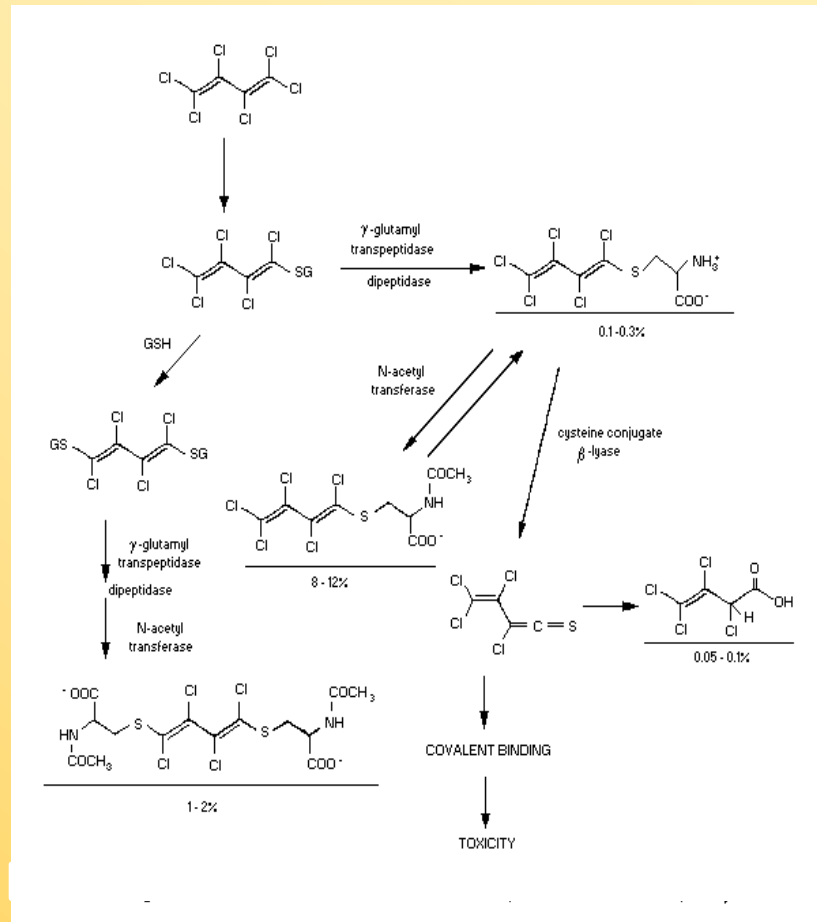
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Nefrotoxicita IX.

**Hexachlorbutadien –
rozpouštědlo, teplovodní medium**

**- tvoří glutathionový konjugát →
cysteinový konjugát - štěpen β-
lyasou**

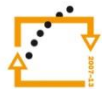


**Chloroform – nefro i
hepatotoxikant – druhově a
pohlavně závislé (myši samci
– nekroza ledvin, myši
samice – nekroza jater)**

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

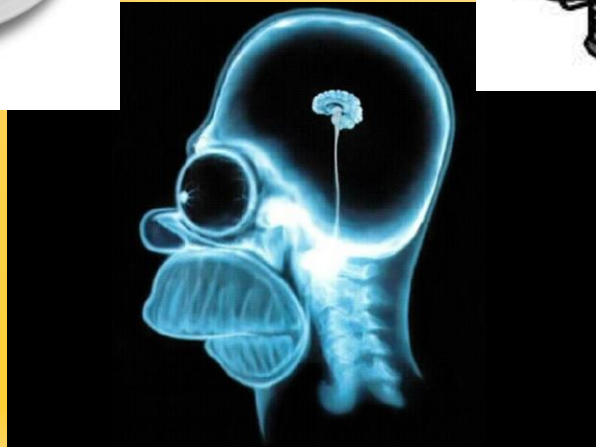
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Neurotoxicitata I.

= Schopnost látky nepříznivě ovlivňovat strukturní a funkční integritu nervového systému

Změna v nervovém systému

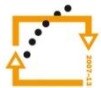
- důsledek interakce s normálními signalizačními mechanismy
- důsledek strukturální změny



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

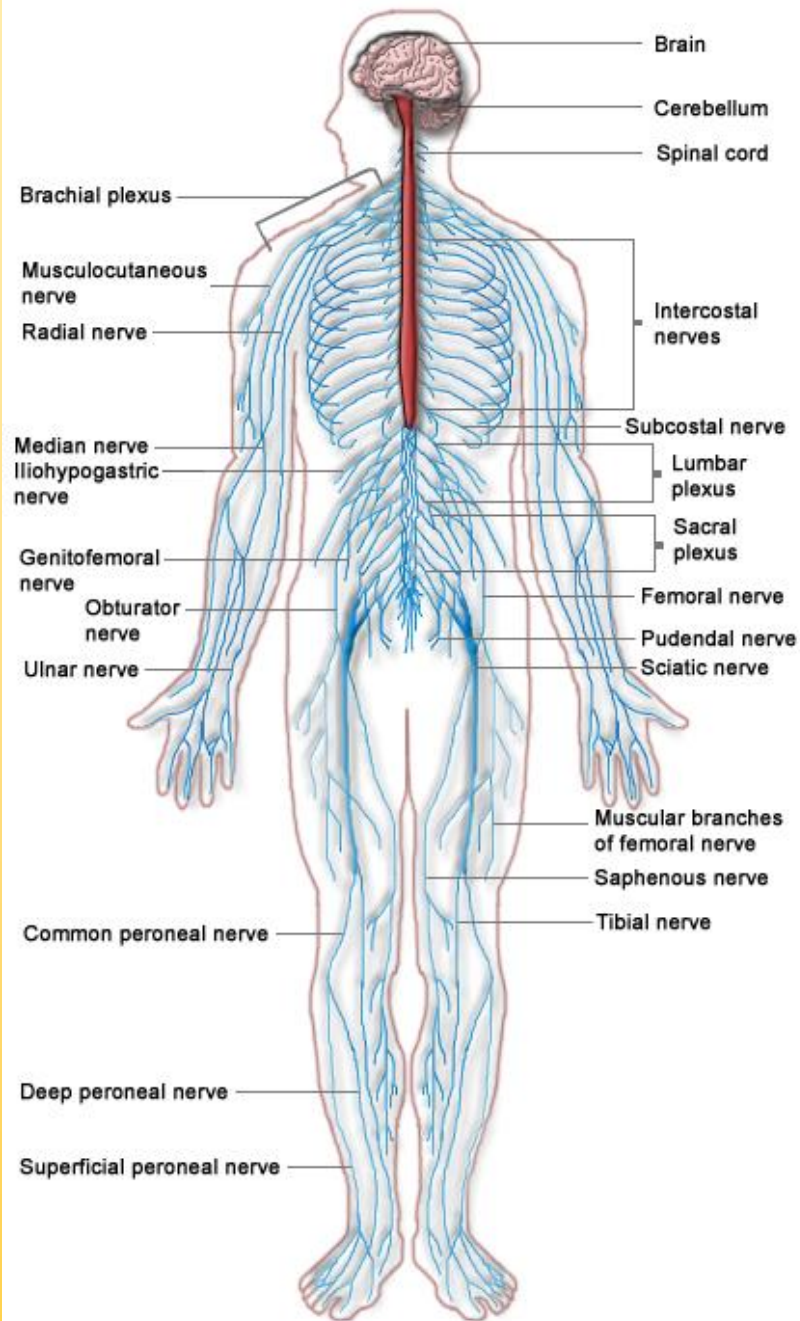
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Neurotoxicita II.

