

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet



OSNOVE TOKSIKOLOGIJE S TOKSIKOLOGIJOM HRANE

Priredio:
Tomislav Klačec

2011

SADRŽAJ

	str.
UVOD	1
APSORPCIJA TOKSIKANATA	2
Transport toksičnih tvari kroz staničnu membranu.....	2
Transport toksičnih tvari u gastrointestinalnom traktu.....	5
Transport toksikanata preko pluća.....	7
Transport toksikanata preko kože.....	8
RASPODJELA TOKSIKANATA	9
METABOLIZAM TOKSIKANATA	13
Enzimske reakcije I faze.....	19
Enzimske reakcije II faze.....	23
IZLUČIVANJE TOKSIKANATA	27
Izlučivanje urinom.....	27
Izlučivanje u žuči.....	29
Ostali putevi izlučivanja.....	30
TOKSIKOKINETIKA	31
TOKSIKODINAMIKA	35
Mehanizmi toksičnosti.....	35
Doprema s mjesta izloženosti na ciljno mjesto.....	36
Interakcija s ciljnom molekulom ili promjena biološkog okruženja.....	36
Stanična disfunkcija.....	41
Neodgovarajući popravak i adaptacija.....	45
Veza doze i odgovora.....	49
Nekonvencionalni odnosi doze i odgovora.....	51
UČINCI TOKSIKANATA U ORGANIZMU	52
Remećenje endokrine funkcije.....	54
Imunotoksičnost.....	56
Genotoksičnost.....	58
Karcinogenost.....	60
Reproduktivna i razvojna toksičnost.....	62
Neurotoksičnost.....	63
Toksičnost za ostale organe i tkiva.....	65
ODREĐIVANJE TOKSIKANATA	67
Kvalitativna analiza.....	67
Kvantitativna analiza.....	67
ZAKONSKA REGULATIVA	71
Identifikacija opasnosti i određivanje veze doze i odgovora.....	71
Procjena izloženosti.....	74
Karakterizacija i upravljanje rizikom.....	74
Rizik u perspektivi.....	76
<i>Literatura</i>	77
<i>Korisni linkovi</i>	77



U V O D

Tradicionalna definicija toksikologije je 'znanost o otrovima' (lat. *toxicon* –otrov, *logos* –znanost). Podrobnije, toksikologija bi se mogla opisati kao proučavanje štetnih učinaka kemijskih (npr. cijanid) i fizikalnih agenasa (npr. radioaktivno zračenje) na žive organizme. Toksični učinci (tj. uočljive promjene anatomije i/ili tjelesnih funkcija ili nevidljiva oštećenja tj. tzv. biokemijske lezije) se mogu svesti na promjene na specifičnim molekulama organizma.

Tvari koje mogu izazvati štetni učinak se općenito nazivaju toksikantima. Osim kontaminanata i drugih inherentno toksičnih tvari, toksikanti mogu biti i nutrijenti, lijekovi, aditivi i sl., jer potencijal štete ovisi i o dozi, osjetljivosti organizma i drugim okolnostima. Izraz ksenobiotik se ponekad koristi kao sinonim za pojam toksikant iako podrazumijeva sve tvari stranog podrijetla u organizmu (grč. *xeno* – stranac) tj. one čije je prisustvo u organizmu neuobičajeno, čime su isključene hranjive tvari. Toksikanti prirodnog podrijetla (proizvode ih biljke, životinje, gljive, alge, bakterije, plijesni) se nazivaju toksinima i inherentno su štetnih svojstava. Kemikalije koje su jako štetne u malim dozama te dovode do brzog odgovora organizma, nazivaju se otrovima.

Često samo doza čini da neka tvar ima toksično djelovanje tj. ona pri malim dozama nije štetna ili čak djeluje blagotvorno (npr. kuhinjska sol). Veza između doze i odgovora je temeljna zamisao toksikologije, prema tvrdnji Paracelsusa (1525 g.): *Sve tvari su otrovi. Nema nijedne da nije otrov. Samo doza pravi razliku između lijeka i otrova.*

Svrha predmeta je upoznavanje s osnovama interakcije toksikanata i tijela uz predočenje osnovnih informacija o načinima njihove apsorpcije, raspodjele, metabolizma i izlučivanja. Posebna pozornost bit će posvećena molekularno-biokemijskim mehanizmima te posljedicama toksičnog djelovanja. Ukratko će biti naveden i pregled najvažnijih analitičkih pristupa u detekciji i kvantifikaciji toksikanata u hrani. Zaključno, bit će spomenute i osnove procjene rizika vezanog uz toksikante te mehanizmi donošenja odgovarajuće zakonske regulative.

Upute za korištenje digitalnog izdanja skripte

Sadržaj digitalne inačice, kao i tekst označen **narančastom bojom**, hipervezama su povezani s odgovarajućim mjestom u skripti. Povratak na izvorno mjesto hiperveze: Alt + Lijeva strelica (tzv. GoBack komanda). **Plavo obojen tekst** označava pojašnjenja ili poznate instance koje ilustriraju navedene činjenice. Dodatni slikoviti primjeri određenih toksikoloških koncepata te znanstvenih istraživanja (slike, animacije, grafovi, radovi, i dr.) nalaze se u prezentacijama predavanja te ih je korisno konzultirati tijekom usvajanja gradiva. Znak © iza rečenice upućuje na prezentacije.

APSORPCIJA TOKSIKANATA

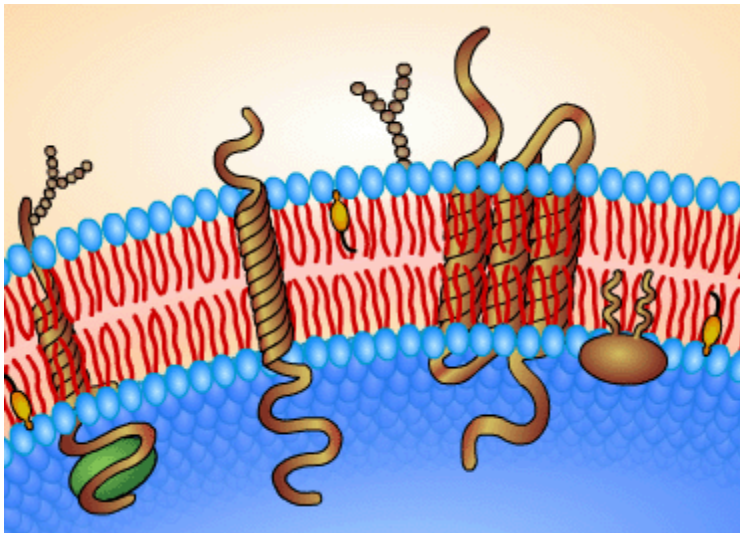
Mnogi činioci utječu na 'ulazak' tj. apsorpciju toksikanta u organizmu, te konačno njegov toksični učinak. Među najvažnijim su koncentracija ili doza tvari, dužina izloženosti, fizikalno-kemijska svojstva tvari, put ulaska, individualna otpornost ovisna o fiziologiji, i dr. Čestice toksikanta (atomi, ioni, molekule) moraju proći kroz granične površine poput kože, te epitela probavnog ili respiratornog trakta. Očito je stoga da osnovni mehanizam apsorpcije toksikanata polazi od prodiranja čestica toksikanta kroz membranu stanica.

TRANSPORT TOKSIČNIH TVARI KROZ STANIČNU MEMBRANU

Stanična membrana predstavlja glavnu barijeru prolazu stranih tvari na putu toksikanta iz vanjske sredine do ciljnog mjesta u organizmu.

Osnovna struktura stanične membrane

Stanična membrana je bimolekularni sloj (debljine 7-9 nm) sastavljen od sljedećih lipidnih molekula: fosfolipida (uglavnom fosfatidil kolin, fosfatidil etanolamin, sfingomijelini), glikolipida (cerebrozidi i gangliozidi) te kolesterola u najvećem broju membrana. © Kolesterol kod eukariota djeluje kao regulator fluidnosti umetanjem između



lanaca masnih kiselina, smanjujući permeabilnost membrane. Lanci masnih kiselina membrane su u polutekućem stanju, pri čemu na fluidnost membrane značajno utječe udio nezasićenih masnih kiselina: što je veći to je membrana fluidnija, te je brži i transport kroz membranu. Povećan udio polinezasićenih masnih kiselina se povezuje i s promjenama aktivnosti membranskih proteina (npr. [imunosupresivni učinak PUFA moduliranjem aktivnosti receptora T-stanica](#)). Najveći udio lipida (75%) je u mijelinskim ovojnicama živaca, gdje lipidi služe kao izolator (povećavajući brzinu živčanog tj. električnog

impulsa).

Membrane sadrže i dosta proteina. Integralni proteini stvaraju hidrofobne interakcije s ugljikovodičnim područjem dvosloja, dok se periferni privremeno nalaze na unutarnjoj ili vanjskoj površini membrane, često pričvršćeni za integralne proteine. Udio proteina je najčešće oko 50%, a povećava se i na 75% kod membrana uključenih u proizvodnju energije (unutarnja membrana mitohondrija).

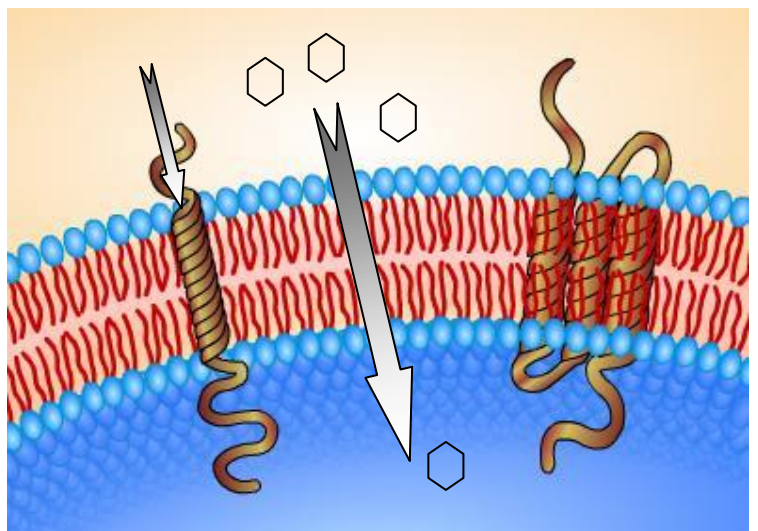
Postoje dva osnovna načina prolaska kroz membranu:

