KBB/TOX – Toxikologie

(pro navazující studium)

Přednáška č.8 – Látky s nežádoucími vlivy na matku a vyvíjející se plod I.

Radim Vrzal

Katedra buněčné biologie a genetiky

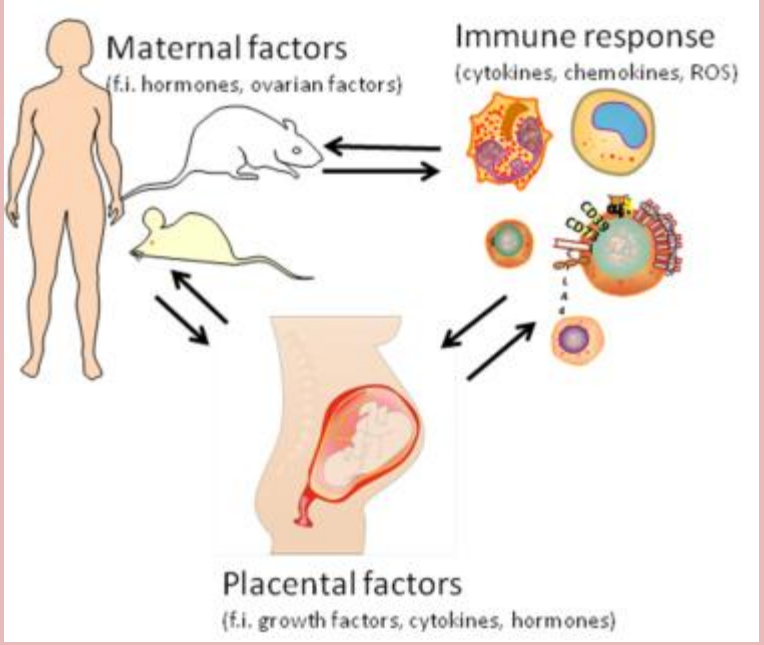
Biokomunikace mezi matkou a plodem

Stav vnějšího prostředí ovlivňuje fetální/neonatální vývoj

- **asociace mezi stravou matky** a nemocemi jako koronární srdeční nemoc, diabetes, hypertenze (hladomor v Holandsku 1944-45 ➔ vyšší výskyt nízké porodní váhy, insulinové resistence, vaskulárních chorob)

- **studie na hlodavcích** = identifikace nutričních, psychických, fyzických stavů ovlivňující neurální vývoj, metabolismus a chování jedinců

- některé **látky přechází placentární bariérou** – např. acyl ghrelin (z matky na plod), oxytocin (z plodu na matku)



➔ **molekulární konverzace mezi matkou a potomkem = biokomunikace**

Biokomunikace mezi matkou a plodem

Nutriční statut – **přejídání**

- Zvyšující se obezita mezi těhotnými ženami **JE** v korelaci s nadváhou jedinců v dospělosti
- **Studie na zvířatech** = obezita a metabolické poruchy způsobují dlouhodobé fyziologické a behaviorální změny u potomků

- **U žen** = hypertenze, gestační diabetes, porodní komplikace
- **Myši na vysokotučné dietě** (HFD) ➔ zvýšená hmotnost, lipidy, volné mastné kyseliny, insulin, glukóza, leptin u potomků – zvýšený transplacentární transport glukózy, neutrálních AK a zvýšená exprese patřičných transportérů
    - **Potomci HFD matek** – zvýšená exprese leptinu a orexigenních peptidů v hypotalamu (galanin, orexin)
    - **HFD** během páření či těhotenství ovlivňuje hipokampus (peroxidace lipidů, pokles postnatální neurogenese), pokles exprese **Bdnf** ➔ **pokles v učení a paměti**

Biokomunikace mezi matkou a plodem

Nutriční statut – **nedostatek stravy**

- Intrauterinní zpomalení růstu (IUGR)
- **U lidí** = nízká porodní váha, riziko emočních a behaviorálních problémů, nízká sociální kompetence, epigenetické změny vedoucí k predispozici k diabetu a kardiovaskulárním chorobám u dospělých
- **Závěry podporovány ze zvířat** – stravovací restrikce v době těhotenství = IUGR, hypertenze, deregulace metabolismu glukózy a insulinová resistence v pozdější době života

Environmentální obohacení

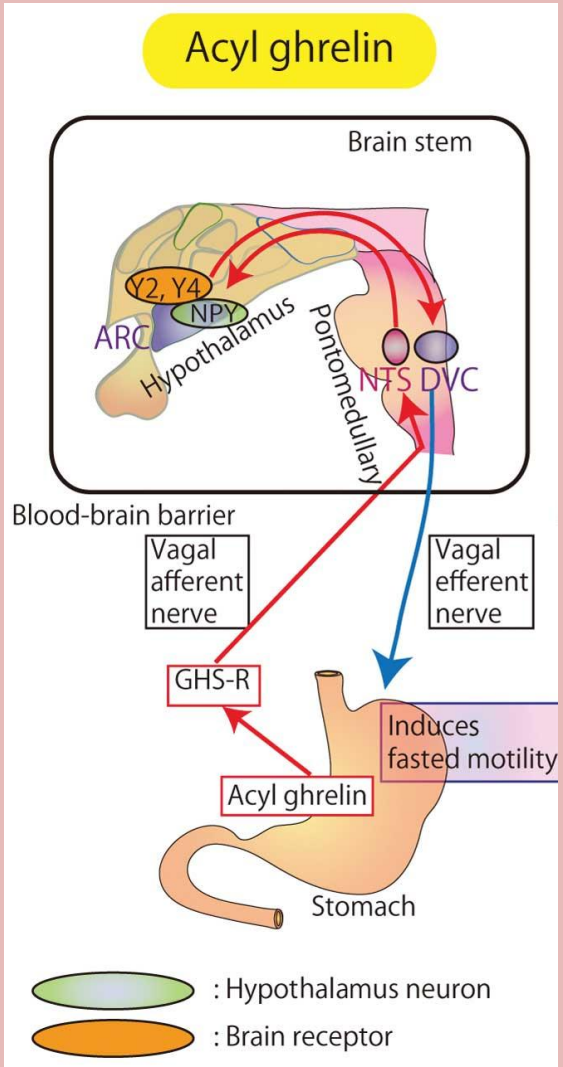
- U hlodavců = velké klece s pohybovými aktivitami pro **senzorickou a poznávací stimulaci** ➔ Zvýšená buněčná proliferace a neurogenese, ovlivnění též potomků = usnadnění schopnosti učení !!!

Biokomunikace mezi matkou a plodem

Transport bioaktivních látek mezi matkou a plodem

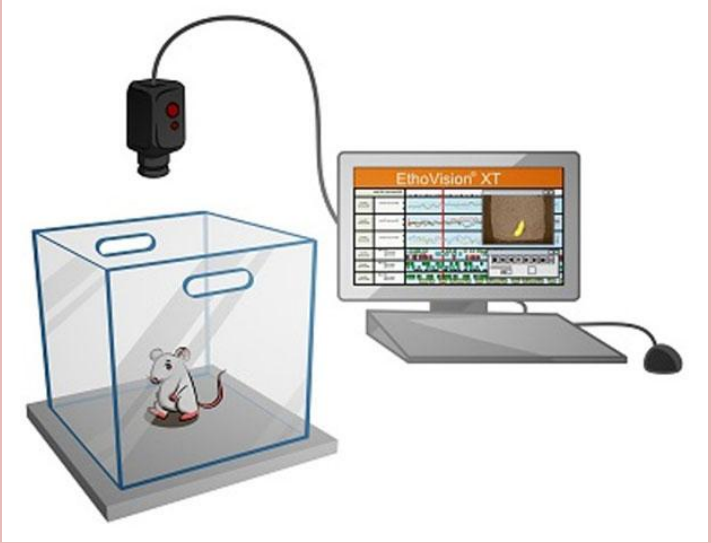
- peptidy, hormony, růstové faktory - transport skrz placentu
- **Acyl ghrelin** - stimulace sekrece růstového hormonu z hypofýzy