Nervový systém – získávání informací z prostředí

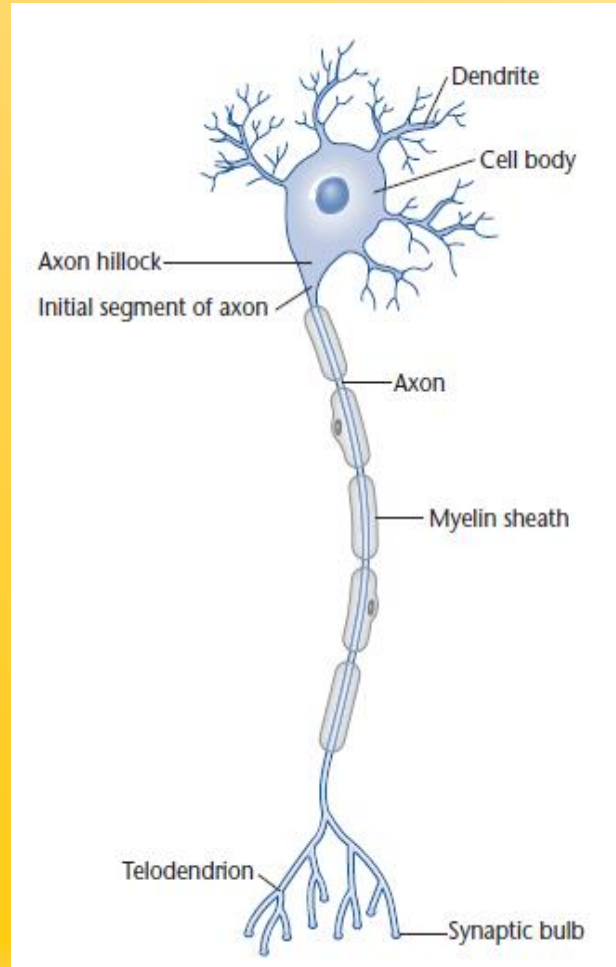
- pocity, myšlení,
uvažování

- CNS – mozek + mícha
- PNS – to ostatní
 - somatický - afferentní – přináší informace z kůže, svalů do CNS
 - efferentní – inervace skeletálních svalů pro kontrakci
 - autonomní – inervace a kontrola hladké svaloviny, srdce, endo- a exokrinních žláz
 - sympatikus a parasympatikus



Neurotoxicita III.

Neuron - přijímá, vede, vysílá informace – polarizovaná buňka
- obklopen astrocyty, mikroglie, oligodendrocyty, ependymovými buňkami



- přenos elektrických impulsů

-biochemicky diferencované – sekrece: acetylcholin, dopamin, serotonin, gama-aminomáselná (GABA)

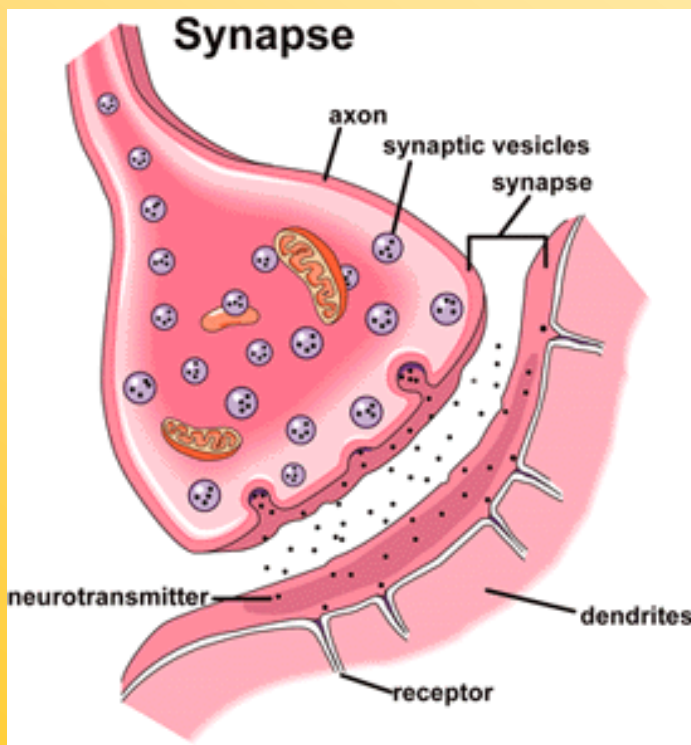
- 3 části = tělo (soma), dendrity, axon

-Soma - biosyntéza, metabolismus

-Dendrity – přijímají signály a přenášejí je do těla neuronu

-Axon (neurit) – pouze 1, odvádí impuls od těla neuronu, milimetry až metr na délku, transport látek

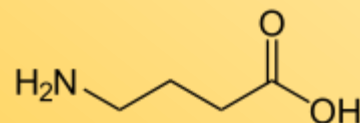
Neurotoxicita IV.



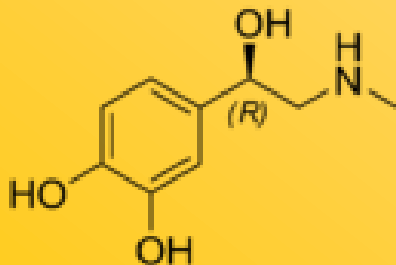
- Konec axonu - synaptická cibulka
- Mezera mezi cibulkou a dalším neuronem = synapse (cca. 20 nm)

V každé synaptické cibulce - cca 500 membránově vázaných váčků obsahující jeden druh molekul – neurotransmitery

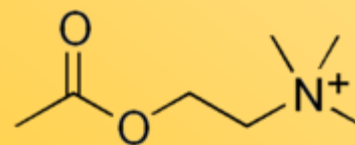
Transportovány na konec axonu, syntetizovány v těle neuronu.