- 1 - difuzija ili pasivni transport
- 2 - specijalni ili aktivni transport

Pasivni transport

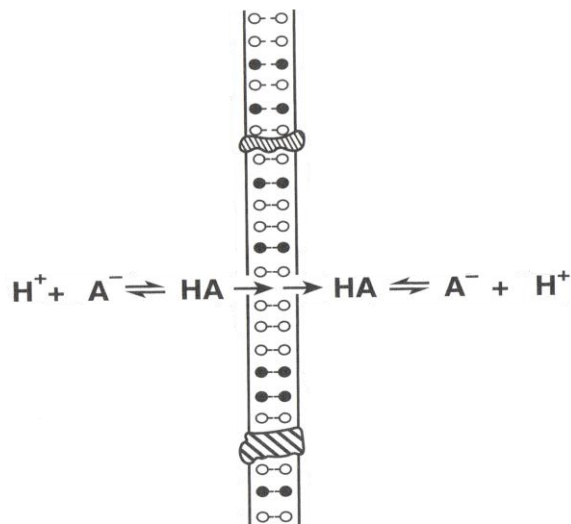
Difuzija

Većina toksikanata prolazi kroz membranu običnom difuzijom preko hidrofobnih lipidnih domena (lipofilne molekule) ili kroz pore u membrani tj. proteinske kanale (male hidrofilne molekule, ioni). Primjerice, akvaporini su kanali koji omogućuju transport molekula vode i malih, neioniziranih hidrofilnih molekula poput glicerola preko stanične membrane. Arsenit ($\text{As}(\text{OH})_3$) je sličan glicerolu te



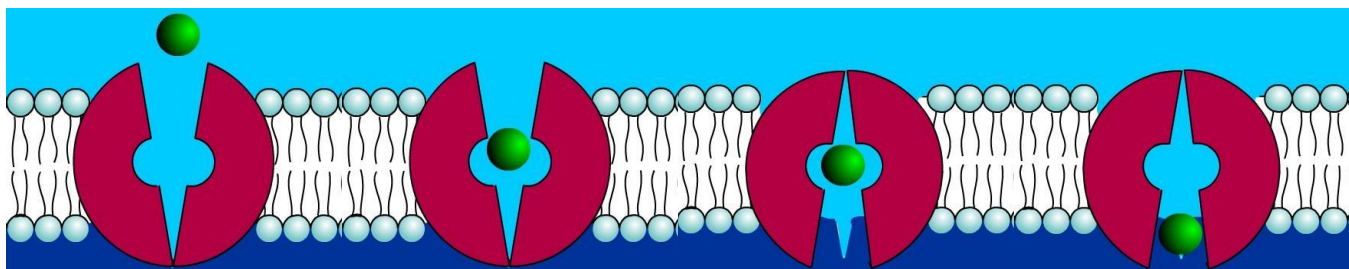
može koristiti ovaj kanal za ulazak u stanice. To je jedan od većeg broja primjera tzv. molekularne mimikrije, pri čemu toksikant koristi sustave namijenjene nutrijentima zbog sličnosti u građi.

Brzina prolaska pojedine tvari kroz membranu ovisi o koncentracijskom gradijentu, a kod lipofilnih molekula i o topljivosti u masti. Mnogi toksikanti postoje u otopini i u ioniziranom i u neioniziranom obliku. Ionizirani oblik često ne može proći kroz membranu zbog slabe topljivosti u mastima, pa je difuzija izravno proporcionalna udjelu neioniziranog oblika spoja. pK_a je pH kod kojeg je 50% kiseline ili baze disocirano. Disocijacija slabe baze ili kiseline ovisit će prema tome o pH otopine u kojoj je otopljena i o pK_a vrijednosti kiseline ili baze (visoki pK_a –slaba kiselina, niski pK_a –jaka kiselina, obratno za baze). Uopćeno se može reći da će kiseline prije difundirati kroz membranu u kiseljoj, a baze u lužnatoj sredini (detaljnije: **TRANSPORT TOKSIČNIH TVARI U GASTROINTESTINALNOM TRAKTU**).



Olakšana difuzija

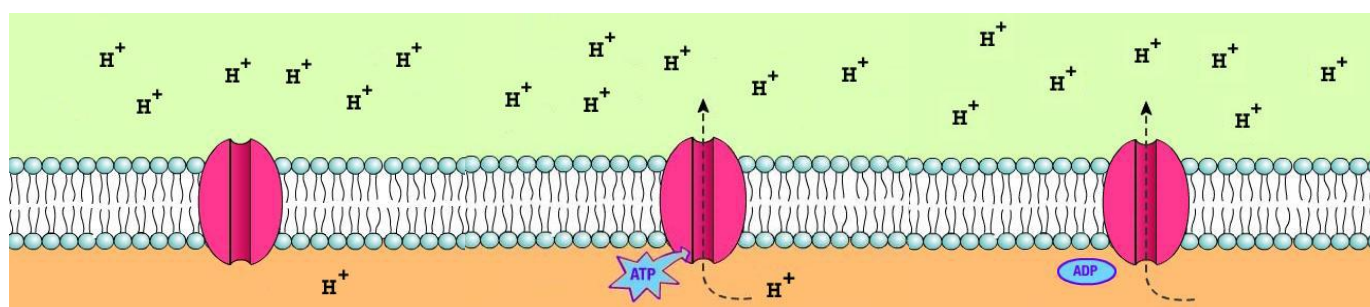
Riječ je o pasivnom transportu posredovanom proteinskim nosačima. Supstrat se kreće prema koncentracijskom gradijentu i nije potrebna energija. Npr. transport glukoze u stanicu (tzv. uniport). Vezanje glukoze dovodi do promjene konformacije proteinske molekule nosača i oslobađanja glukoze s druge strane membrane.



Aktivni transport

Supstance se kreću nasuprot koncentracijskom i elektrokemijskom gradijentu. Sustav je selektivan, te se njima mogu služiti samo toksikanti građe slične građi tvari koje su predviđene za transport ovim specifičnim proteinskim nosačima. Aktivni transport troši metaboličku energiju (ATP i slične molekule). Tvari koje se transportiraju stvaraju komplekse s nosačima u membrani, što je važno kod transporta i eliminacije stranih tvari iz organizma.

Dobar primjer aktivnog transporta su ionske pumpe poput protonske pumpe ili natrij-kalij crpke (u potonjem slučaju je ujedno riječ o tzv. antiportu jer se dva supstrata istovremeno transportiraju u suprotnim smjerovima; osnovni princip djelovanja $Na^+ - K^+$ crpke jasan je iz primjera sekundarnog aktivnog transporta u nastavku).

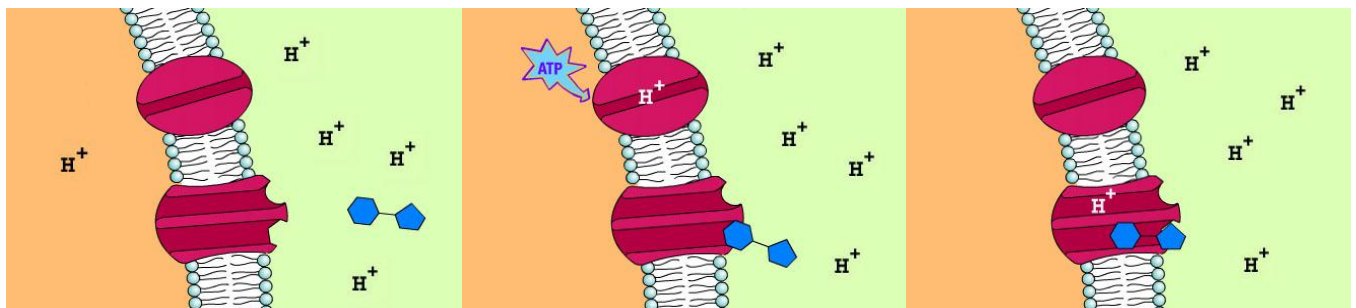
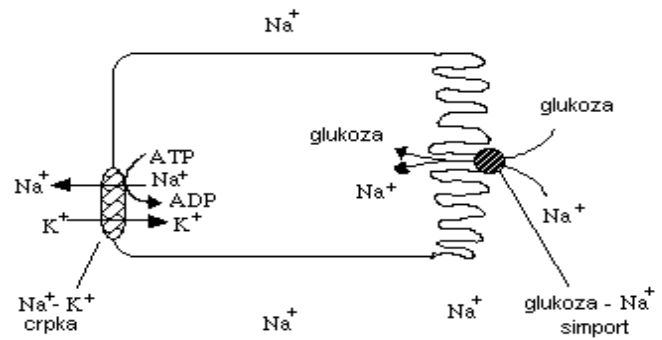


Sekundarni aktivni transport

Ova vrsta prelaska preko stanične membrane se još naziva i kotransport. Koristi se energija za stvaranje gradijenta koncentracije jednog supstrata s različitih strana membrane, a zatim se koristi ovaj gradijent za transport određene molekule nasuprot njenom koncentracijskom gradijentu.

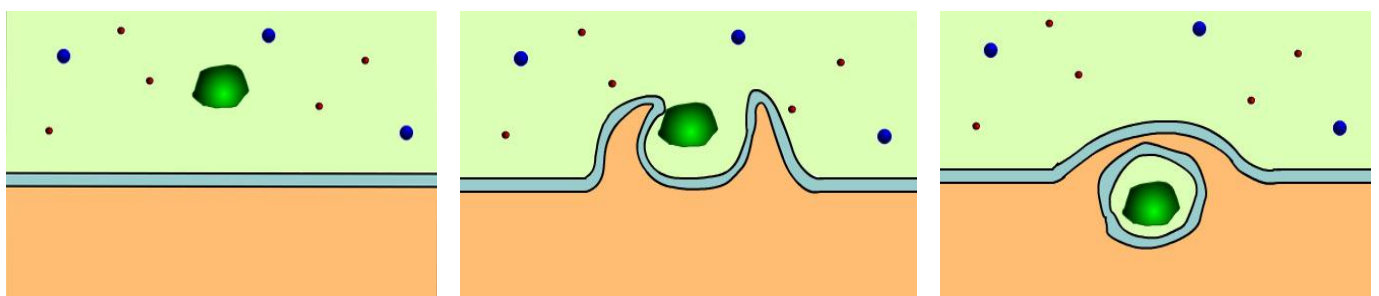
Primjer je transport glukoze iz probavnog trakta u stanice crijevne sluznice. Glukoza ulazi u stanicu pokretana razlikom koncentracija Na^+ iona koju stvara natrij-kalij crpka, pri čemu se glukoza i ioni natrija kreću u istom smjeru (tzv. simport).

Kotransport natrija i kalcija je primjer antiporta pri kojem nosač izbacuje Ca^{2+} ione iz stanica uz istovremeni povratak Na^+ iona u stanicu (dakle, pokretačka snaga je elektrokemijski gradijent Na^+ iona stvoren natrij-kalij crpkom, kao i u gornjem primjeru). Na sličan način se transportiraju ostali šećeri i aminokiseline u probavnom traktu (dolje je prikazan kotransport H^+ iona i saharoze).