  - chronická expozice u těhotných potkanů ➔ nárůst porodní váhy, inhibice deformit fetální neurální trubice indukovaných overexpresí **peptidu YY (PYY)**



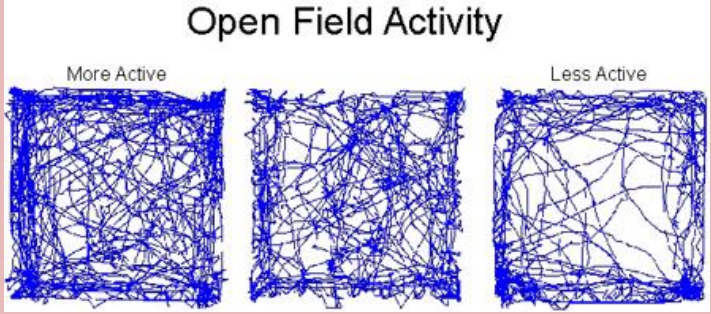
Biokomunikace mezi matkou a plodem

- akutní expozice ghrelinu u těhotných samic potkanů vedla k nižšímu průzkumovému chování potomků podobnému akutně stresovaným myším v testu otevřeného pole (**open field test**)



Bdnf

- Kritický pro regulaci neurálního vývoje
- Přestupuje placentární membránou a přispívá k fetálnímu vývoji



Bioactive substances
Peptides/Hormones
Corticosterone
Ghrelin
Leptin
β-Endorphin
TGF-β1
Digested milk proteins
β-Lactotensin
Casoxin C
β-Casomorphin

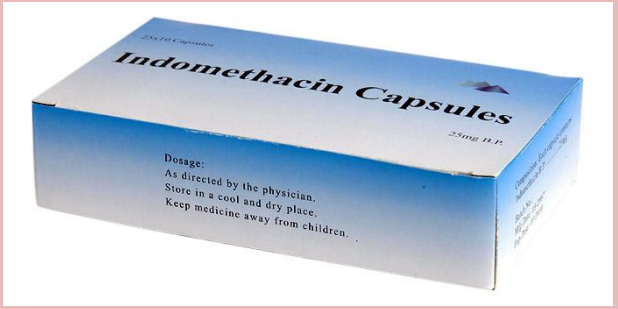
Mateřské mléko

- Růstové faktory, hormony, imunoglobuliny, human milk oligosaccharides (HMOs)
- Studie hlavně z lidí a krav

Léky přestupující do mateřského mléka

Analgetika

- např. ibuprofen, ketorolac, naproxen, indomethacin, morfin, methadon, meperidin, fentanyl
- Ibuprofen, ketorolac – ideální (nízká dávka pro kojence)
- Naproxen – krvácení, anémie u 7-denních dětí (case reports)
- Narkotika (morfin, methadon, meperidine) – u matek závislých ➔ přestup do mléka a vznik „withdrawal syndromu“ (absťák) při přerušení krmení ➔ matky by neměly krmit své děti !!
- Meperidin – změny v neurokognitivních funkcích
- Kodein – sedace, apnoe



Léky přestupující do mateřského mléka

Antibiotika

- Většinou bez vlivu na kojence, zřídka hypersenzitivita, průjem, kandidóza
- Peniciliny, cefalosporiny - stopová množství v mléce, lze očekávat změny v mikrobiomu
- Tetracykliny - nízká biodostupnost díky precipitaci v mléce
- Protiplísňové léky - (miconazol, fluconazol) – nárůst v mléce matky

Steroidní léky

- Vysoká koncentrace v mléce – ethinyl estradiol, mestranol – redukce produkce mléka a hladin pyridoxinu (B6)
- Kortikosteroidy – suprese růstu a interference s produkcí endogenních kortikosteroidů

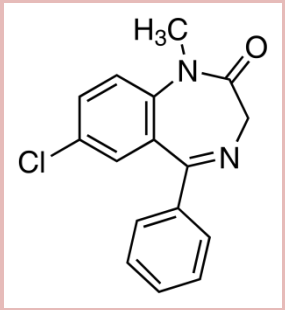
Léky přestupující do mateřského mléka

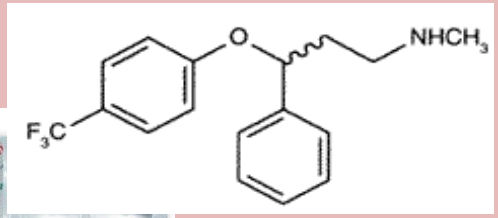
Psychoaktivní léky

- **sedativa a hypnotika** - **benzodiazepiny** – *diazepam* = letargie, ospalost, ztráta hmotnosti; metabolismus diazepamu je pomalý – vznik glukuronidů = kompetice s bilirubinem ➔ hyperbilirubinemie u <1 měsíc starých kojenců

- **fenothiaziny** – chlorpromazin – zvýšení spánkové apnoe a riziko náhlé smrti novorozenců ➔ **vyvarovat se u kojících matek**

- **antidepresiva** – SSRIs – nárůst užití u těhotných či kojících matek – *fluoxetin* – břišní kolika, pláč, zvracení po užívání u kojících matek ➔ u kojenců absťák – nervozita, dráždivost





Léky přestupující do mateřského mléka

Antihypertenziva

- **Beta blokátory** – slabé zásady, liší se v rozpustnosti v tucích a vazbě na proteiny
  - metoprofol, nadolol, acebutolol – nízká vazba na proteiny ➔ difúze do mléka; acebutolol – cyanóza, bradykardie, hypotenze
  - oxprenolol, dilevalol, propranolol – vysoká vazba na proteiny
- **Blokátory vápenných kanálů** – omezené množství důkazů – nitrendipin, nimodipin – minimální exkrece
- **Inhibitory Angiotensin konvertujícího enzymu (ACE)** – minimální množství přenášeno do mléka, liší se ve vazbě na plazmatické proteiny, např. enalapril; krátce působící ACE = bezpečné

Léky přestupující do mateřského mléka

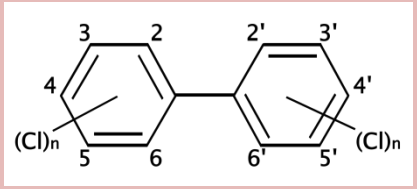
<u>Zakázané léky</u>

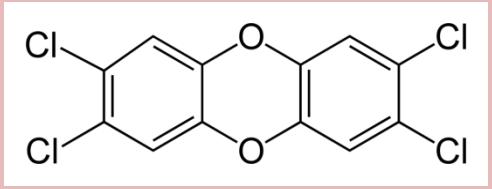
- Neuroleptika – snadný přestup do mozku a mléka – nejnebezpečnější jsou halucinogeny = LSD a Fencyklidin (angel dust, PCP)
- **Kokainem** indukovaná toxicita u 2-týdny starého dítěte = dráždivost, rozechvění, zvracení, průjem
- **Marihuana** – rychlá distribuce do tukových tkání ➔ nízká koncentrace v mléce, možnost oddálení motorického vývoje kojence, ale THC – nemá krátkodobé negativní účinky na zdravá, předčasně narozené novorozence; THC zůstává v mléce až 6 týdnů