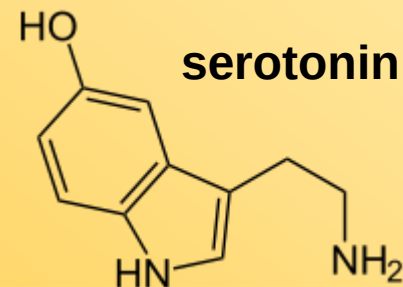
GABA



adrenalin

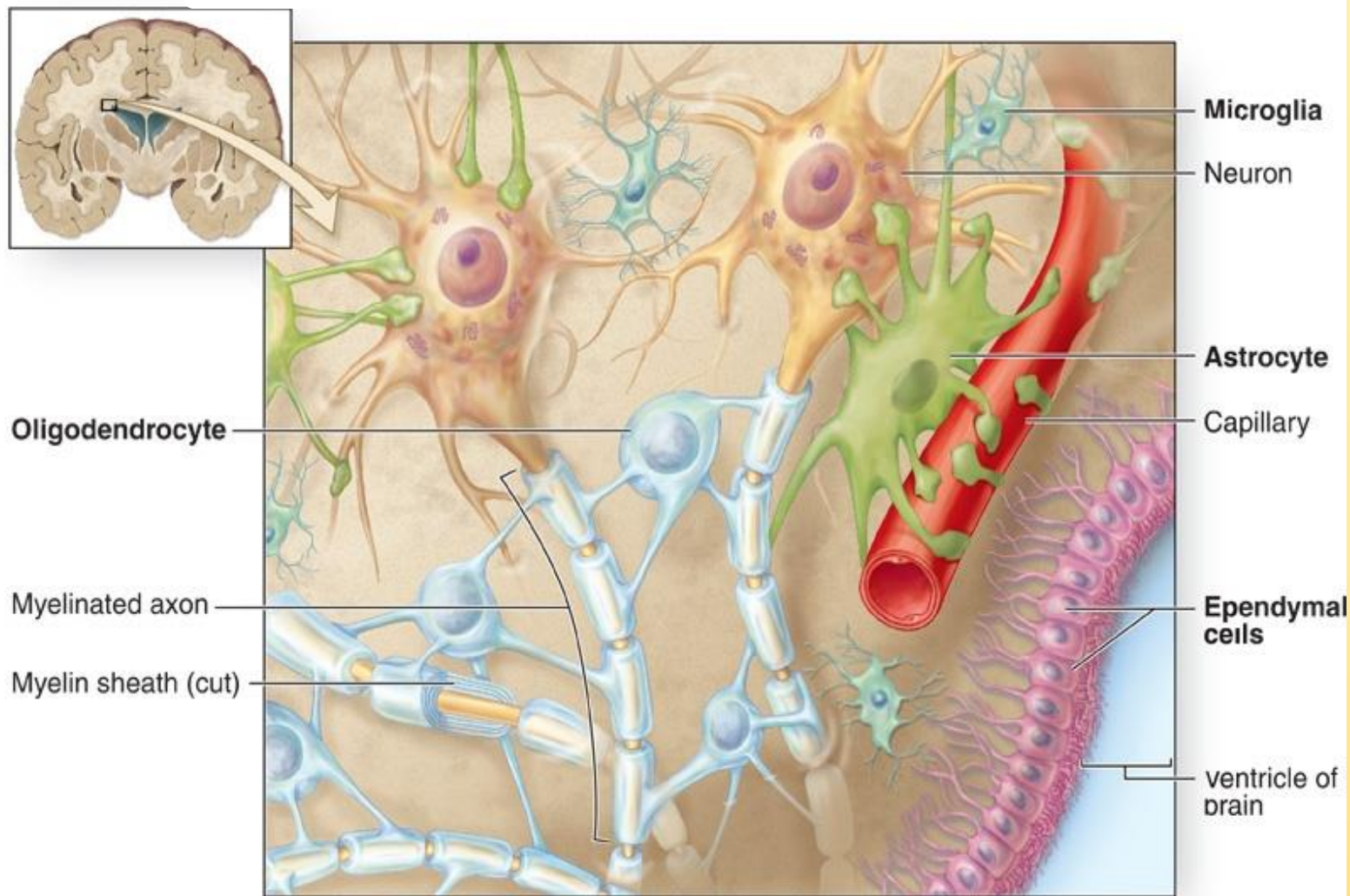


acetylcholin



serotonin

Neurotoxicita V.



Investice do rozvoje vzdělávání



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

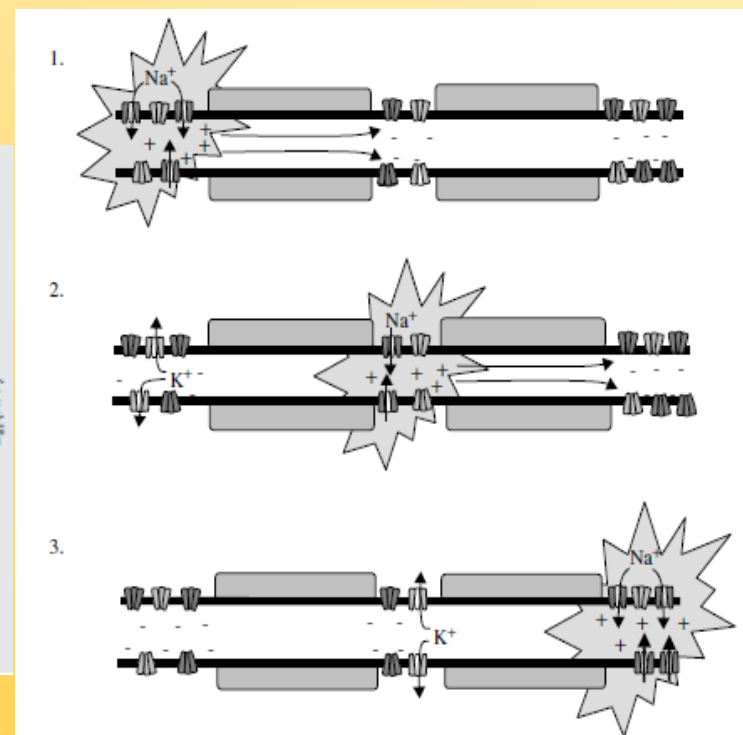
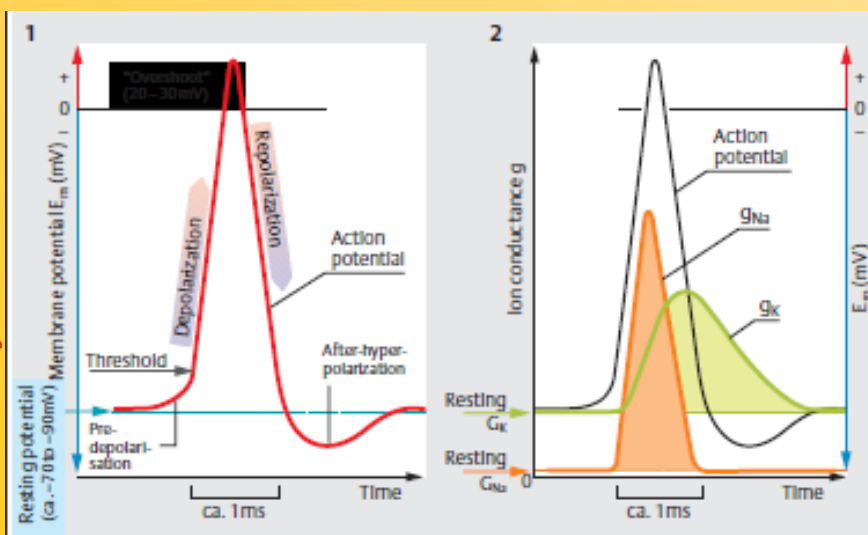
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Neurotoxita VI.