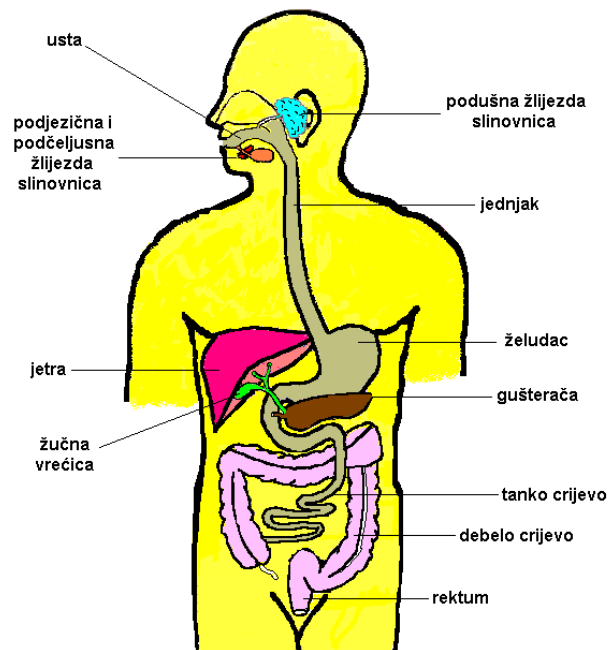
Endocitoza

Ovaj tip aktivnog transporta uključuje uvijanje i zatvaranje stanične membrane oko čestica koje time ulaze u stanicu nasuprot koncentracijskom gradijentu. Riječ je o krupnijim česticama i/ili većoj količini tvari u odnosu na ostale načine aktivnog transporta. Razlikuju se fagocitoza (velike molekule i čestice), pinocitoza (kapljice otapala sa ili bez otopljene tvari) i receptorima posredovana endocitoza (gdje vezanje određenih molekula za receptore dovodi do uvijanja stanične membrane). © Ovi procesi su važni kod uklanjanja čestica iz alveola alveolarnom fagocitozom i uklanjanje nekih toksičnih tvari iz krvi retikuloendotelnim sustavom jetre i slezene.



TRANSPORT TOKSIČNIH TVARI U GASTROINTESTINALNOM TRAKTU

Ovo je važan put apsorpcije toksikanata iz hrane i vode, ali i kod samoubilačkih i kriminalnih trovanja. Apсорpcija se može dogoditi duž cijelog probavnog trakta, od usta do rektuma, iako je najvjerojatnija u crijevima zbog vrlo velike površine apсорpcije (tzv. **Kerckringovi nabori stijenki crijeva povećavaju površinu apсорpcije 3 x u odnosu na glatku površinu, vili (30 x) i mikrovili enterocita (600 x) u dodiru s lumenom crijeva**). ©



Utjecaj na apсорpciju toksikanta imaju: veličina i oblik tvari, naboj, topljivost, pH tekućina probavnog trakta, enzimi, crijevna mikroflora, prisustvo hrane, pokretljivost crijeva te aktivnost tzv. ABC (ATP-binding cassette) transportnih proteina.

Probavni trakt sisavaca ima specijalizirane transportne sustave za apсорpciju hranjivih tvari i elektrolita (glukoza, galaktoza, aminokiseline, pirimidini, Fe, Ca, Na, i dr.). Neki toksikanti se mogu apсорbirati tim sustavima aktivnog transporta ukoliko su hranjivim tvarima slični po veličini, obliku, naboju, itd. (npr. 5-fluorouracil sustavom za pirimidine, Tl, Co, Mn umjesto Fe, Pb umjesto Ca, i dr.). © Moguća je i apсорpcija većih (hidrofilnih) spojeva. Najvjerojatnije je riječ o pinocitozi ili mehanizmu koji uključuje posebne proteine (npr. zonulin) koji vezanjem za određene receptore na površini stanica dovode do otvaranja prolaza između njih. © Epitel gastrointestinalnog trakta (GIT) može apсорbirati i čestice procesima endocitoze.

Iako se uopćeno može reći da lipofilnost toksikanta povećava apсорpciju, ekstremno hidrofobni spoj (lipofilnost se obično izražava kao particijski koeficijent ($K_{o/w}$) tj. odnos tvari raspodijeljene između organskog otapala (oktanola) i vode; povećava se s povećanjem hidrofobnosti tvari) se neće otopiti u tekućinama probavnog trakta i apсорpcija će biti slaba. © Također, ako je toksikant u obliku čestica koje su relativno netopljive u tekućinama GIT-a, spoj će imati ograničen kontakt sa sluznicom GIT-a, pa se neće dobro apсорbirati (zato je metalna Hg slabo toksična poslije oralnog unosa).

Razlika u pH tekućina GIT-a može značajno utjecati na apсорpciju molekula difuzijom (koja je najjača kad je molekula neionizirana zbog lipidne prirode membrane). Na stupanj apсорpcije utječe Henderson-Hasselbalchova jednačica:

$$pK_a - pH = \log \frac{[neioniz.oblik]}{[ioniz.oblik]}$$

npr. benzojeva kiselina, $pK_a = 4$

pH želuca je otprilike 2

$$4 - 2 = \log \frac{[neioniz.oblik]}{[ioniz.oblik]}$$

$$2 = \log \frac{[\text{neioniz.oblik}]}{[\text{ioniz.oblik}]}$$

$$10^2 = \frac{[\text{neioniz.oblik}]}{[\text{ioniz.oblik}]}$$

$$100 = \frac{[\text{neioniz.oblik}]}{[\text{ioniz.oblik}]}$$

→ 100 puta više neioniziranog, tj. oblika topljivog u lipidima

pH crijeva je otprilike 6

$$4 - 6 = \log \frac{[\text{neioniz.oblik}]}{[\text{ioniz.oblik}]}$$

$$-2 = \log \frac{[\text{neioniz.oblik}]}{[\text{ioniz.oblik}]}$$

$$10^{-2} = \frac{[\text{neioniz.oblik}]}{[\text{ioniz.oblik}]}$$

$$\frac{1}{100} = \frac{[\text{neioniz.oblik}]}{[\text{ioniz.oblik}]}$$

→ 100 puta više će biti ioniziranog oblika, što podrazumijeva slabu apsorpciju difuzijom u crijevima

Ipak, apsorpcija difuzijom u tankom crijevu (npr. za benzojevu kiselinu) nije slaba jer se ravnoteža neprestano tijekom prolaska kroz crijeva (6 - 8,5 m dužine) održava na 1% lipidno-topljivog oblika. ☺ Osim toga, vrlo velika površina tankog crijeva povećava ukupni kapacitet kemijske apsorpcije.

Kod organskih baza je obratno, tj. apsorpcija difuzijom je favorizirana u tankom crijevu:

$$pK_b - pH = \log \frac{[\text{ioniz.oblik}]}{[\text{neioniz.oblik}]}$$

Na količinu toksikanta koju stanice epitela probavnog trakta apsorbiraju velik utjecaj ima i otpornost kemikalija na kiseli pH u želucu (npr., penicilin je osjetljiv na kiseli pH), enzime (u odnosu na intravenozni unos, zmijski otrov (polipeptid) je netoksičan oralno jer ga razgrađuju probavni enzimi) i mikroorganizme crijeva. Osim toga, djelovanjem crijevne mikroflore, mogu nastati toksikanti drukčijeg toksiciteta. Npr., djeca su podložnija methemoglobinemiji nakon unosa vode s puno nitrata, jer imaju viši pH u GIT-u i jače razvijenu *E. coli* koja reducira NO_3^- u NO_2^- . Utvrđeno je da također određene populacije intestinalne mikroflore mogu reducirati aromatske nitro skupine u aromatske amine koji mogu biti goitrogeni (izazivaju gušavost) ili karcinogeni.

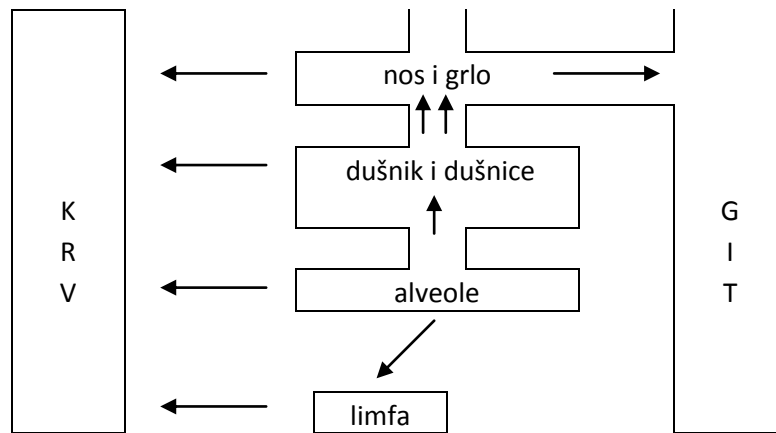
Prisustvo hrane može utjecati na stope apsorpcije (npr., zbog konkurencije, manje Cd će se apsorbirati ukoliko se u hrani nalazi zajedno sa Zn ili Cu jer koristi isti transporter na membrani enterocita tj. DMT ili divalent metal transporter; također, lipofilni poliklorirani bifenili će se bolje apsorbirati u prisustvu masti u hrani ☺, zbog poticanja izlučivanja žuči i boljeg raspršivanja masti a time i bifenila), a slično vrijedi i za pokretljivost crijeva (smanjena pokretljivost povećava apsorpciju zbog dužeg zadržavanja u proksimalnom dijelu tankog crijeva). Utvrđeno je i da razrijeđene vodene otopine pojačavaju apsorpciju nekih tvari (pri ulasku velikih količina vode u stanicu se unose i male hidrofilne molekule).

Apsorpciju stranih tvari u probavnom sustavu značajno ograničavaju transportni (tzv. ABC proteini jer pripadaju istoj genskoj superfamiliji) poput P-glikoproteina, BCRP (breast cancer resistance protein) i MRP (multidrug resistance associated proteins) proteina. Ove i slične transportere ekspimiraju stanice crijevnog epitela. Riječ je o transmembranskim proteinima koji unutar stanice dohvaćaju ksenobiotike (velik broj strukturno različitih spojeva i njihovih metabolita) te ih, uz hidrolizu ATP-a, izbacuju iz enterocita nazad u crijevni lumen. ☺ Proteini otpornosti na lijekove su dobili takvo ime zato što je uočeno da su kulture stanica bile otporne na lijekove baš zbog tog transportnog proteina koji ih izbacuje iz stanice.