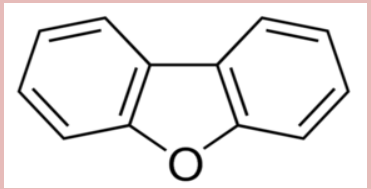
Léky přestupující do mateřského mléka

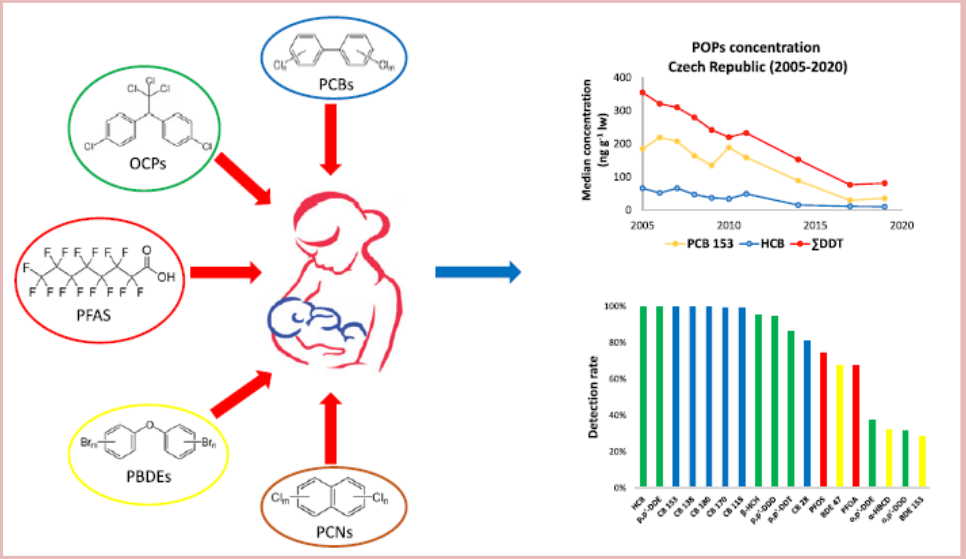
Environmentální polutanty

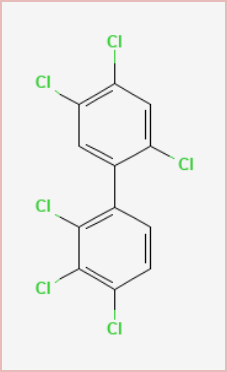
- Jen v případě nadměrné expozice se nedoporučuje kojení
- Nicméně kontaminace mléka je rozšířená a je následek neadekvátně kontrolovaného znečištění prostředí chemikáliemi jako PCB, DDT, dioxiny, dibenzofurany, těžkými kovy
- Nejvyšší hodnoty v zemích nekontrolovaného používání a v odlehlých oblastech závislých zejména na mořské stravě – tuleni, velryby
- Skupina látek vykazující nejnižší bezpečnost ➔nežádoucí účinky u lidí











PCB 138

Assessment of organohalogenated pollutants in breast milk from the Czech Republic, Science of the Total Environment 871 (2023) 161938

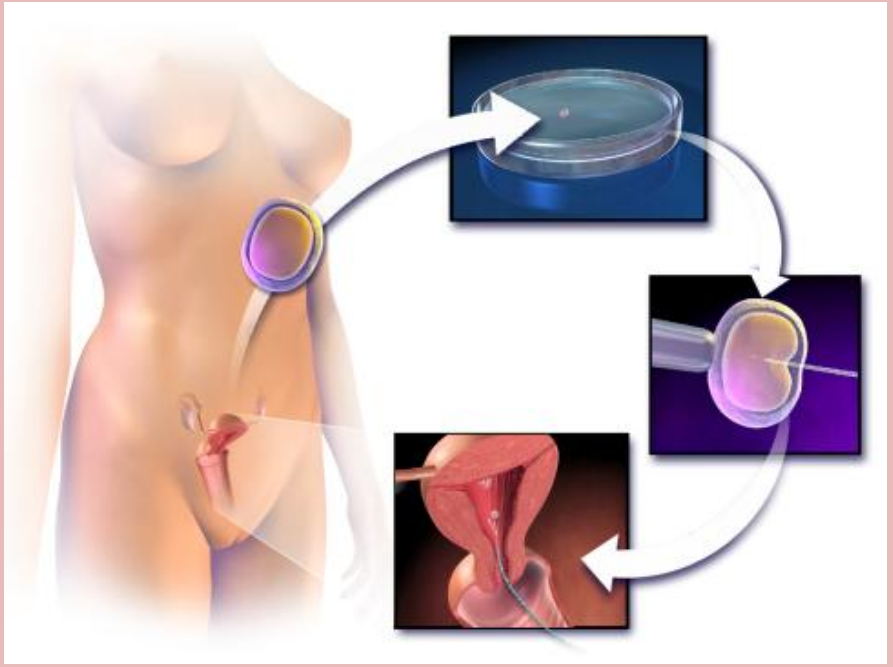
Modely v reprodukční a vývojové toxikologii

Reprodukční toxikologie = nežádoucí účinky buď na plodnost rodičovské generace či na vývoj potomstva

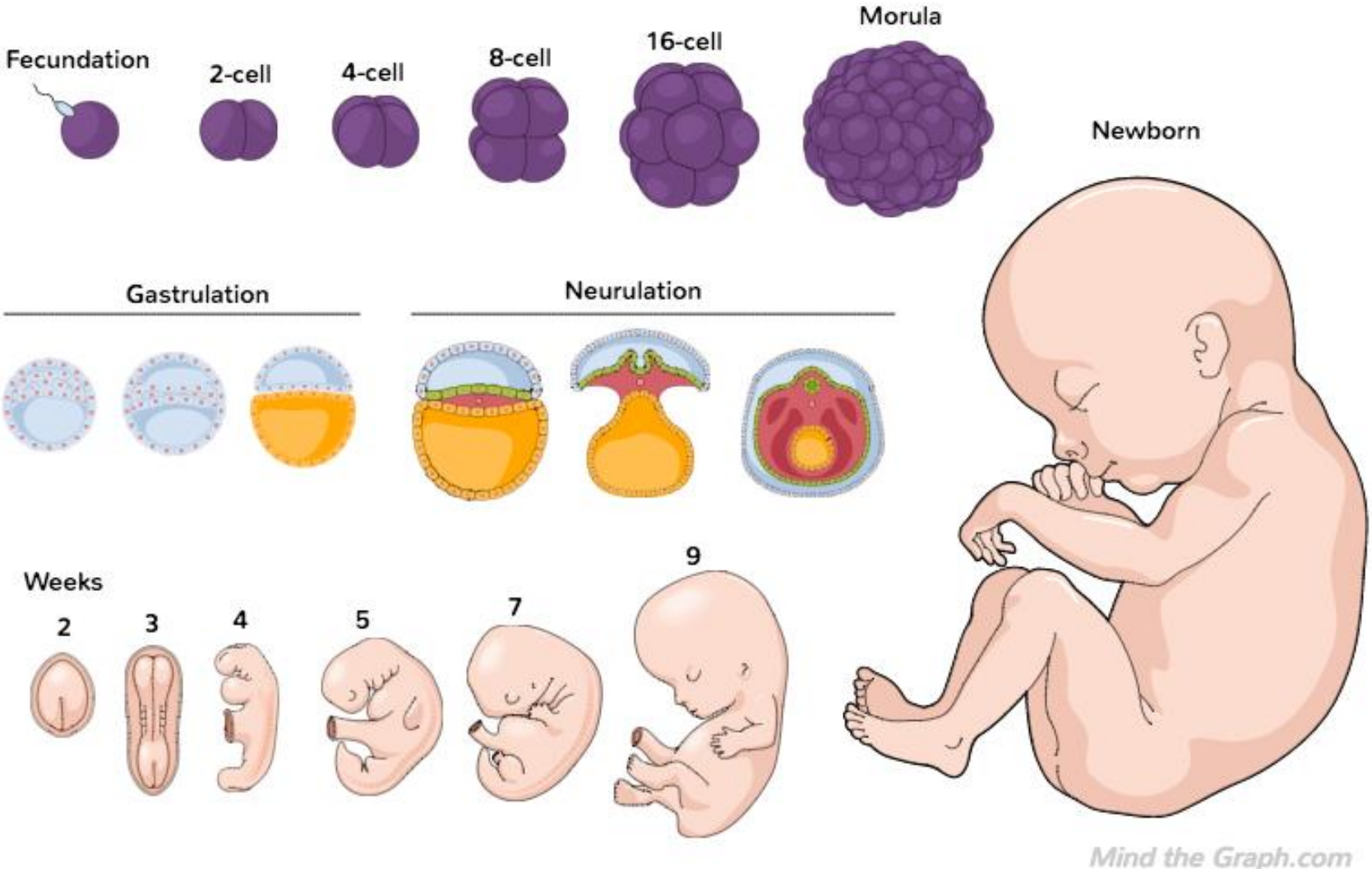
Vývojová toxikologie = nežádoucí účinky na vyvíjející se organismus od doby početí až do pohlavního vyzrávání

Komplexitu reprodukčního procesu nelze studovat *in vitro*!