Klidový membránový potenciál - složen z koncentračních gradientů iontů (Na^+ , Cl^- , K^+) – napětově řízené kanály (voltage gated channel)

Akční potenciál = maximální odpověď na otevření napětově řízeného kanálu



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



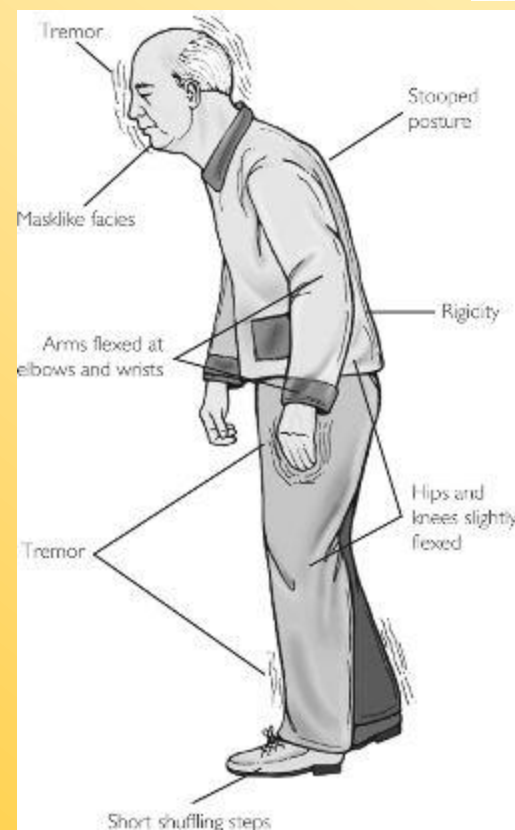
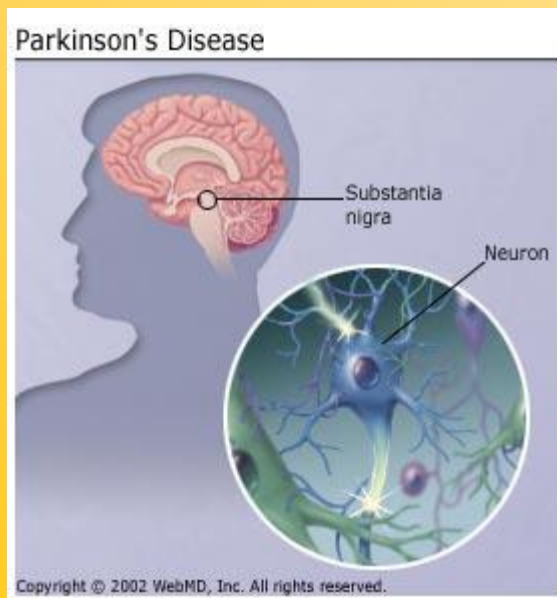
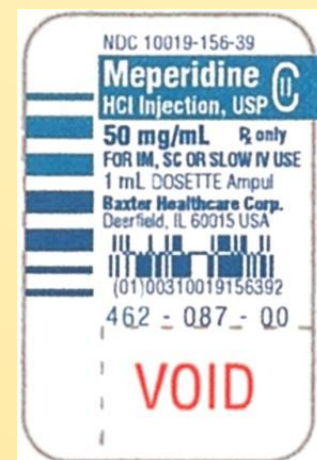
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Neurotoxická VII. - MPTP

- 1976 – syntéza „nového heroínu“ – meperidin
- v důsledku nečistot – symptomy Parkinsonismu
- ➔ Pomalé pohyby, třes, ztuhlé rysy
- Léčba L-DOPA ➔ zlepšení stavu
- ➔ Smrt dopaminergních neuronů (substantia nigra)



Investice do rozvoje vzdělávání

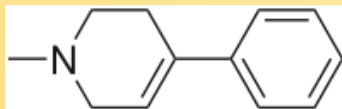


INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

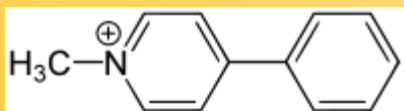
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Neurotoxicita VIII.- MPTP

MPTP (1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin)



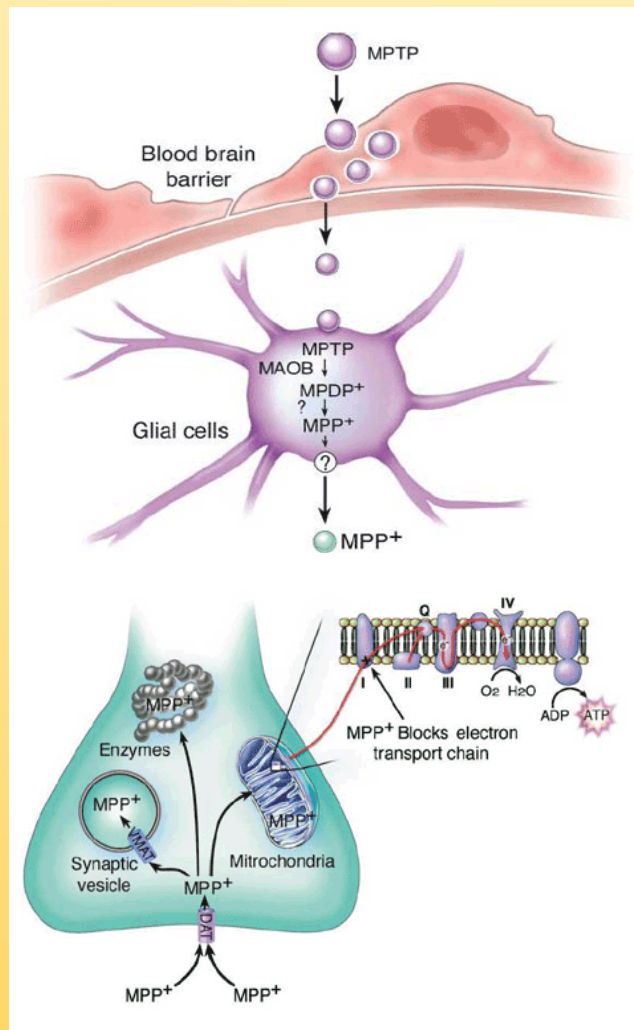
MPP+ (1-methyl-4-phenylpyridine)



MAO-B – monoamin oxidasa –
kritická (zanedbatelná exprese u krys)

DAT – dopaminový transporter –
vysoká exprese v *substantia nigra*

MPP+ - inhibice komplexu I v mitochondriích → **ROS + energetická krize**



Neurotoxická IX.