TRANSPORT TOKSIKANATA PREKO PLUĆA

Najčešće trovanje (CO), i najvažnija profesionalna bolest (silikoza, SiO₂) nastaju nakon apsorpcije preko pluća. Ovako se apsorbiraju i neki bojni otrovi (klor, fosgen, lewisit), te HCN (plinska komora). Uglavnom se apsorbiraju plinovi (CO, NO₂, SO₂), pare (HF), isparljive tvari, otapala (C₆H₆, CCl₄), i aerosoli (azbest).

Apsorpcija aerosola (krutih i tekućih čestica) u dišnom sustavu se može podijeliti prema veličini čestica:



Čestice promjera 5 µm i veće obično zaostaju u nazofaringealnom (nos, grlo) području bez cilija (**pokretne cilije se nalaze na površini stanica i neprestano se svijaju u istom smjeru uzrokujući kretanje sluzi**) Ⓢ, zadržavaju se na dlačicama i talože zbog turbulencije zraka, i uklanjaju kihanjem i ispuhivanjem nosa. Nazalna površina s cilijama nosi netopljive čestice do usta gdje gutanjem dospijevaju u GIT. Topljive čestice se osim toga mogu otopiti u sluzi te prenijeti do grla ili se mogu kroz epitel apsorbirati u krv.

Čestice veličine 2–5 µm dospijevaju do traheobronhalnog (dušnik, bronhi) područja pluća, gdje se uz cilije sluznog sloja prenose do usta (GIT). Kašljanje i kihanje dovode do brzog kretanja sluzi i čestica prema ustima.

Čestice promjera 1 µm i manje prodiru do alveolarnih vrećica pluća. Uklanjanje čestica iz alveola se odvija: fagocitozom (makrofagi), migracijom u međustanični prostor te otapanjem i prelaskom u krv ili limfu. Općenito, uklanjanje čestica iz alveola je sporo, pri čemu brzina u prvom redu ovisi o topljivosti čestica (lako topljivi spojevi prolaze kroz alveolarne membrane ako su hidrofobni).

Apsorpcija plinova i para se odvija difuzijom duž cijelog dišnog trakta. Najbrža je apsorpcija u alveolarnoj zoni koja ima veliku površinu (50-100 m²), velik protok krvi te vrlo brzo dolazi do uravnoteženja plina u alveolama s krvi u plućnim kapilarama (prema Henryjevom zakonu: $C = k \cdot p$ gdje je k topljivost tj. omjer koncentracije plina u krvi prema koncentraciji u plinu kod ravnoteže; **ovaj princip koriste uređaji za alko-testiranje**). Topljivost hidrofilnih para i plinova (npr. HF) je bolja u gornjem respiratornom traktu prekrivenom sluzi, dok se pare i plinovi slabije topljivosti u vodi (NO₂) uglavnom apsorbiraju u plućima.

TRANSPORT TOKSIKANATA PREKO KOŽE

Koža je relativno dobra lipidna barijera koja odvaja čovjeka od okoline. Ipak, neke kemikalije se apsorbiraju u koži dovoljno dobro da izazovu sistemske učinke (npr. nervni bojni otrovi poput sarina, CCl_4 , i dr.).

Najveću površinu kože pokrivaju epidermalne stanice, ali toksikant može proći i kroz stanice znojnih ili lojnih žlijezda, ili ući kroz folikul dlake.

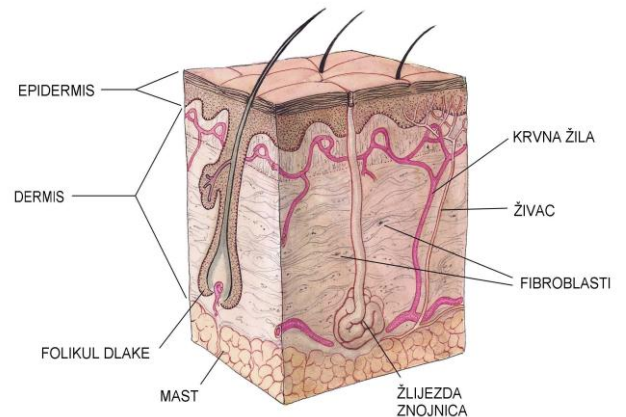
Ulaz perkutanim putem se sastoji od prolaska kroz:

- 1 -gusto naslagan vanjski sloj rožnatih, keratiniziranih, epidermalnih stanica
- 2 –germinativni sloj epidermisa (vrlo tanak)
- 3 –dermis

Glavna barijera prolasku toksikanata je površinski sloj izumrlih stanica epidermisa, ispunjen keratinom (tzv. stratum corneum). Toksikanti prolaze difuzijom kroz taj sloj (polarni kroz vanjski sloj proteinskih vlakana, a nepolarni kroz lipidni matriks između proteinskih vlakana).

Hidracija ovog sloja povećava permeabilnost kože deset puta. Dermis je porozni sloj koji toksikanti moraju proći prije ulaska u sistemske cirkulaciju.

Na apsorpciju preko kože još utječu: svojstva i koncentracija toksikanta, vrsta nosača (otapala), pH, temperatura, lokalna prokrvljenost i perspiracija, površina i anatomske odlike kontaminiranog dijela kože (ovisne o spolu, dobi, rasi, i sl.).

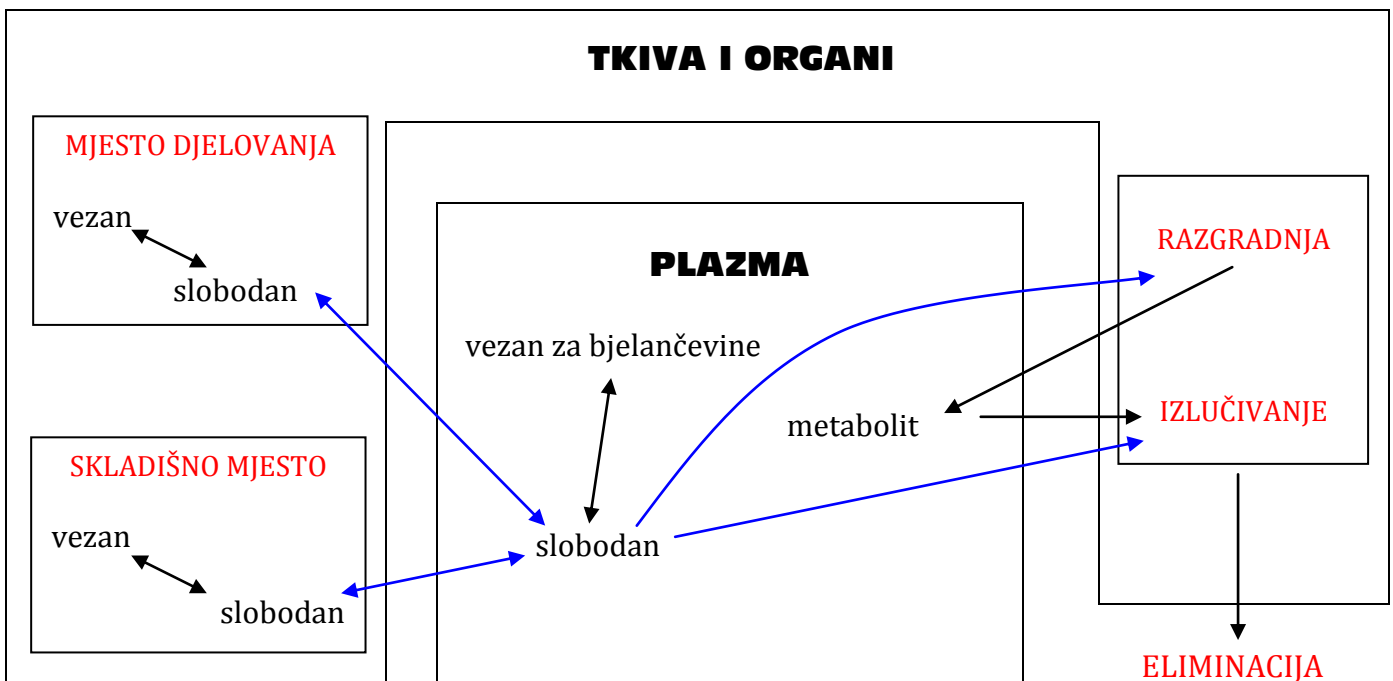


RASPODJELA TOKSIKANATA

Apsorpcija preko pluća je brza i odmah izlaže srce toksikantu. Apsorpcija preko kože je uglavnom spora i prvenstveno su izložena periferna tkiva.

Bioraspoloživost, tj. količina toksikanta koja uđe u sistemsku cirkulaciju nakon oralnog unosa, ovisi o nizu činioca, u prvom redu o količini koju stanice probavnog trakta apsorbiraju. Prije ulaska u cirkulaciju, spoj mogu metabolizirati stanice probavnog trakta (gdje se većina prisutne količine nekih toksikanata (npr. tiramina monoamin oksidazama) metabolizira), ili (portalnom venom) dopijeva do jetre, koja ga može metabolizirati i izlučiti u žuč. ☹️ Jetra je najvažnije mjesto metabolizma stranih tvari, te se mnogi toksikanti na taj način (naravno, ovisno o koncentraciji) neutraliziraju prije nego dopiju u sistemsku cirkulaciju. Neutralizacija netom apsorbirane doze toksikanta kao posljedica metabolizma u crijevima i jetri se naziva i tzv. učinkom prvog prolaza. ☹️ Manji dio toksikanta se može apsorbirati i u usnoj šupljini čime se također izbjegava prolazak kroz jetru i učinak prvog prolaza. Nitroglicerina, lijek za anginu pectoris, se primjenjuje sublingvalno jer progutan može biti metaboliziran u produkt toksičan za hepatocite.