➔ Rozdělení procesu do několika kroků – zrání gamet, oplodnění, implantace, embryogenese, fetogenese, atd.



Human embryo and fetal development



Modely v reprodukční a vývojové toxikologii

Směrnice ve vyspělých státech – požadavek na *in vivo* metody pro zjištění reprodukční toxicity pro stanovení **odhadu rizik** před uvedením nového léku/přípravku na trh

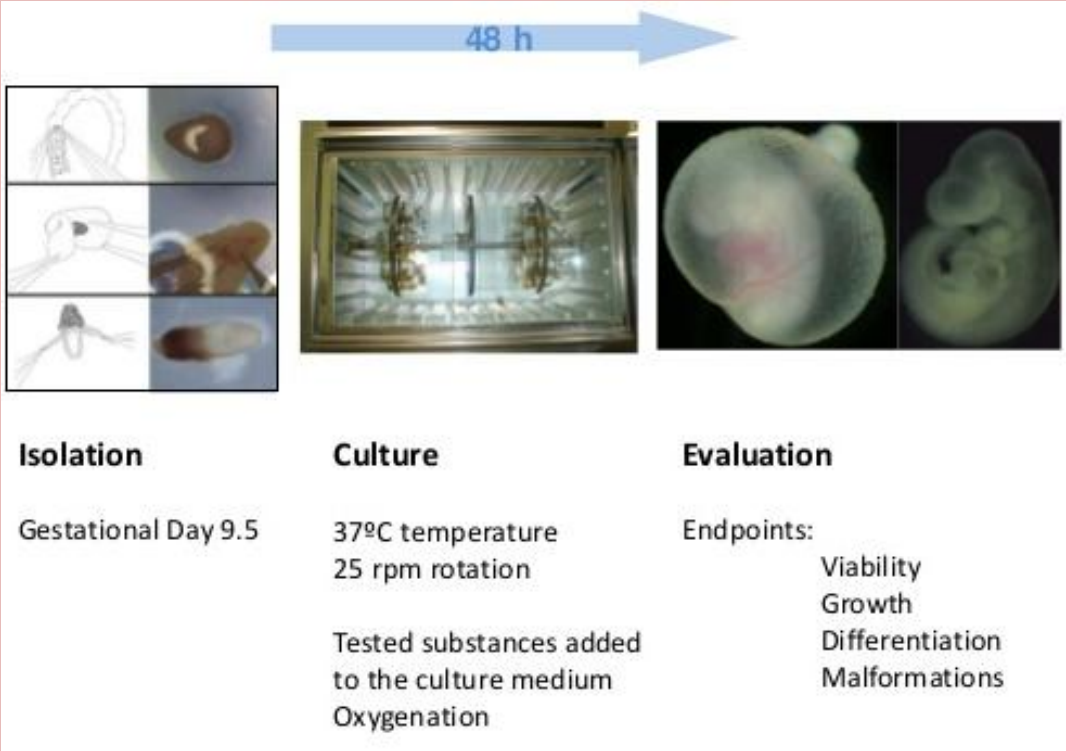
- požadavek cca 150 zvířat (králíci, potkani) na vývojové studie
- Požadavek cca 560 zvířat (potkanů) na screening reprodukční/vývojové toxicity (OECD, příručka 421)
- Požadavek 3200 zvířat na dvou-generační reprodukční studie (OECD, příručka 416)

➔ Dle USA + Švýcarsko (rok 2004) = cena cca **446 000 eur** !!! ➔ nové, rychlé, levné *in vitro* metody by uvítal průmysl (léky, kosmetika, potravní doplňky)

Modely v reprodukční a vývojové toxikologii

Whole-embryo culture test (WEC)

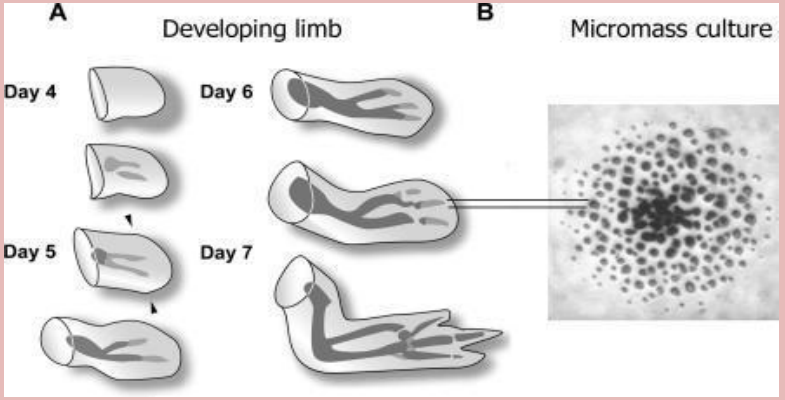
- Snaha identifikace látek způsobujících malforace a je navržena pro užití k testování teratogenicity (OECD, 414)
- Myší/potkaní embrya inkubována 48h v přítomnosti testované látky, následně přeneseno do Petriho misky a stanovují se parametry:



Growth parameters	Malformations (0 for normal/1 for malformed)
Yolk sac diameter (mm)	Yolk sac vessel defect
Crown–rump length (mm)	Allantois not fused with ectoplacental cone
Head length (mm)	Allantois large size
Functional parameters (1 for normal/0 for abnormal)	Flexion deficient
	Pericardiac sac wide, filled with fluid
Yolk sac circulation	Heart ventrally turned
Allantois circulation	Posterior neuropore open
Heartbeat	Dorsal midline irregular
Somite development	Prosencephalon open
Final somite number	Rhomboencephalon narrow
Final–initial somite number	Cranial neural folds suture line irregular

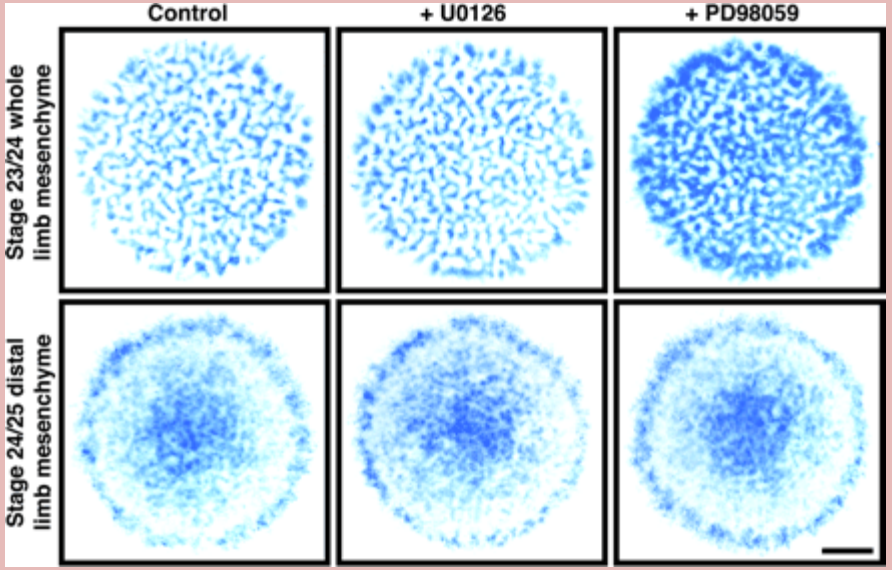
Positivní kontrola – 5-fluorouracil
Negativní – penicilin G