Typy neuronálních poškození

Demyelinace – svalová slabost, špatná koordinace, paralýza

- hexachlorofen, isoniazid, organotin – narušení integrity integrity myelinové pochvy
- styren, xylen, trichlorethylen (v sušení) – přímo poškozují myelin tvořící buňky
- tellur – inhibice enzymu syntetizující cholesterol
- kyanid, olovo, CO – poškození oligodendrocytů a Schwannových buněk (tvorba myelinu v PNS)



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Investice do rozvoje vzdělávání

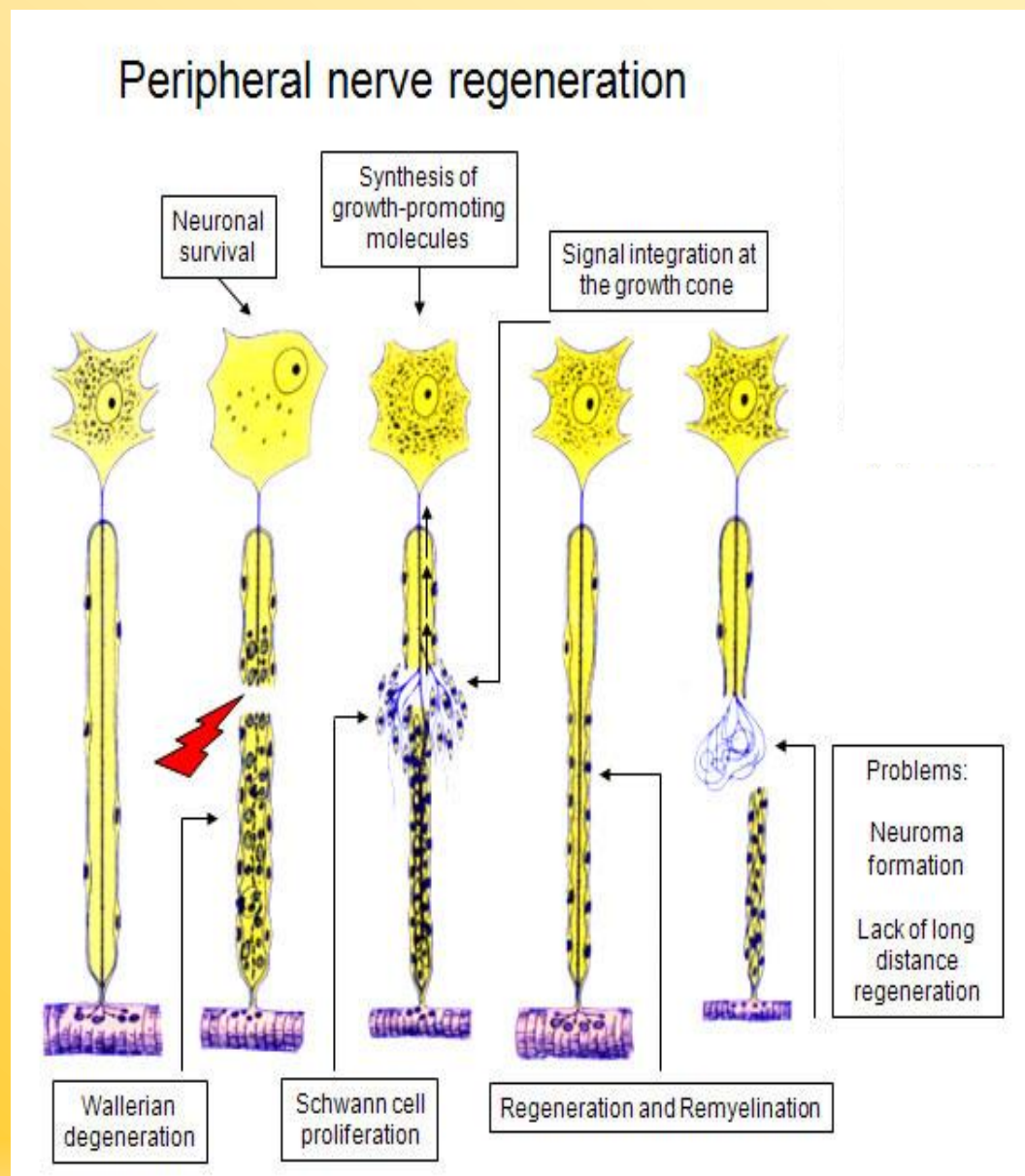
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Neurotoxicta X.

Axonopatie –
degenerace axonu,
tělo intaktní

- senzorické změny
jako první, brnění,
necitlivost

-1850 – Augustus
Waller - sekvence
událostí následující po
přerušení nervového
vlákna = bobtnání,
rozpuštění, proliferace



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



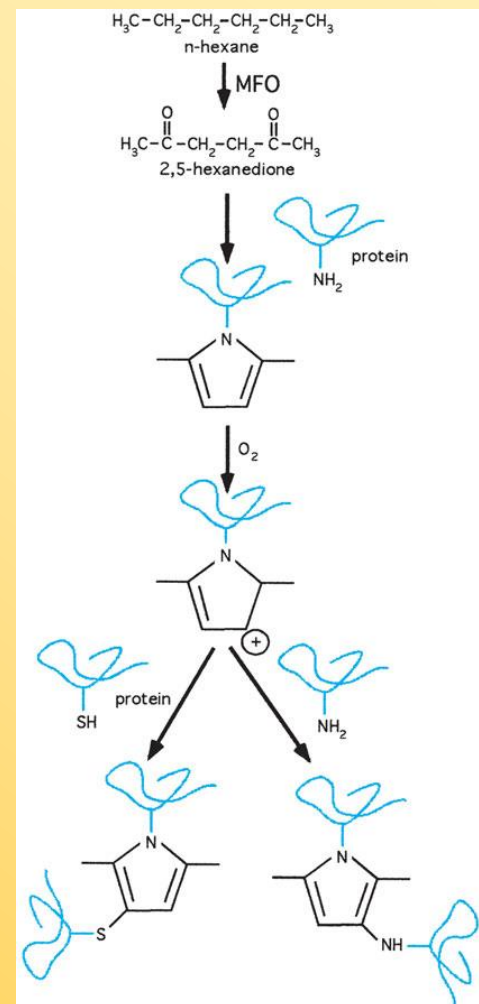
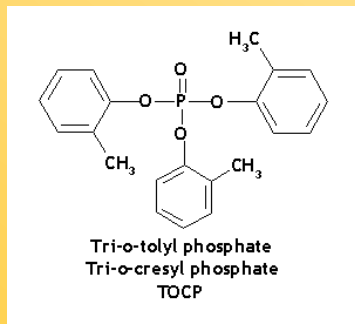
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Neurotoxicita XI. - axonopatie

- **Lyndol** (triorthokresyl fosfát obsahující olej) – padělání Ginger Jake za prohibice v USA



- interference s axonálním transportem
- **vinca alkaloidy** (vinblastin, vinkristin)



- **hexan** – tvorba kovalentních aduktů s neurofilamenty

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

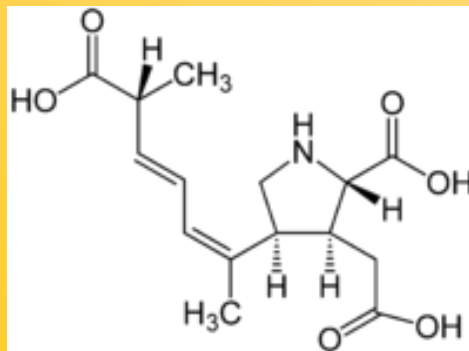
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Neurotoxicita XII.