Nakon apsorpcije, toksikanti ulaze u krv (samo vrlo lipofilni spojevi se nakon apsorpcije transportiraju limfom), koja ih brzo raznosi po cijelom organizmu. U raspodjeli sudjeluju i transportni proteini koji aktivnim transportom izvlače toksikante iz krvi u organe uključene u metabolizam i izlučivanje poput jetre i bubrega (smjer: krv --> bubrezi ili krv --> jetra), ili sudjeluju u transportu metabolita (jetra --> žuč ili bubrezi --> urin). Osim već spomenutih MRP i BCRP proteina i P-glikoproteina, ovdje su relevantni i OATP (organic-anion transporting peptides), OAT (organic-anion transporters), OCT (organic-cation transporters), i drugi nosači koji ulaze u tzv. SLC (solute carrier) familiju transportnih proteina. Prolaskom kroz stijenke kapilara, toksikanti dopijevaju u najrazličitija tkiva organizma. Dio toksikanta dolazi do mjesta djelovanja, dok se preostali dio zadržava u neosjetljivim tkivima (tzv. skladišna mjesta), ili se metabolizira i izlučuje iz organizma. Lanac zbivanja tijekom raspodjele toksikanta u organizmu prikazan je dolje:



U početnoj fazi raspodjele toksikanta ona ovisi prvenstveno o snabdjevenosti pojedinih tkiva krvlju, propusnosti tog tkiva za toksikant i raspoloživosti mjesta vezanja. ☹️ Visoka koncentracija tvari se najbrže postiže u onim organima koji su dobro prokrvljeni (pluća, bubrezi, jetra, žlijezde), dok slabo prokrvljena tkiva (masno tkivo, mišićno i vezivno tkivo) u početku preuzimaju malu količinu tvari. Poslije se uloga krvotoka u raspodjeli smanjuje, a više dolaze do izražaja fizikalno-kemijska svojstva tvari (građa, veličina, oblik, kiralnost, ioniziranost tj. pK_a kemijskih skupina, topljivost u mastima, agregatno stanje) koja utječu na prijelaz preko staničnih membrana i

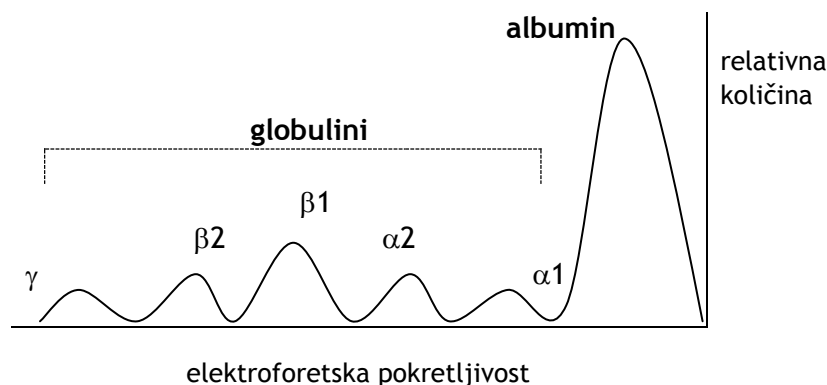
afinitet vezanja tvari za pojedine sastavne dijelove tkiva. To je presudno za konačnu raspodjelu toksikanta u organizmu. **Npr., odmah po apsorpciji najveće razine Pb su u eritrocitima, jetri i bubrežima. Mjesec dana nakon unosa se Pb preraspodjeli u kost.**

Pohrana toksikanata u tkivima

Neki toksikanti imaju najvišu koncentraciju na mjestu toksičnog djelovanja (**npr. CO se veže za hemoglobin; ili herbicid parakvat u plućima**), dok se drugi koncentriraju na mjestima nevezanim za toksično djelovanje (**Pb u kostima**). Toksikantima pohranjenim na takvim skladišnim mjestima je zapravo umanjen štetni učinak u organizmu sprječavanjem gomilanja visokih koncentracija toksikanata na mjestu toksičnog djelovanja. Koncentracija slobodnog oblika toksikanta u tkivima je u ravnoteži sa slobodnim oblikom toksikanta u plazmi, te se iz mjesta skladištenja oslobađa kako ovaj nestaje iz plazme biotransformacijom ili izlučivanjem. Ujedno, to je i razlog zašto poluživot pohranjenih toksikanata može biti vrlo dug.

Proteini plazme kao skladišno mjesto

Reverzibilno vezanje za proteine plazme uključuje ionske veze i hidrofobne interakcije, koje mogu biti pojačane van der Waalsovima i vodikovim vezama. Albumin je najzastupljeniji od proteina plazme (60%) i najvažniji u vezanju toksikanata (**veže Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , bilirubin, vitamin C, tetracikline, kloramfenikol, masne kiseline, penicilin, benzodiazepine, salicilat, sulfonamide, streptomycin, histamin, barbiturate, i dr.**). Transferin (β 1-globulin) veže željezo i transportira ga po tijelu. Ceruloplazmin (α 2-globulin) veže bakar. Lipoproteini su važni za transport spojeva topljivih u mastima (**vitamini, kolesterol, steroidni hormoni, poliklorirani bifenili**), pri čemu se razlikuju po količini masti i lipofilnih supstanci u jezgri molekule: VLDL (very-low-density lipoproteins) > LDL (low-density lipoproteins) > HDL (high-density lipoproteins). γ -globulini su antitijela.



Dio toksikanta koji je vezan za proteine plazme nije odmah raspoloživ za distribuciju u tkiva i organe ili filtraciju bubrežima jer zbog veličine proteina plazme ne može prijeći preko stijenki kapilara. Postoji ravnoteža između slobodnog oblika toksikanta u plazmi i onog vezanog za proteine plazme, pa kad slobodni oblik toksikanta napusti kapilaru, vezani oblik disocira s proteina. Nagla disocijacija toksikanta s proteina plazme (uslijed toga što tvari s većim afinitetom istisnu s nespecifičnih mjesta vezanja tvari sa slabijim afinitetom) može izazvati toksične reakcije (**npr. sulfonamidi mogu potaknuti disocijaciju antidijabetičkog lijeka te dovesti do hipoglikemijske kome**).

Određen broj toksikanata se u krvi veže za krvne stanice, u prvom redu eritrocite (**trovalentni Cr se skoro isključivo veže za proteine plazme, a heksavalentni za eritrocite; slično vrijedi za organsku Hg u usporedbi s anorganskim oblicima; 96% Pb u krvi je vezano za eritrocite**).

Jetra i bubrež kao skladišna mjesta

Ovi organi imaju velik kapacitet vezanja kemikalija, vjerojatno više od svih ostalih organa zajedno, i to zato što su važni u metabolizmu i uklanjanju toksikanata. Smatra se da toksikante uklanjaju iz krvi aktivnim transportom, a u pohrani toksikanata ulogu imaju i tzv. intracelularni vezujući proteini poput ligandina iz citoplazme jetre

(ligandinsku aktivnost imaju neki izoenzimi glutation S-transferaze koji na svojoj površini mogu vezati različite organske molekule) ili metalotioneina (veže Cd i Zn u jetri i bubrezima). ©

Masno tkivo kao skladišno mjesto

Masno tkivo je važno za pohranu lipofilnih toksikanata (tvari s većim $K_{o/w}$: organoklorini pesticidi, poliklorirani bifenili) smanjujući koncentraciju toksikanta na mjestu toksičnog djelovanja (uočljivo i kod razlike u djelovanju tiopentala i pentobarbitala; prvi spada u brzodjelujuće barbiturate jer je topljiviji u mastima i brže dolazi do mjesta djelovanja u mozgu; istovremeno je i kratkotrajnijeg djelovanja zbog brzog opadanja razine u mozgu i plazmi uslijed preraspodjele u masno tkivo). Budući da mast može činiti od 20-50% tjelesne težine, osobe s više masnog tkiva su zaštićenije od djelovanja tvari s većim $K_{o/w}$. Međutim, kod brze mobilizacije masti za proizvodnju energije (dijete, gladovanje) dolazi do brzog porasta koncentracije pohranjenog spoja u krvi (na pokusnim životinjama je dokazano da kratkotrajno izgladnjivanje nakon izloženosti organoklorinim pesticidima dovodi do znakova trovanja).

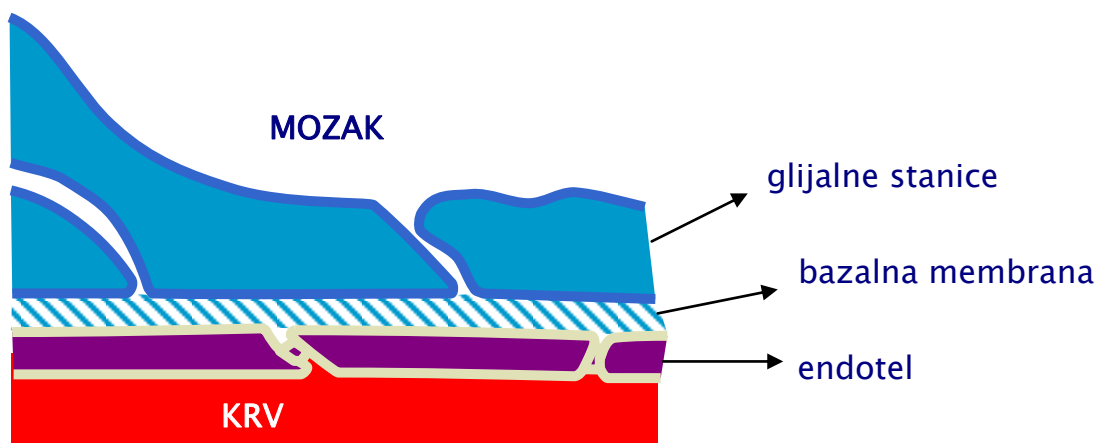
Kost kao skladišno mjesto

Kost je rezervoar tvari poput fluorida, Pb (90% količine u organizmu) i Sr. Ulazak u kosti se može smatrati fenomenom površinske kemije pri čemu se odvija ionska izmjena između ekstracelularne tekućine i površine kosti (kristali hidroksilapatita). Toksikant ulazi u kristal, te zbog sličnosti u veličini i naboju, F^- može zamijeniti OH^- , dok Pb ili Sr mogu zamijeniti Ca u kristalnoj rešetki hidroksilapatita. © Odlaganje toksikanta u kostima može i ne mora biti štetno. Npr. Pb nije toksično za kosti, ali su dobro poznati kronični učinci odlaganja fluorida (koštana fluoroza) i radioaktivnog Sr (osteosarkom i druge neoplazme). Olovo se eventualno može osloboditi iz kosti, npr. kod mobilizacije uslijed povećanih potreba za kalcijem (trudnoća), te izazvati toksične učinke.

Barijere raspodjeli toksikanata

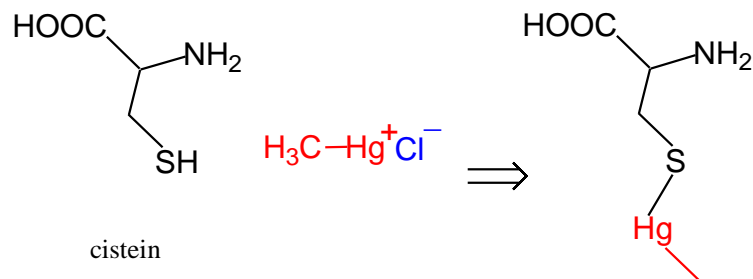
Postoje tkiva koja su manje propusna za toksikante poput krvno-moždane barijere, placente ili reproduktivnih stanica. Oocit (jajna stanica) u jajnicima i spermatogene stanice u testisima su odvojene od kapilara slojevima drugih stanica.

Krvno-moždana barijera podrazumijeva gusto zbijene stanice stijenke kapilara (endotel) u središnjem živčanom sustavu (CNS) i potporno tkivo oko kapilara (tzv. glijalne stanice na granici krvi i CNS-a i koroidni epitel na granici krvi i cerebrospinalne tekućine u koju je 'uronjen' CNS), što umanjuje propusnost tog sloja.