Modely v reprodukční a vývojové toxikologii



The micromass test (MM)

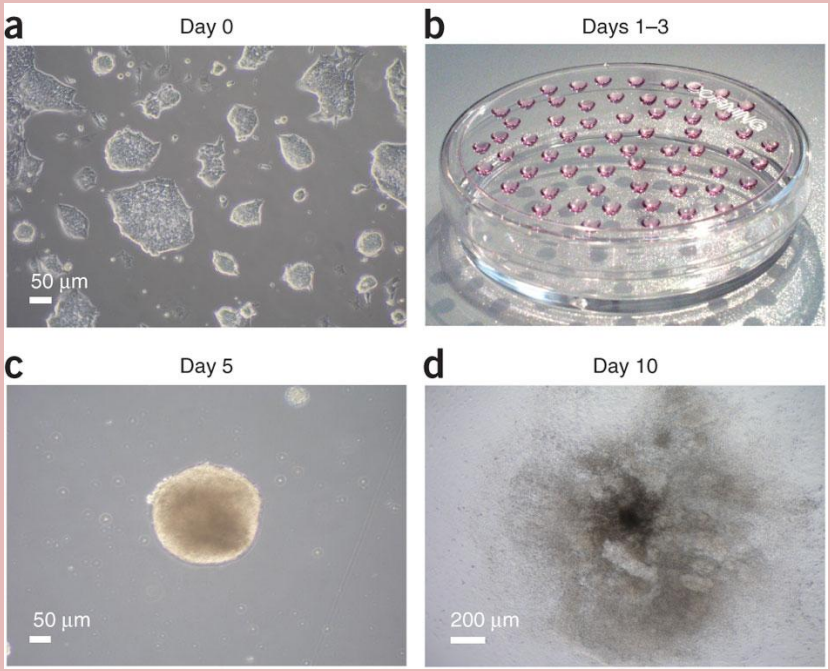
- Používá potkaní kultury končetin a detekuje inhibici buněčné proliferace a differenciace (parametry teratogenicity)
- Založeno na schopnosti primární kultury buněk končetin tvořit chrupavku v procesu histogeneze – základní krok v morfogenesi kostry
- Embrya ve 14dni gravidity potkanů Wistar a izolují se buňky tvořící končetiny – vysetí na 96 desku a kultivace s testovanou látkou po dobu 5 dní – počet buněk barven alciánovou modří



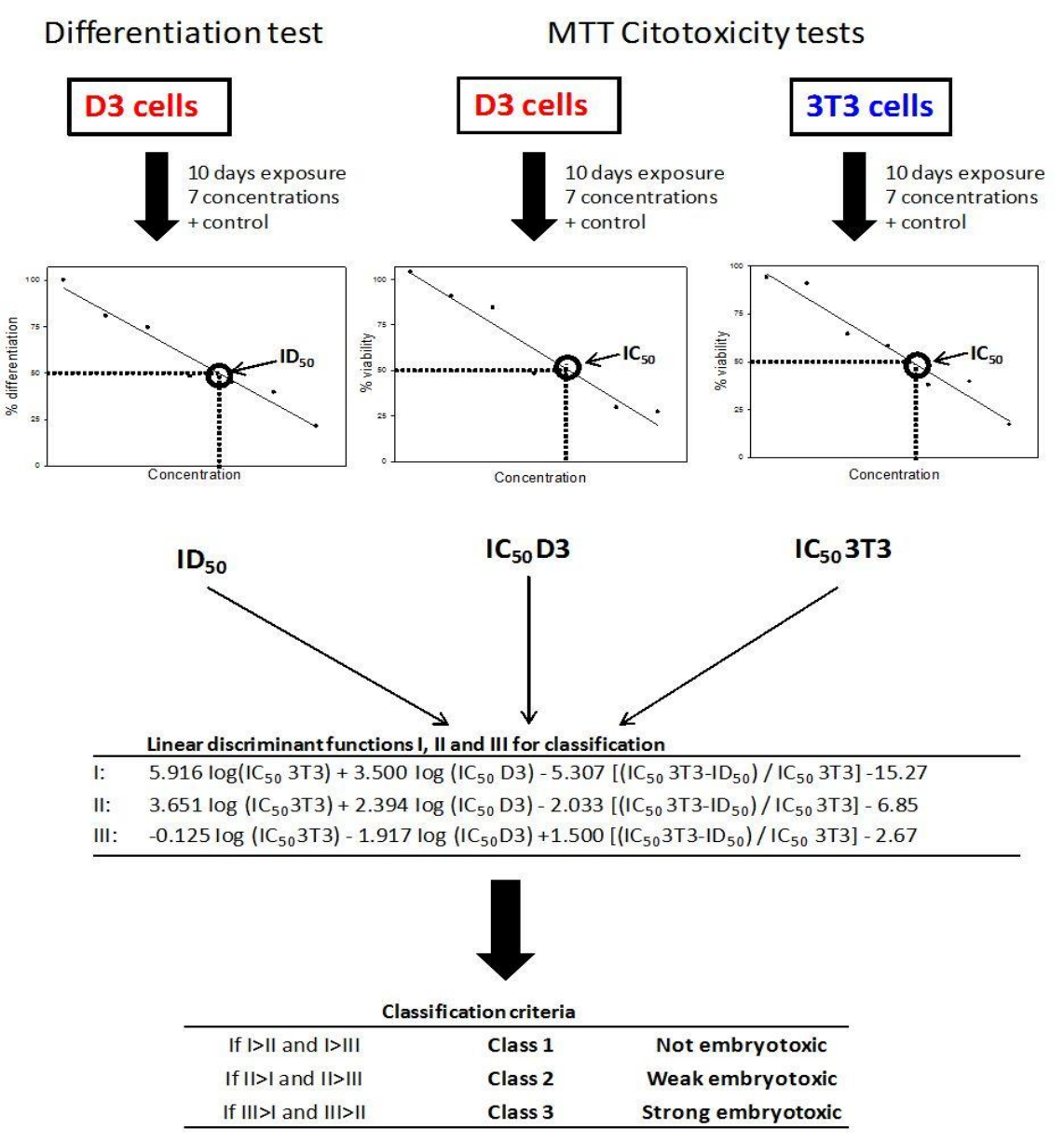
Modely v reprodukční a vývojové toxikologii

The embryonic stem cell test (EST)

- Zhodnocení inhibice differenciace myších embryonálních buněk a rozdílu v citlivosti mezi embryonálními a dospělými buňkami vůči toxickému působení
- D3 linie = embryonální tkáň (nediferencované stádium v přítomnosti leukémia inhibičního faktoru)
- 3T3 linie = dospělá tkáň – myší fibroblasty
- **Úplná eliminace užití zvířat** !!!!
- D3 buňky v objemu 20ul na víčko Petričky – inkubace 3 dny a přeneseny na menší Petričku s médiem a testovanými sloučeninami, 10-tý den – embryonická tělíska diferencována do kontraktilních kardiomyocytů a počet bijících tělísek je vyhodnoceno pod mikroskopem (přijatelná když 21/24 embryí bije !!)