Neuronopatie – poškození neuronu s primárním zasažením těla – apoptosa, nekrosa

- glutamát a jiné excitační aminokyseliny – aktivace iontových kanálů = influx iontů → zahlcení Ca^{2+} – aktivace signálních kaskád s tvorbou ROS
- kyselina domoová (agonista glutamátového receptoru) – Kanada, 1987, konzumace modrých slávek – smrt, závratě



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

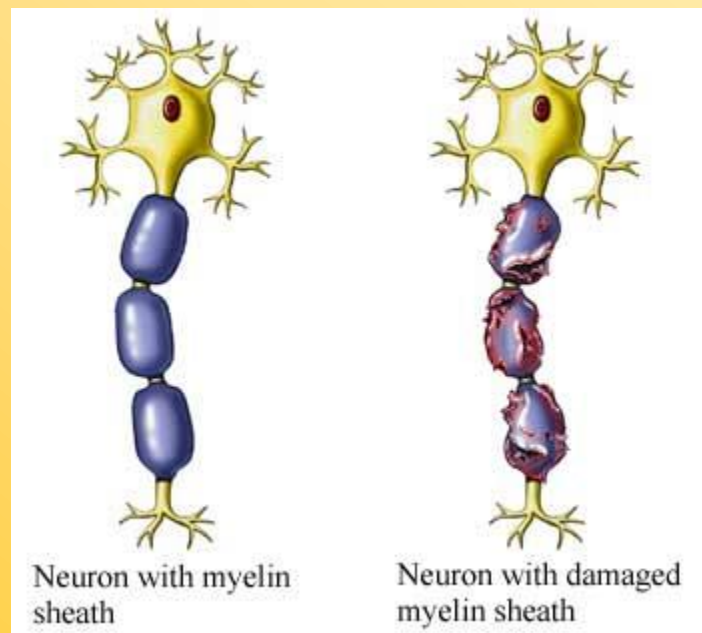
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Neurotoxicita XIII.

Buňky tvořící myelinovou pochvu – syntéza cholesterolu – hydrofobní podstata – skladiště lipofilních škodlivin

-Kovy – Pb, Cd, Al – indukce buněčné smrti v astrocytech

-Methylrtuť (CH_3Hg)– akumulace v astrocytech a mikroglíích – bobtnání – interference s iontovými kanály



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

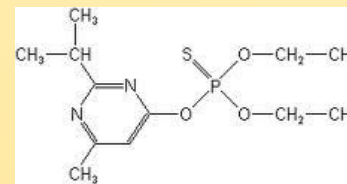
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Neurotoxicita XIV.

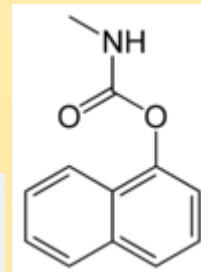
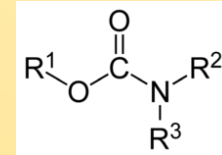
Toxicita na synapsích

- organofosfáty – inhibice acetylcholinesterasy (AChE) kovalentní modifikací serinu v aktivním místě enzymu – stabilní až dny – spontánní hydrolýza – obnovení aktivity

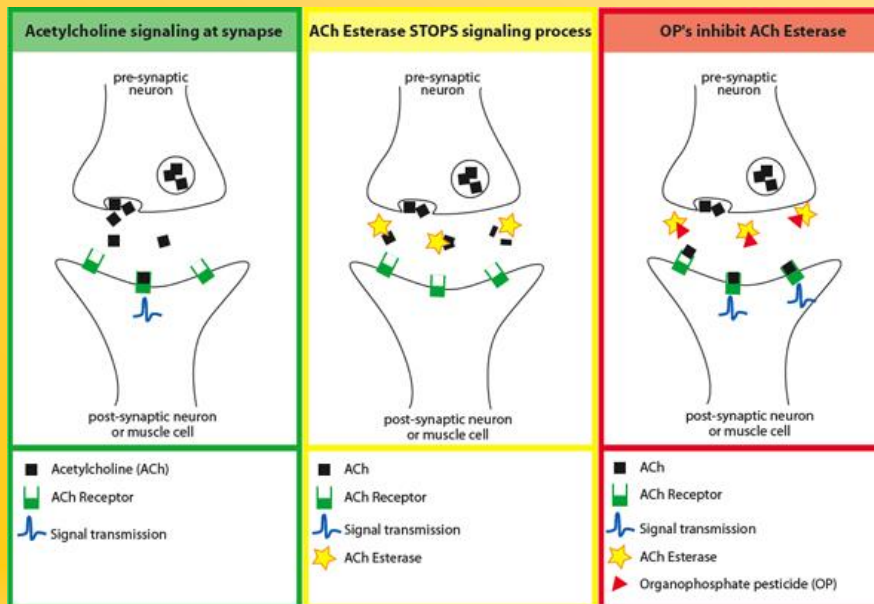
- karbamáty – karbamylace aktivního místa enzymu – spontánní hydrolýza rychlejší



diazinon



Carbaryl

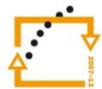


➔ **hypercholinergní aktivita ➔ SLUDGE** (břečka) – slinění, slzení, pomočování, defekace, GI potíže, zvracení (Salivation, Urination, Defecation, GI upset, Emesis)

Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

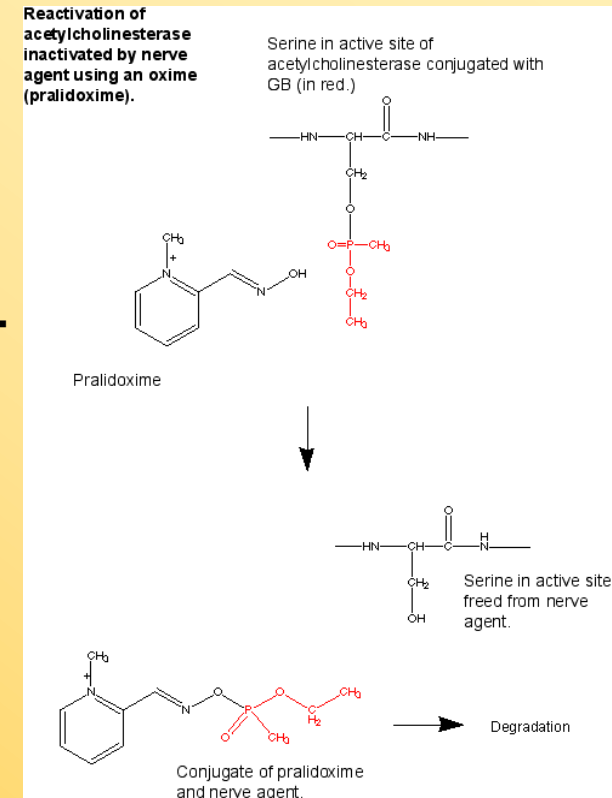
Neurotoxická XV.