Prelazak iz krvi u mozak onda mora uključivati prelazak preko stanica umjesto prostora između. Stoga krvno-moždanu barijeru svladavaju prvenstveno tvari s visokim $K_{o/w}$. Također, stanice krvno-moždane barijere proizvode velike količine P-glikoproteina i analogno djelujućih MRP proteina koji aktivno transportiraju toksikante u izvanstanični prostor stanica (u krv ili cerebrospinalnu tekućinu). © Ulaz toksikanata u mozak se odvija po istim načelima kao kod ostalih stanica tijela: jako lipofilne komponente lako prodiru u CNS difuzijom preko stanične membrane (npr. metilživa (nekonjugirana) puno lakše od anorganske Hg), kao i toksikanti koji zbog sličnosti građe

mogu koristiti sustave aktivnog transporta. Metaboliti ecstasyja (glutationski konjugati) mogu koristiti sustave transporta aminokiselina, dok se metilživa povezuje s cisteinom pri čemu nastaje spoj sličan metioninu koji prelazi barijeru uz nosače aminokiselina.



Slično apsorpciji velikih molekula između stanica sluznice crijeva, vezanje prije spomenutih proteina poput zonulina na specifične receptore moždanih stanica dovodi do stvaranja pukotina u krvno-moždanoj barijeri. Krvno-moždana barijera nije dovoljno razvijena kod novorođenčadi, pa je to osnovni razlog zašto su kemikalije kojima je CNS mjesto toksičnog djelovanja otrovnije za novorođenčad nego odrasle. [Morfin je 10 puta toksičniji za novorođene štakore od odraslih.](#)

Placenta osigurava hranu plodu, vrši izmjenu majčinih i fetusnih krvnih plinova, uklanja fetalne izlučevine, te održava trudnoću nizom hormonskih mehanizama. Krvne žile fetusa i majke su razdvojene nizom slojeva tkiva koje predstavljaju placentalnu barijeru.  Prolaz toksikanata kroz placentu je omogućen lipofilnošću toksikanta, sličnošću njegove građe hranjivim tvarima uslijed čega može koristiti sustave aktivnog transporta ([npr. analozi pirimidina i purina](#)) te pinocitozom. Posteljica ima i sposobnost metabolizma toksikanata, a dodatnu zaštitu predstavljaju i transportni sustavi u membrani stanica koje odvajaju krv majke od krvi ploda, poput gore spomenutog P-glikoproteina i sličnih proteina. Često je ravnotežna koncentracija toksikanta u embriju/fetusu niža od koncentracije u majčinoj cirkulaciji.

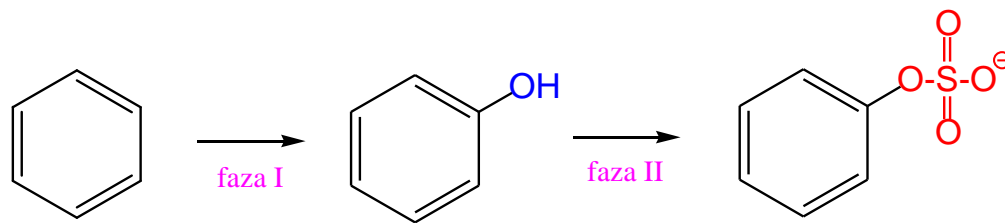
METABOLIZAM TOKSIKANATA

Tijekom evolucije, genomi organizama su nakupili veći broj gena za enzime koji pružaju zaštitu od štetnih kemikalija iz okoliša. Skup enzimskih reakcija naziva se metabolizmom ksenobiotika ili biotransformacijom i smatra najvažnijom determinantom njihove toksičnosti. Neke biotransformacije se događaju i neenzimskim reakcijama, poput hidrolize želučanom kiselinom te spontanih oksidacijskih, redukcijskih, izomerizacijskih i sličnih reakcija.

Općenito se može reći da biotransformacija rezultira pretvorbom lipofilnih spojeva u hidrofilnije metabolite. Naime, stanica je po građi nepolarnija od okoliša čime bi moglo doći do nakupljanja lipofilnih tvari unutar stanice i veće mogućnosti toksičnog učinka. Osim za toksikante koji se izlučuju preko pluća, lakoća eliminacije ovisi o topljivosti u vodi, što naročito vrijedi za tvari koje se izlučuju urinom i fecesom (najveći broj toksikanata). Biotransformacija se može podijeliti u dvije faze:

I faza –uvođenje funkcionalnih skupina ili njihovo oslobađanje, što omogućuje drugu fazu; ipak, i prvom fazom se već ponekad dobiju spojevi topljiviji u vodi (polarni) koji se mogu brzo izlučiti iz organizma;

II faza –kovalentno vezanje na endogene molekule pri čemu nastaju konjugati sa sulfatom, glukuronatom, acetatom ili aminokiselinama; riječ je o većim molekulama ioniziranim kod fiziološkog pH (tj. hidrofilnim); ujedno, neki transportni sustavi (proteinske molekule nosača koji posreduju olakšanu difuziju ili

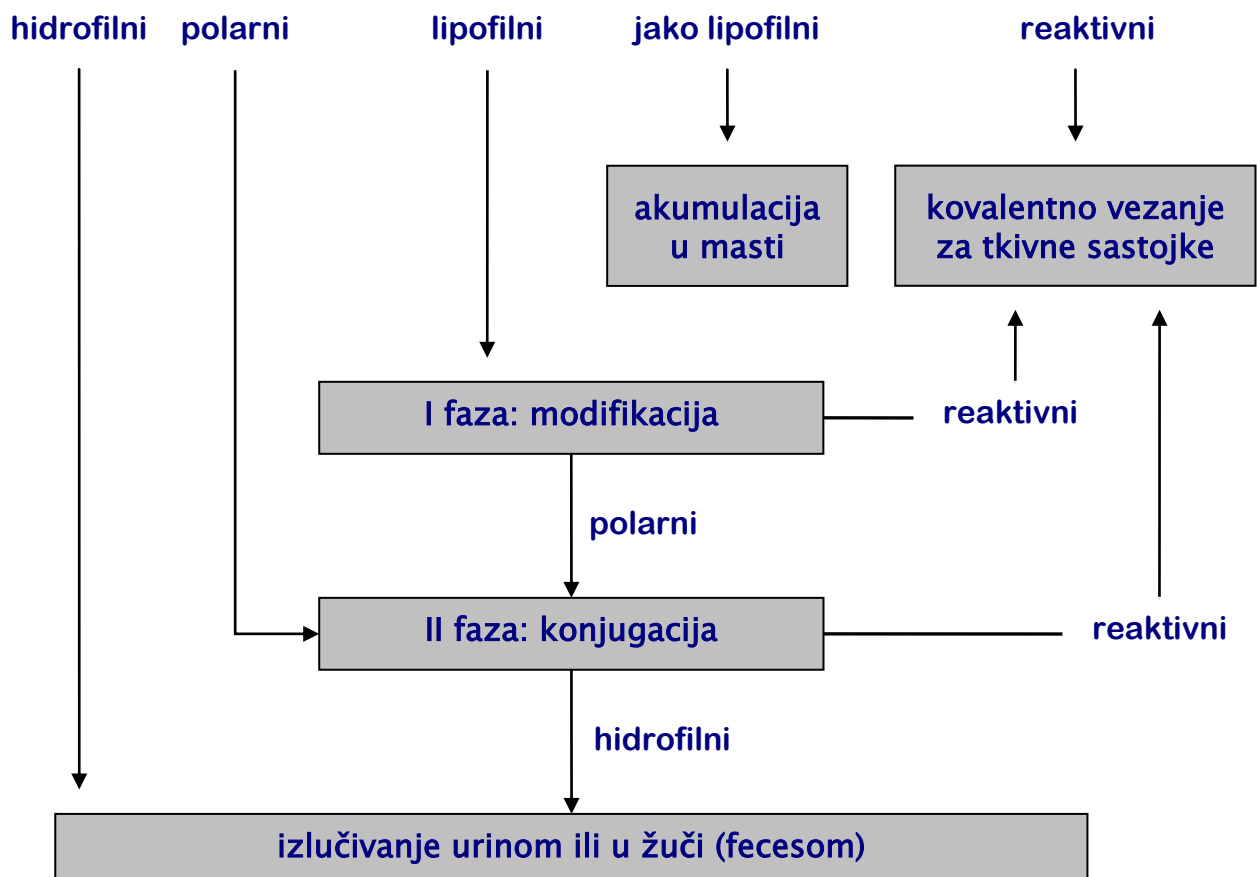


aktivni transport) prepoznaju ove konjugate.

Po nekim autorima postoji i III faza biotransformacije koja uključuje proteinske

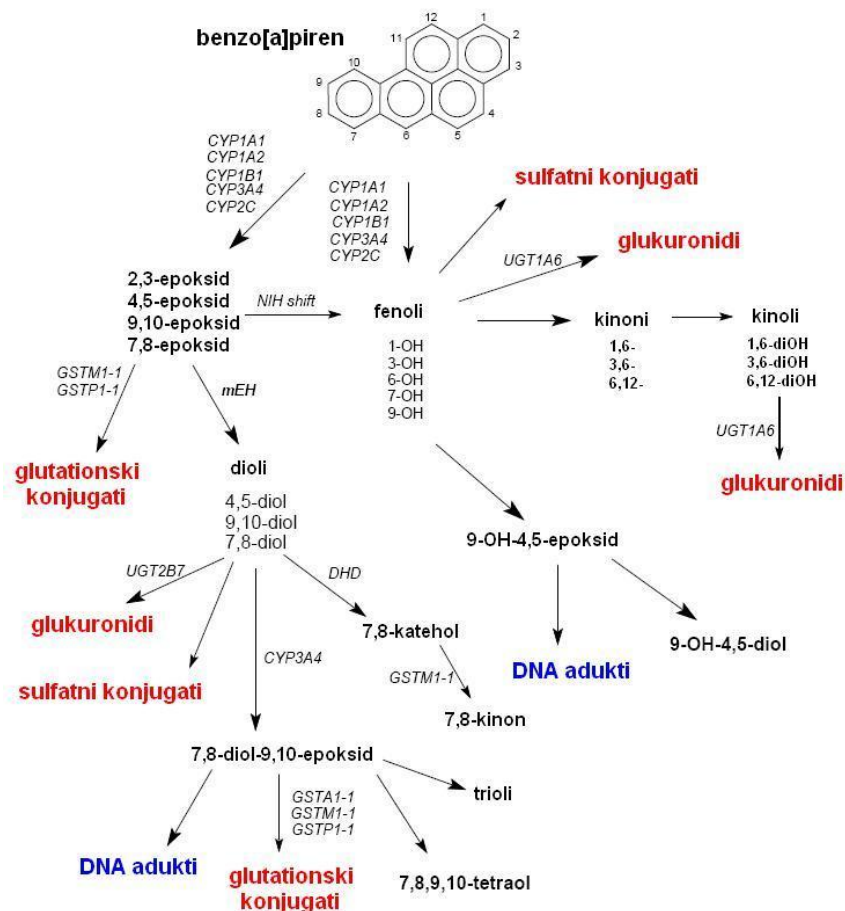
transportere organskih molekula iz jetre u žuč ili urin, poput P-glikoproteina, BCRP ili MRP nosača.