Modely v reprodukční a vývojové toxikologii



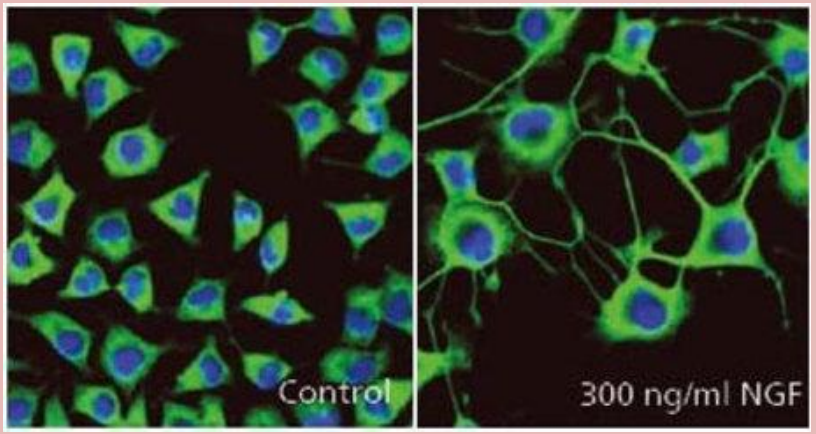
In vitro biomarkery pro vývojovou neurotoxicitu

In vitro modely : transformované buněčné linie, fetální či neonatální primární buňky, embryonální kmenové buňky, mozkové buňky z potratových plodů

- Komplexní procesy, které lze modelovat – **proliferace, apoptóza, diferenciace, synaptogenese**

Růst neuritů

- Marker neuronální diferenciace – morfologický marker sledovaný pomocí mikroskopu
- Primární neurální buňky, neurotypické linie
- Závisí na zvoleném modelu (kultuře) a na stádiu expozice neurotoxikantu
- (např. CH_3Hg – inhibice růstu neuritů)



Apoptóza a buněčný cyklus

- Kaspáza 3, Ca^{2+}, GSH, změna v délce buněčného cyklu
- (např. CH_3Hg – dle typu buněk – indukce apoptózy či nekrózy)

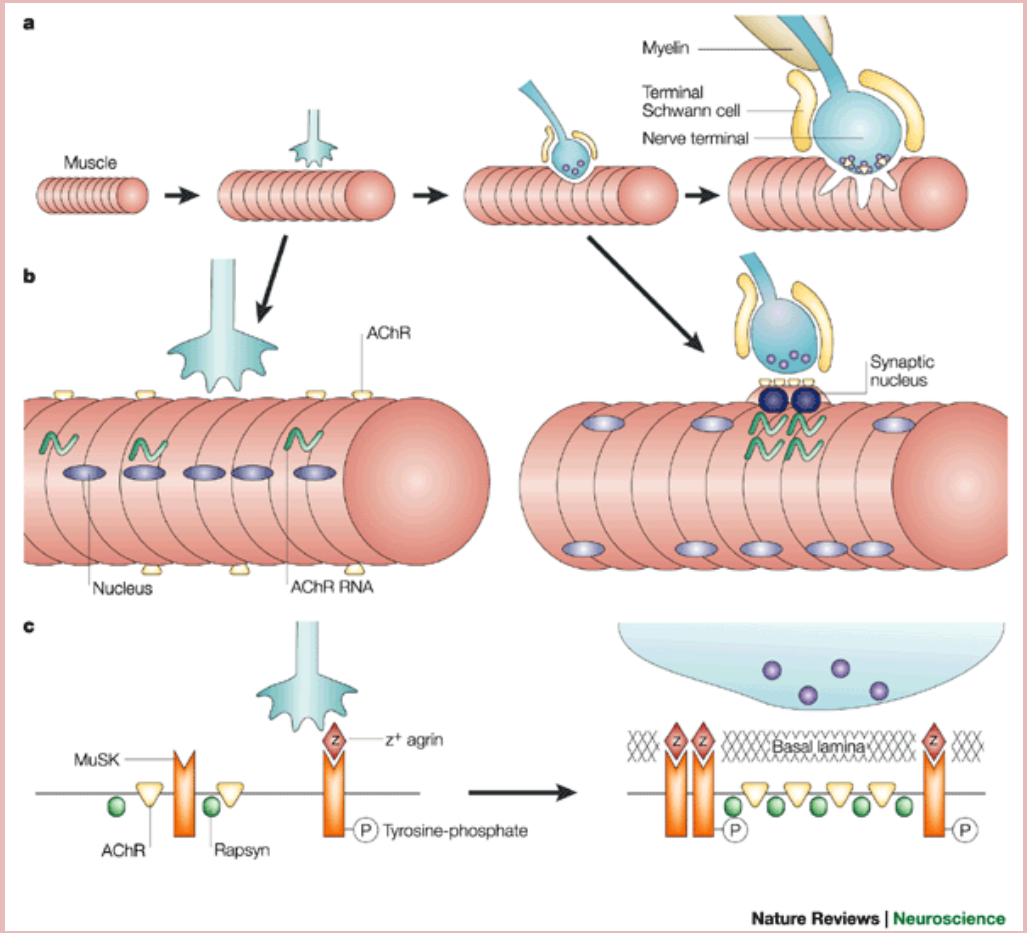
In vitro biomarkery pro vývojovou neurotoxicitu

Neurotransmise/synaptogenese

- syntéza, skladování, uvolnění, vazba na receptor, degradace – procesy blízko synapsi (např. CH_3Hg – zvyšuje uvolňování neurotransmiterů)

Cytoskelet

- Regulace mitózy, buněčná diferenciace, migrace, růst neuritů (např. CH_3Hg – narušuje tvorbu mikrotubul)



Vývojová toxicita nanočástice

Nanotechnologie – materiály, zařízení, systémy vykazují jedinečné fyzikálně chemické vlastnosti

Nanočástice - diagnostické, terapeutické pomůcky

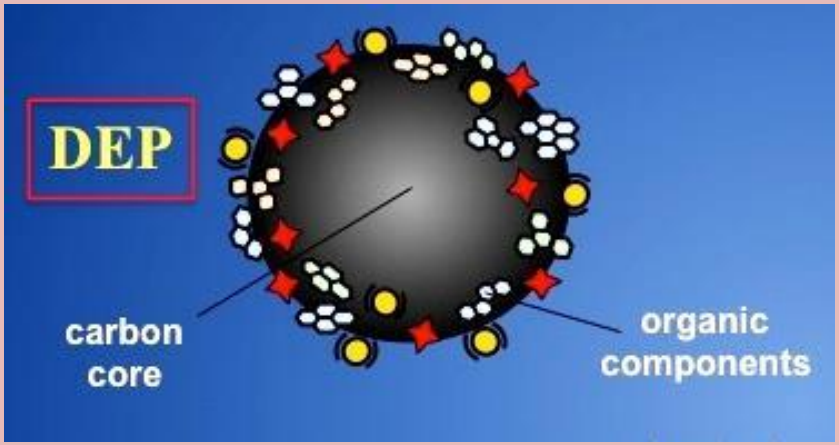
- anorganický materiál, polymerizované či kondenzované uhlíkaté struktury od kulatých částic až po válcovité nanotrubičky

Živá buňka = 5-20µm ➔ organely menší a proteiny srovnatelné s velikostí uměle syntetizovaných částic ➔ sondy k prozkoumání buněčné mašinérie NEBO narušení vysoce koordinovaného a kompartmentalizovaného systému

Nanotoxikologie – odvětví studující interakce zkonstruovaných nanomateriálů s buněčnými a extra buněčnými „nanostroji“, což může vést k interferenci a narušení normální funkce a organizace

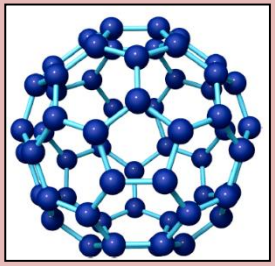
- Vedle velikosti – nezvyklé elektronické tendence – darování, přijímání elektronů

Přirozené nanočástice – částice z výfukových plynů (DEP)

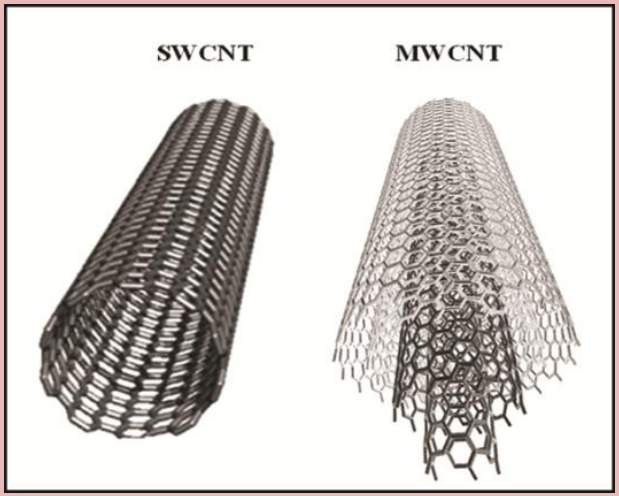


Vývojová toxicita nanočástice

Charakterizace dle tvaru, velikosti, povrchového náboje, chemického složení.