Léčba otravy karbamáty a organofosfáty

- atropin – blokáce vazby acetylcholinu na muskarinový receptor – neutralizace cholinergní aktivity – neúčinkuje na nikotinové receptory
- oximové sloučeniny (pralidoxim, 2-PAM) – kvarterní dusík vážící se na místo vazby cholinu – reakce s kovalentní vazbou fosfoserinu a uvolnění fosfátu – administrace brzy po intoxikaci, neúčinné proti karbamátům



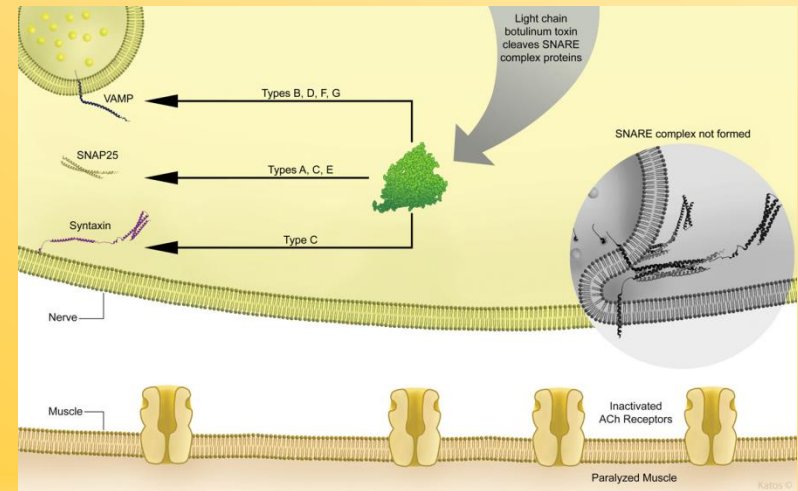
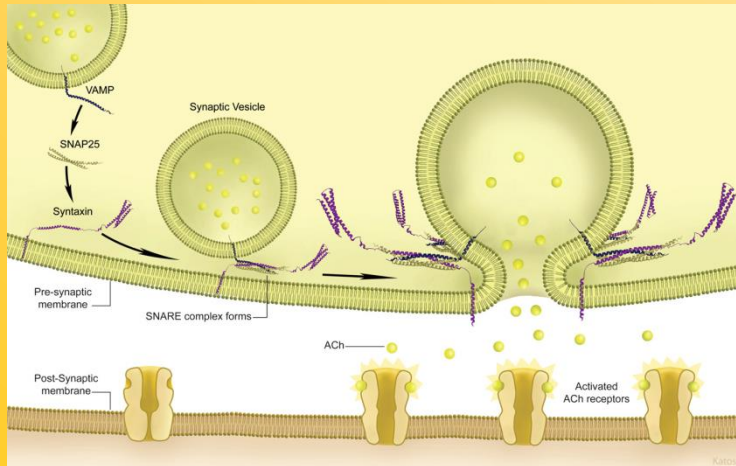
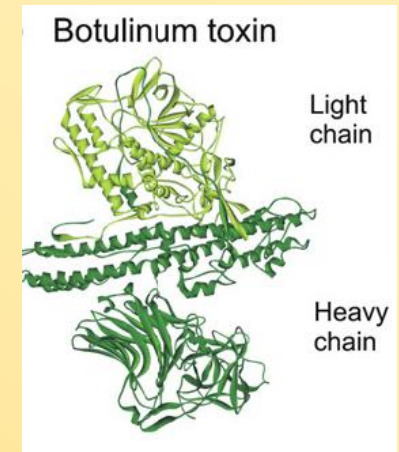
Kit Mark 1



Neurotoxicita XVI.

Inhibice uvolnění neurotransmiteru do synapse

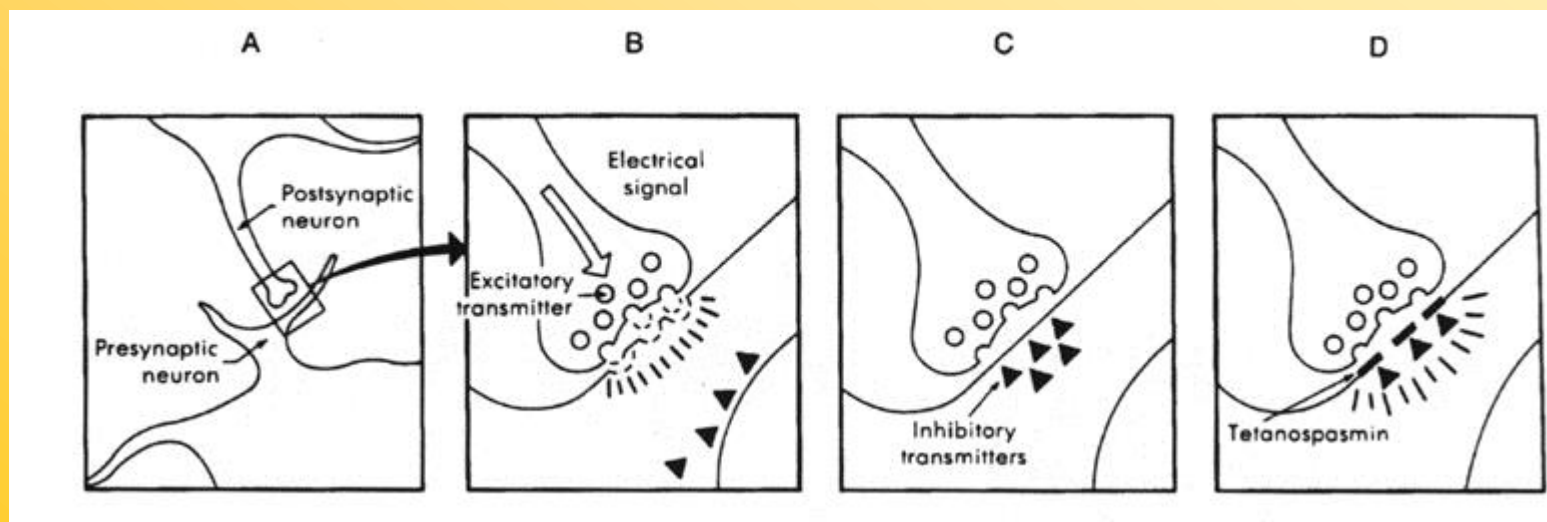
- **botulin** (*Clostridium botulinum*) – proteáza štěpící proteiny zahrnuté ve fúzi synaptických váčků s membránou – nedochází k uvolnění acetylcholinu
→ sval nemůže kontrahovat → paralýza