Metabolička sudbinu toksikanta u organizmu ovisi u prvom redu o fizikalno-kemijskim svojstavima ksenobiotika:



Osim utjecaja na sam smjer metaboličke transformacije, fizikalno-kemijska svojstva (građa, veličina, oblik, kiralnost, ioniziranost tj. pKa kemijskih skupina, topljivost u mastima, agregatno stanje) utječu na koncentraciju toksikanta u aktivnim središtima enzima. Ove osobine toksikanata određuju brzinu apsorpcije i raspodjele difuzijom i/ili prolaskom kroz stanične membrane uz specijalizirane transportne proteine, vezanjem za proteine (plazme) te na druge načine. *Npr., enzimi često imaju različite afinitete za stereoisomere, a ukoliko oni nastaju kao produkti metabolizma, to može rezultirati različitim brzinama izlučivanja i/ili toksičnošću.*

Neke enzimske reakcije su specifične tj. ograničene na potencijalno štetne tvari stranog podrijetla, dok je znatan udio reakcija posredovan enzimima koji sudjeluju i u intermedijarnom metabolizmu. Tako biotransformaciju provode i enzimi koji sudjeluju u sintezi steroidnih hormona, β -oksidaciji masnih kiselina, kao i oni koji konjugacijskim reakcijama pospješuju izlučivanje bilirubina, žučnih kiselina ili tiroidnih i steroidnih hormona. Kemikalija može doživjeti različite transformacije (vidi primjer benzo[a]pirena na slici dolje) ili iste transformacije različitim enzimima. *Primjerice, etanol se može oksidirati u acetaldehid trima različitim enzimima: citokromom P450, alkohol dehidrogenazom ili katalazom.* Metabolizam može, ali ne mora uključivati uzastopne korake.



Općenito, biotransformacija se postiže uz ograničen broj enzima male specifičnosti za supstrate. *Npr., dva citokroma P450 (CYP2D6 i CYP3A4) metaboliziraju više od polovice svih lijekova u uporabi.*

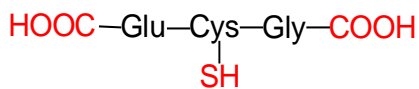
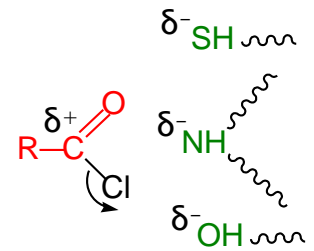
Ponekad za toksikant postoje enzimi visokog afiniteta, ali malog kapaciteta. Ako se zasite, uključuju se enzimi malog afiniteta, ali velikog kapaciteta. Slično vrijedi za gore spomenuti etanol koji se tek pri zasićenju kapaciteta alkohol dehidrogenaze metabolizira citokromom P450. Paracetamol (Panadol) se kod niskih doza (15 mg/kg) najvećim dijelom (90%) izlučuje kao sulfatni konjugat, dok se kod visokih doza (300 mg/kg) samo 43% izluči kao sulfat, a ostatak u obliku glukuronida ili merkapturnih kiselina. Promjena načina metabolizma ponekad može uključivati nastanak manje ili više toksičnih produkata. *Primjerice, visoke doze paracetamola, su čest uzrok zatajenja jetre zbog djelomične pretvorbe u elektrofilni produkt citokromima P450.* ©

Dodatne temeljne osobine i načela metabolizma toksikanata navedeni su u nastavku.

Bioaktivacija toksikanata

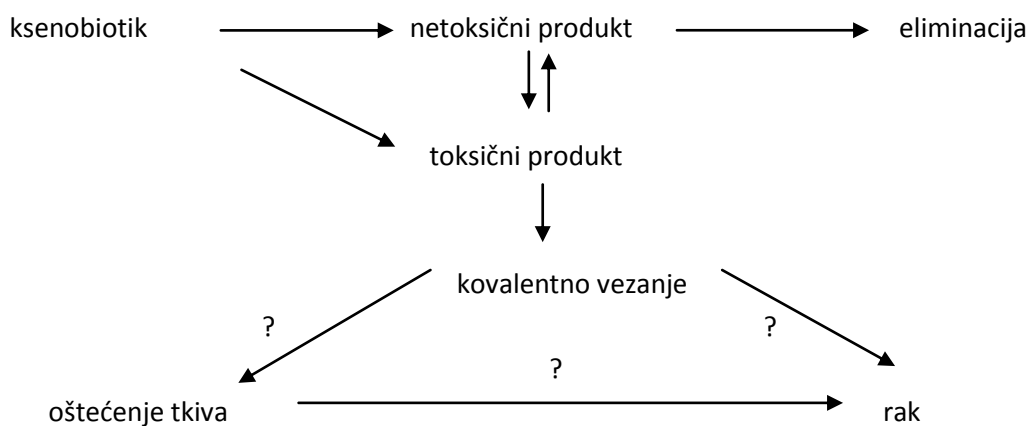
Za većinu ksenobiotika biotransformacija podrazumijeva smanjenje toksičnosti, ali postoje i primjeri gdje je produkt biotransformacije toksičniji od početnog spoja. To je tzv. metabolička aktivacija ili bioaktivacija i nekoliko tipičnih primjera je navedeno u nastavku, kod opisa konkretnih biotransformacijskih enzima.

Naročito opasni su tzv. reaktivni međuproducti, što podrazumijeva slobodne radikale i elektrofilne molekule. Elektrofilni (molekule s atomom djelomičnog (δ^+) ili potpunog pozitivnog naboja koji nastaje kao posljedica kovalentne veze s elektronegativnijim atomima (N, S, O, Cl, i sl.) koji snažnije privlače elektrone iz veze) se mogu kovalentno vezati s elektronima bogatim nukleofilima (SH, NH₂, OH skupine) iz važnih makromolekula stanice (DNA, bjelančevine, itd.), oštećujući ih. Nukleofil kojeg stanica proizvodi upravo radi zaštite od reaktivnih spojeva te kao antioksidans je tripeptid glutation (GSH). Dovoljne razine GSH osiguravaju vezanje elektrofila za GSH umjesto za važne stanične molekule. Glutation može spontano sudjelovati u ovim reakcijama, ali i kao koenzim nekih metaboličkih enzima (vidi dolje).



Slobodni radikali su, uglavnom, nestabilne kemijske vrste (atomi, ioni ili molekule s nesparenim elektronom) koji napadaju druge molekule i time izazivaju lančanu reakciju i oštećenje većih razmjera. Vidi primjer nastanka semikinon radikala citokromom P450 te više o oksidativnom stresu i lipidnoj peroksidaciji koje mogu uzrokovati toksikanti: **TOKSIKODINAMIKA**. Primjeri vezanja elektrofila i slobodnih radikala za DNA i mogućnost nastanka mutacija: **GENOTOKSIČNOST** i **KARCINOGENOST**.

Kovalentne interakcije se smatraju ključnim u toksičnom djelovanju niza ksenobiotika. Ravnoteža između stvaranja i detoksikacije reaktivnih spojeva je glavna determinanta kemijske toksičnosti i uzrok razlika u osjetljivosti između organa ili vrsta. **Primjerice, miševi provode bioaktivacijsku reakciju epoksidacije aflatoksina brže od štakora te bi se moglo pretpostaviti da su osjetljiviji na ovaj mikotoksin. Međutim, istovremeno brže konjugiraju nastali epoksid s glutationom (detoksikacija i izlučivanje) te su, ukupno gledajući, štakori osjetljivija vrsta.**



Lokalizacija biotransformacije

Jetra je prvi i najvažniji organ koji provodi ove procese. Kao što je već rečeno gore, krv prvo prolazi kroz jetru nakon apsorpcije u probavnom traktu. Jetra toksikante ekstrahira i kemijski mijenja prije njihove pohrane, izlučivanja u žuč ili oslobodanja u opću cirkulaciju (promijenjeni toksikanti u krvi se, u pravilu, filtriraju u bubrezima te izlučuju urinom). Značajnu ulogu u zaštiti od toksikanata također imaju crijeva (vidi 'činak prvog prolaza', **RASPODJELA TOKSIKANATA**). Manji značaj u biotransformaciji, obzirom na raznovrsnost i koncentracije enzima, također imaju: pluća, bubrezi, nosna sluznica, oči, koža, spolne žlijezde, placenta, i dr. Postoje nezanemarive razlike u ekspresiji biotransformacijskih enzima u raznim organima i tkivima, što je razumljivo obzirom na, primjerice, različite klase kemikalija kojima su izložene stanice respiratornog trakta u odnosu na enterocite. **Npr., CYP2F1 se eksprimira isključivo u plućima, ne u jetri, što može rezultirati različitom osjetljivošću**

organa na pojedine strane tvari (ovaj enzim oksidira naftalen u pneumotoksični naftalen-1,2-oksidi). Obzirom na dominantnu ulogu jetre u metabolizmu ksenobiotika, smanjenje ukupnog kapaciteta biotransformacije može uslijediti zbog kemijskih ili fizičkih oštećenja, bolesti (karcinomi, hepatitis, ciroza, i dr.), smanjenja protoka krvi kroz jetru, oštećenja bubrega (koje dovodi do slabljenja funkcije jetre), i sl.