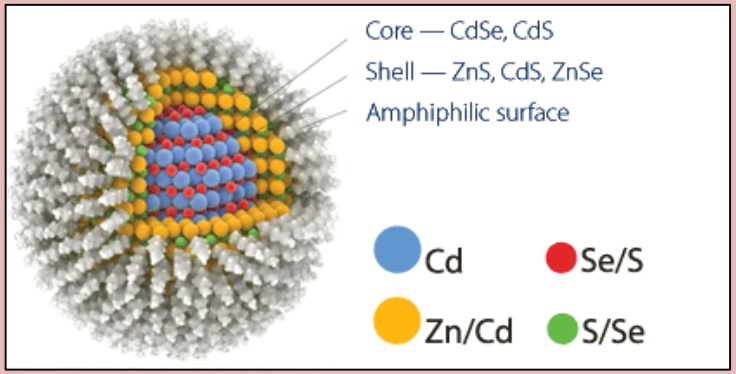
Uhlíkaté nanočástice – fullereny – na uhlíku založené alotropy s tvary koulí, trubiček, rovin, obsahují od 28-100 atomů uhlíku, nejstudovanější C60 (buckyballs)



Uhlíkové nanotrubičky (CNT) = fullereny ve válcovité podobě (někdy též buckytubes) - vysoká pevnost v tahu, vysoká vodivost, flexibilita, vysoká adsorpční kapacita – využití – kosmetika, potravní doplňky, stavební materiály, elektronika

Kvantové tečky – nanokrystalové polovodiče, které emitují či absorbují světlo dle jejich velikosti – většinou z kovů skupiny II-VI (InAs, InP, GaAs, ZnSe, ..)

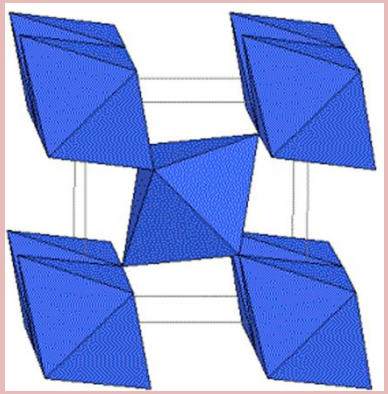
- polovodiče, isolanty, magnetický materiál , fluorescenční sondy

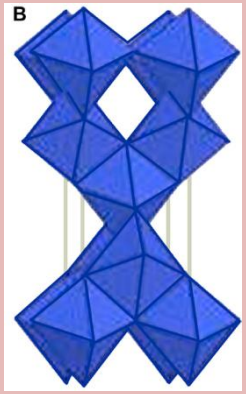


Vývojová toxicita nanočástice

Anorganický materiál

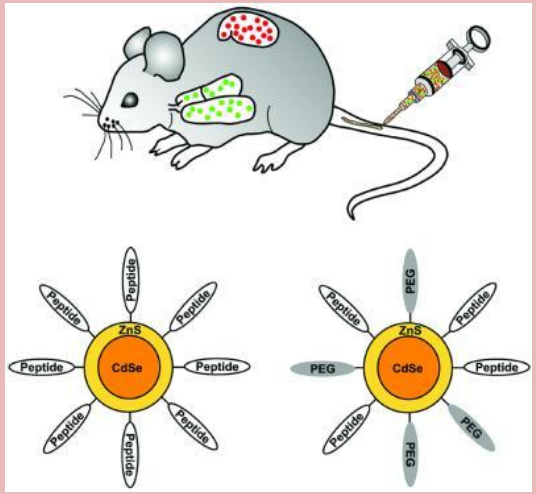
- Částice mající alespoň v jednom rozměru rozměry v řádu „nano“ – primárně jsou to kovy, oxidy kovů – Au, Al, Ag, W, Ti, Cu, Mn





Nano-TiO_2 – ***rutil*** (vlevo) - fotoreaktivní, ***anatáza*** (vpravo) – více fotokatalytická

TiO_2 – tvorba ROS pod UV světlem = **samočistící** sklo / **fasáda**, nízkonákladové solární panely, environmentální sanace, čištění vod



Využití v detekci rakoviny, léčby rakoviny, buněčného zobrazování

Vývojová toxicita nanočástice - specifika

Jedinečné redoxní charakteristiky ➔ iniciace vzniku ROS

- Vysoký požadavek na O_2 = mozek ➔ náchylnější k oxidativnímu poškození
- Nesoulad v antioxidační kaskádě při přechodu z intrauterinního do postnatálního vývoje !!!
- Faktory relevantní pro ROS aktivitu nanočástic – **přítomnost kovů**, zdroj oxidujících ekvivalentů
- Byla pozorována akumulace oxidovaných proteinů, DNA, lipidů - prohloubení a asociace s pulmonálním edémem u myší na stravě chudé na Vit E po inhalaci jednostěnných uhlíkových nanočástic !!!

Vysoká perzistence

- Nedegradovatelný materiál se může akumulovat uvnitř buněk
- *CNTs* přežívají v makrofázích v slezině
- Expozice *TiO_2* během gravidity samic myší ➔ shluk částic v mozku a varlatech u potomků až do 6 týdnů od narození
- *Porézní SiO_2* – samodestrukce u myší do renálně odstranitelné komponenty
- CNT – degradace lidskou myeloperoxidázou u neutrofilů

Vývojová toxicita nanočástice

Faktory ovlivňující expozici nanočásticím

- Nejistota vyplývá z **nedostatku znalostí** fyzikálně chemických charakteristik pro materiál vstupující hlavními cestami – plícemi, GIT, kůží
- **Tvorba shluků** (aglomerátů) či vazba na částice v pozadí ➔ změna vlastností
- Ovlivnění vstupu a i mechanismů toxicit ???

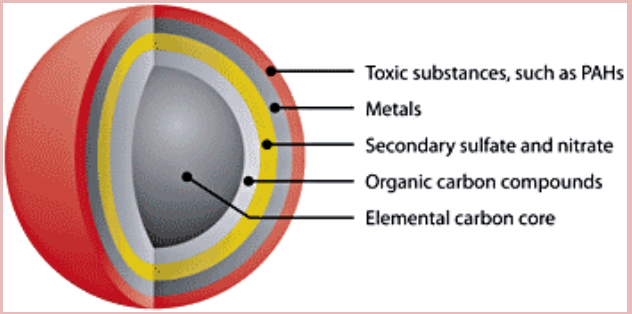
Přestup přes biologické bariéry

- Předpoklad, že menší částice přecházejí snáze
- Translokace z místa vstupu (plíce) do dalších orgánů (jater)
- Záleží na složení a velikosti částic – 20 vs 80 nm částice Ir , méně významné pro uhlíkové nanočástice
- Ultra jemné částice = mozek !!! ➔ a) dostupnost léčiv, b) neurodegenerace
- Přestup i přes placentu – těhotné myší (SC 0.1mg denně TiO_2– 20-70nm➔ shluky 100-200nm ve varlatech potomků)
- Někdy množství než velikost částic určuje přestup – 30nm (Au) vykazují vyšší clearence než 5nm
- Placentární buňky internalizují nanočástice, záleží i na době, kdy je matka exponována