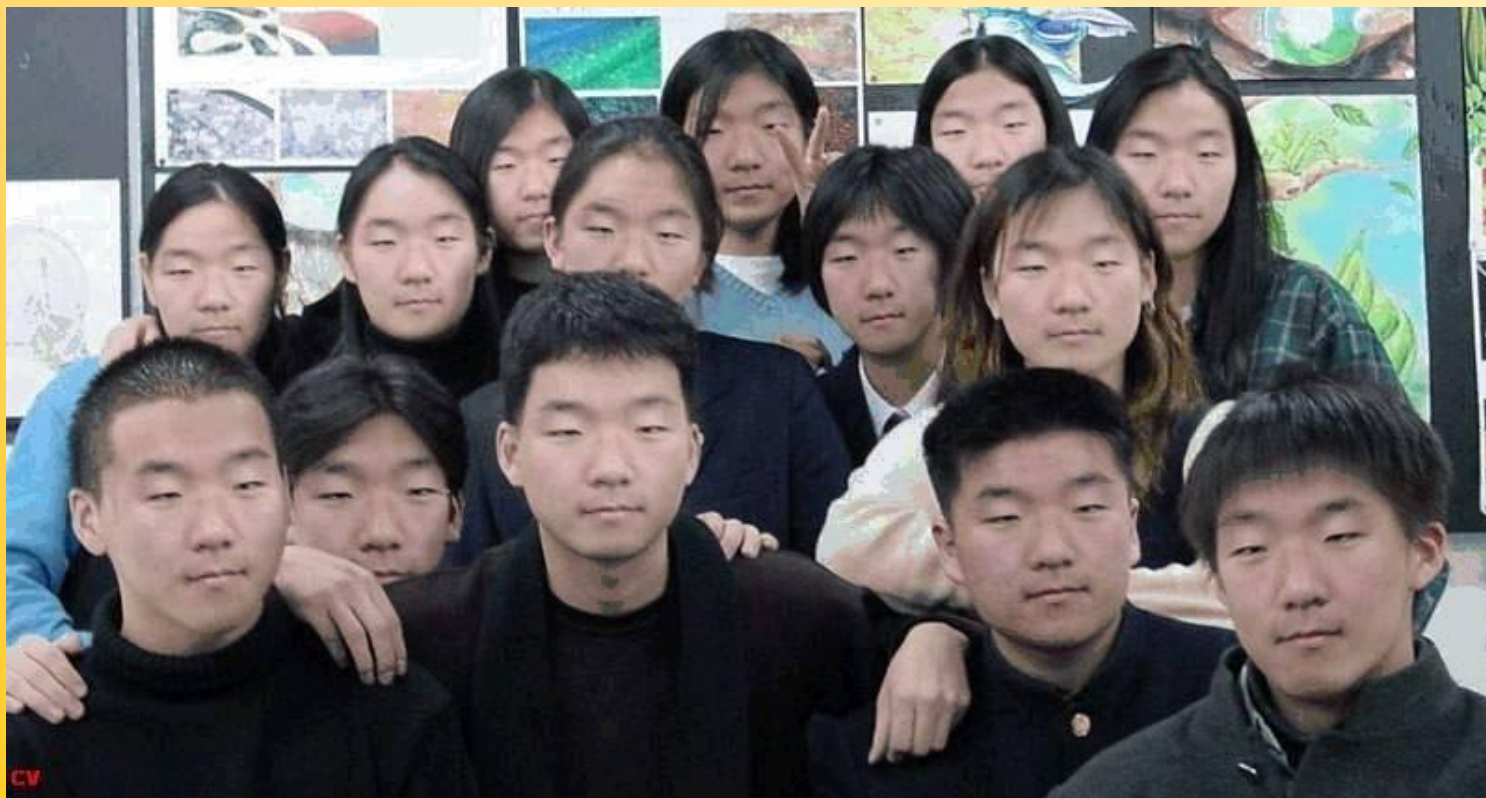
**SNARE komplex = syntaxin +
synaptobrevin + SNAP-25**

Neurotoxicita XVII.

- tetanospasmin (tetanus) – asociace s endosomy – transport do těla neuronu - pak do dendritů kde je uvolněn – zabraňuje uvolnění glycinu a GABA → hyperaktivita → křeče, ztuhlost, celková paralýza



Jak poznáme nepříznivé účinky na CNS ?



Investice do rozvoje vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Testování neurotoxicity

EPA – příručka pro testování v hlodavcích – panel k zhodnocení senzorických, motorických a autonomních reflexů (FOB – functional observational battery)

Domain	Analysis	Test	Task
Psychomotor performance	Motor speed, motor steadiness	Pursuit aiming	Follow a pattern of small circles, placing a dot in each circle around a pattern; subject's score is number of taps in circle within one minute.
	Manual dexterity, hand-eye coordination	Santa Ana Dexterity Test	Perform skillful movements with hands and arms.
Perceptual coding and perceptual motor speed		Wechsler Digit Symbol Test	Each number in a list is associated with a simple symbol. On a list of random digits with blank spaces below them, write the correct symbols in blank spaces as fast as possible.
Attention and short-term memory	Attention and response speed	Simple reaction time	Test reactions of hands or feet from visual and auditory signals.
	Visual perception and memory Auditory memory	Benton Visual Retention Test Wechsler Digit Span Test	Recall and reproduce figures. Recall digits in series forwards and backwards immediately after hearing them.
Mood and affect		Profile of Mood States	Evaluate, by questionnaire, anger, tension, confusion, depression, etc.

Baterie neurobehaviorálních testů dle WHO

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Investice do rozvoje vzdělávání

Testování neurotoxicity

In vivo testy na lidech

- **mentální statut** (uvědomění, orientace, nálada) a **senzorimotorické funkce** (koordinace, reflexy, citlivost na dotek)
- **epidemiologické studie** (neuroimaging, neuropsychologické evaluace) - vyhodnocení chování (nálada, pozornost, paměť)

In vivo testy na zvířatech – použití zvířat, zejména hlodavců

- neurobehaviorální testy (ztráta paměti, motivační defekty)
- motorická aktivita – pohyb zvířete v otevřeném prostoru či bludišti (toluen, chlorované uhlovodíky – změna motorické aktivity)

In vitro Histologie a Neurochemie – doplněk k *in vivo* testům (postmortem)

- sběr tělesných tekutin – hladiny AChE, neurotransmiterů či hormonů, detekce přítomnosti toxikantu v mozkomíšní tekutině
- ztráta imunoreaktivity na tyrosin hydroxylasu se používá k identifikaci dopaminergní buněčné smrti po expozici MPTP



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



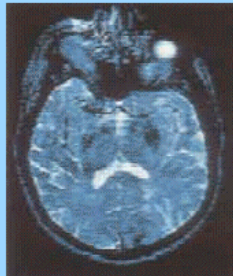
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

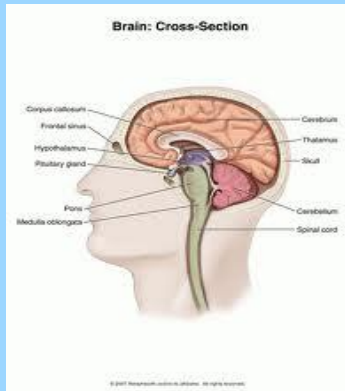
Investice do rozvoje vzdělávání

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Slovo závěrem.....



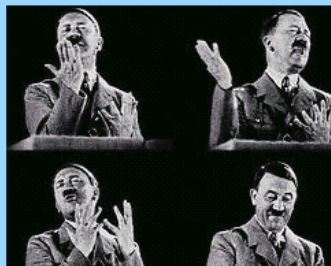
Brain and Nervous System



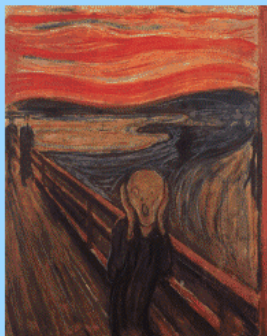
Mate Selection



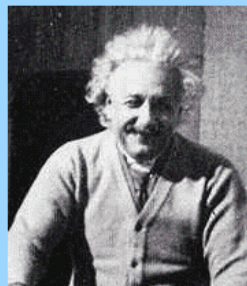
Spoken Language



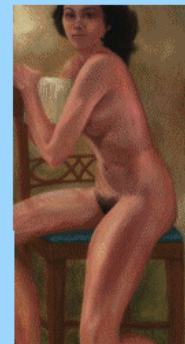
Nonverbal Communication



Miscellaneous Stuff



Consciousness and Intelligence



Gender and the Brain

**Nepochopené
chování nemusí
být nutně
důsledek
intoxikace
nervového
systému ..**



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Investice do rozvoje vzdělávání

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.