Vývojová toxicita nanočástice

Toxické účinky

- Částice výfukových plynů – uvolnění asociovaných PAH a vstup do plodu
- Kvantové tečky – uvolnění Cd
- Nepřímé ovlivnění – **indukce zánětu** u matek ➔ potomstvo citlivější na **alergie**
- Karcinogenicita – indukce zánětu a následně nádorů pro CNT (MWCNT)



- Fetální vývoj neovlivněn při prenatální expozici inhalovaným nanočásticím !!
- **Vyjímka**: fullereny v gestačním dni 10 (IP) – distribuce do žloutkového vaku a celého plodu ➔ smrt

- **CNS** – expozice TiO_2 (0.1mg) – SC injekce – nálezy v mozku s aktivací apoptózy

- **Testikulární systém** – internalizace TiO_2, snížená produkce spermií v přítomnosti uhlíkových nanočástic

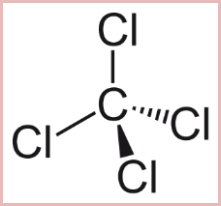
- **Imunitní systém** - mateřská expozice nanočásticím (TiO_2) stimuluje imunitní systém u potomků

Závěr:

- potenciál ovlivnit reprodukci a vývoj
- Malforace či fetotoxicita není hlavní manifestace
- Ovlivnění funkcí u potomků i s opožděným nástupem

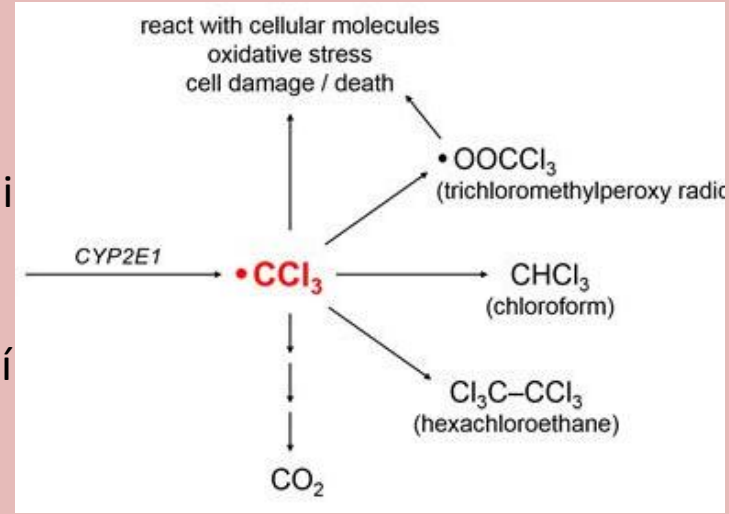
Toxická rozpouštědla a plyny

CCl_4



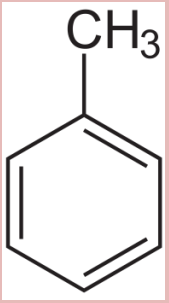
- Bezbarvá, vysoce těkavá kapalina s nasládlým zápachem
- Teplem se rozkládá na fosgen
- Na výrobu fluorochlorouhlovodíků, proti parazitům, insekticid, do hasících přístrojů (dříve)

- **Rychlá absorpce plícemi**, GIT – následně rychlá difúze do orgánů
- **Metabolizován CYP2E1 na radikál** ➔ peroxidace lipidů, vznik aldehydů = zlomy DNA
- **Eliminace primárně exhalací**, minoritně močí a fekáliemi
- **Akutní otrava** nezávislá na cestě vstupu – **nauzea, zvracení, bolesti hlavy, závratě**
- **Chronická otrava** – renální a hepatální toxicita, narušení CNS, poškození očí



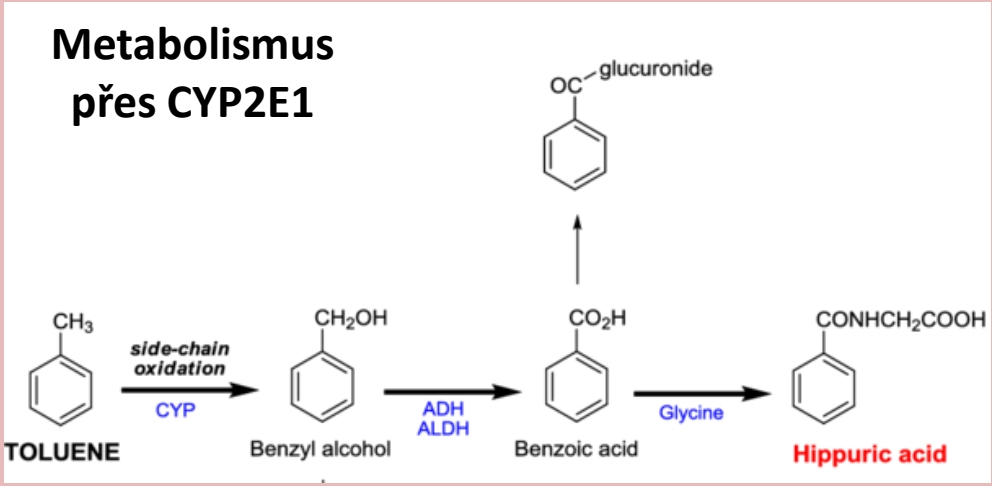
- Nejsou data o vlivu na **reprodukci či vývoj u člověka** !!!
- Zvířata
  - samice potkanů – expozice CCl_4 = pokles v hladině LH, P4, zpomalený vývoj plodu, ztráta březí
  - samci myší – testikulární atrofie

Toxická rozpouštědla a plyny

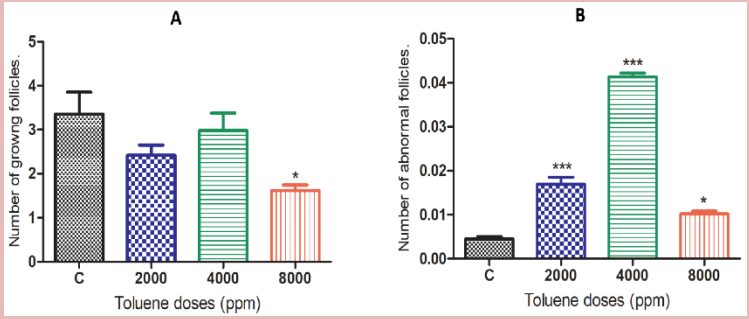


Toluen

- Bezbarvá těkavá kapalina se zápachem podobným benzenu
- Rutině přidávaný do benzínu ke zvýšení oktanového čísla
- Vzniká při výrobě benzínu
- **Používán** – inkoust, svrchní nátěry, čištění kůže, k výrobě gumy, nylonu, polyuretanů



- **Absorpce** skrz **GIT, inhalací** – distribuce do vysoce perfundovaných tkání a tuku
- **Ženy exponované rozpouštědlům s obsahem toluenu = vyšší riziko abortu, snížená plodnost**



Biology **2021**, *10*(11), 1153; https://doi.org/10.3390/biology10111153

- U potkanů – vyšší vrh s větším počtem morfologicky malformovaných potomků
- Králíci – menší množství mláďat, strukturní variace v ovariích, spontánní potraty

Toxická rozpouštědla a plyny

Benzín

- Motorové palivo (USA = gas, gasoline; země Commonwealthu = petrol)
- Kapalná směs alifatických uhlovodíků vznikajících frakční destilací ropy s následnou kombinací s additivy (isooktan, toluen, benzen) pro zabránění klepání
- Historicky použit jako léčba vší

- **Expozice** převážně **inhalací** – feťáci kvůli euforii
- Inhalace cílí CNS = iritace očí, závratě, otupělost,

- Člověk = **zvýšené riziko spontánního abortu**, strážníci = olovo ➔ redukovaný počet a motilita spermií

- Potkani = inhalace až do koncentrace 1600 ppm
  neindukovala vývojové defekty

Slovo závěrem….

Vztah matka a dítě …..

….vydrží na věky !!!!

Použitá literatura

Gupta Ramesh C.: Reproductive and developmental toxicology, , 1st ed, 2011