Crijevna mikroflora također ima nezanemariv kapacitet niza biotransformacijskih reakcija. Najvažnije su reduktivne reakcije zbog anaerobnih uvjeta te reakcije hidrolize (poput štetne hidrolize konjugata izlučenih u žuči, koja ima za posljedicu enterohepatičko kruženje o kojem će biti više riječi u poglavlju **IZLUČIVANJE TOKSIKANATA**) i dehidroksilacije. Utvrđeno je da je toksičnost nekih ksenobiotika izravno ovisna o metaboličkim reakcijama koje provodi crijevna mikroflora (npr. **prevođenje nitroaromatskih spojeva u potencijalno karcinogene aromatske amine**). Moguće je da se uočena antikarcinogena svojstva probiotskih mliječnih bakterija, između ostalog, osnivaju na promjeni biotransformacijskih svojstava crijevne mikroflora. Naime, ove bakterije imaju nižu aktivnost enzima koji dovode do nastanka karcinogena, za razliku od uobičajenih crijevnih anaeroba. ©

Unutar stanice, enzimi I faze se nalaze prvenstveno u endoplazmatskom retikulumu (mreža povezanih kanalića u citoplazmi). Enzimi su vezani za membrane ER, i to je važno jer se lipofilne komponente zadržavaju u lipidnom matriksu membrana. Diferencijalnim centrifugiranjem se mogu izdvojiti mikrosomi (razoreni ER). © Zadnji supernatans je citosol u kojem se uglavnom nalaze enzimi II faze (mnogi važni biotransformacijski enzimi se nazivaju citosolnim ili mikrosomalnim). Nekolicina relevantnih enzima je smještena i u mitohondrijima, staničnoj membrani, lizosomima i izvanstaničnom prostoru (krv, slina).

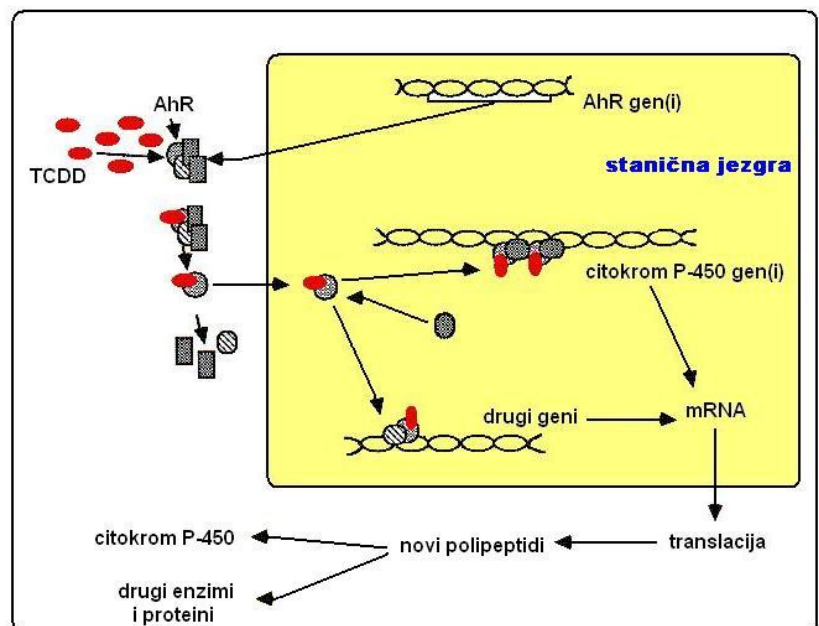
Indukcija biotransformacijskih enzima

Nakon djelovanja na životinje ili ljude kemikalijama dolazi do jačanja aktivnosti biotransformacijskih enzima što je posljedica povećanja brzine njihove sinteze, tzv. indukcije enzima. Ovaj proces je posredovan specijaliziranim bjelančevinastim molekulama u stanici, tzv. transkripcijskim faktorima (© vidi 'Gene switch' animaciju), koji se u konkretnom slučaju još nazivaju ksenosenzorima. Ksenosenzori, dakle, detektiraju izloženost stanice stranim tvarima te potiču sintezu enzima koji ih neutraliziraju.

Primjerice, **aromatski ugljikovodici** (poput TCDD, tj. dioksina, na slici) se vežu za tzv. **AhR receptor** (eng. **aromatic hydrocarbon receptor = receptor aromatskih ugljikovodika**) koji je u citosolu povezan s još najmanje tri dodatna

represorska proteina. Vežanjem aromatskog ugljikovodika dolazi do disocijacije tih proteina te nakupljanja kompleksa spoja i AhR u staničnoj jezgri. Povezivanje AhR kompleksa s određenim (ARNT) proteinom omogućuje vezanje za specifično mjesto u lancu DNA pored gena za citokrom P450 (CYP1A1) koji ima svojstvo hidroksilacije aril ugljikovodika. To potiče transkripciju gena (RNA polimerazom) i akumulaciju odgovarajuće mRNA čijom translacijom nastaje djelatni enzim.

Transkripcijski faktori relevantni u indukciji biotransformacijskih enzima su već spomenuti AhR, zatim CAR (constitutive androstane receptor), PXR (pregnane X receptor) i PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor) i svi uglavnom induciraju različite izoenzime citokroma P450. Nrf2 se također smatra ksenosenzorom jer reagira na oksidativni stres koji je često povezan s izloženošću toksikantima te, između ostalih, inducira glutation S-transferazu, epoksid hidrolazu, aldo-keto reduktazu, NAD(P)H-kinon oksidoreduktazu te glutamat-cistein ligazu koja sudjeluje u sintezi glutationa. ©



Prvenstveno se mogu inducirati citokromi P450, tj. mikrosomalni enzimi, dok se citosolni enzimi rjeđe i količinski slabije induciraju. Najpoznatiji induktori su policiklički aromatski ugljikovodici (benzo[a]piren, 3-metilkolantren ili 3-MC, 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin ili TCDD), fenobarbital, spojevi iz biljnih namirnica (indoli i glukozinolati (sulforafan) iz kupusnjača, organosumporni spojevi (luk), diterpeni iz kave), i dr.

Osim ukupne brzine metabolizma, indukcija enzima može značajno utjecati i na kvalitativne aspekte aktivacije tj. udio spoja koji se detoksificira u odnosu na udio koji postaje toksičniji od početnog spoja (utjecajem na regioselektivnost, stereoselektivnost, itd.). Npr., razni induktori potiču sintezu različitih izoenzima citokroma P450, a udjeli izoenzima koji mogu metabolizirati odabrani supstrat određuju i ukupni učinak metaboličkih reakcija. Od ukupne količine P450 proteina poslije indukcije 3-MC-om, otprilike 50% će činiti CYP1A1, 24% CYP1A2 itd. Poslije indukcije fenobarbitalom CYP2B1 će imati najveći udjel od 55%. Također, nastanak reaktivnih metabolita benzo[a]pirena u znatnoj mjeri ovisi o udjelu izoenzima citokroma P450 (npr. CYP3A4) koji spremno vrše epoksidaciju nastalih alkohola i diola. Utvrđena je i regioselektivnost u hidroksilaciji brombenzena nakon tretmana različitim induktorima, pri čemu je para oblik hepatotoksičan, za razliku od orto oblika. © Pokusima na životinjama utvrđeno je, pak, da indukcija metaboličkih enzima djeluje uglavnom zaštitno prilikom biotransformacije spojeva koji se mogu bioaktivirati u karcinogene.

Obzirom na činjenicu da pojedini enzimi istovremeno metaboliziraju endogene molekule, trajna indukcija enzima može poremetiti njihove uobičajene (homeostatske) razine, što je čest način izazivanja štetnog djelovanja toksikanata. Primjerice, pesticid atrazin inducira citokrom P450 koji prevodi testosteron u estrogen i time izaziva feminizaciju vodozemaca.

Utjecaj vrste i genetskih varijacija

Postoje kvalitativne razlike (npr. metabolički putevi karakteristični za vrstu, različiti enzimi, i sl.) (štakori bioaktiviraju kumarin u epoksid, dok ga ljudi detoksificiraju aromatskom hidroksilacijom), te kvantitativne razlike (razine enzima (slaba glukuronidacija i acetilacija kod pasa i mačaka), prirodnih inhibitora, i sl.) između vrsta i to je naročito relevantno u kontekstu ispitivanja toksičnosti tvari na životinjama.

Genetske varijacije ili genetski polimorfizmi označavaju postojanje nekoliko inačica određenog biotransformacijskog enzima u populaciji (npr., utvrđeno je postojanje desetak neaktivnih ili djelomično aktivnih varijanti gena CYP2D6). Prema genetskim polimorfizmima biotransformacijskih enzima, a time i metaboličkim kapacitetima, ljudi se, ugrubo, mogu podijeliti u ultrabrze, opsežne, osrednje ili slabe metabolizatore. Metabolički kapacitet ovisi o broju i vrsti alela za pojedini enzim (aleli su alternativne verzije gena; kao diploidni organizmi, ljudi imaju po dva gena za svako svojstvo; isti aleli = homozigoti; različiti aleli = heterozigoti). Tako ultrabrzi metabolizatori mogu imati duplicirane aktivne alele tj. one koji kodiraju za djelatni enzim (najčešće je riječ o tzv. 'wild type' ili divljem tipu gena koji je najrasprostranjeniji u populaciji), dok će slabi metabolizatori najčešće biti homozigoti za inaktivne alele. © Primjer P450 genetskog polimorfizma: osobe koje sporije vrše O-dealkilaciju fenacetina su izloženije većem toksikološkom riziku zbog alternativne pretvorbe u N-hidroksi fenetidini koji može uzrokovati methemoglobinemiju. Također, postoje brzi i spori acetilatori antituberkuloznog lijeka izoniazida (Europa: 40% populacije su brzi acetilatori, Azija: 80%). Azijska populacija ujedno češće ima polimorfizam alkohol dehidrogenaze (ADH2*2) sa znatno većim kapacitetom (visoki V_{max} po Michaelis-Menten enzimskoj kinetici) za alkohol od bjelačke populacije, u kojoj je najčešći alel (ADH2*1) sa sličnim, visokim afinitetom (niski K_m), ali manjim kapacitetom. Veći kapacitet podrazumijeva bržu razgradnju alkohola i nastajanje acetaldehida koji izaziva mučninu. Uočena je manja zastupljenost ADH2*2 kod kineskih alkoholičara, što bi moglo upućivati na slabiji metabolizam etanola kao genetsku predispoziciju alkoholizmu. © Tzv. nekonjugirane hiperbilirubinemije (poput Gilbertovog sindroma, 10% populacije) su bolesti kod pojedinaca kojima nedostaje UDP-glukuronoziltransferaza koja konjugira bilirubin, a smanjena je i sposobnost metabolizma nekih stranih tvari poput mentola i paracetamola.

Utjecaj spola i životne dobi

Mušjaci i ženke štakora (što nije utvrđeno i kod ostalih vrsta) se značajno razlikuju u biotransformaciji, uz smanjen kapacitet metabolizma ksenobiotika kod ženki (npr., paration je dvostruko toksičniji za ženke štakora). Utvrđeno je da su ove razlike povezane s djelovanjem (spolnih) hormona. Nakon što su ženke tretirane androgenim hormonima, biotransformacija postaje slična kao kod mužjaka. Kod ljudi su uočene razlike u osjetljivosti na različite toksikante (nikotin, etanol, benzodiazepini, estrogeni, acetilsalicilna kiselina, i dr.), ali se smatra da razlike mahom nisu genetski uvjetovane nego da se mogu pripisati anatomskim i fiziološkim činiocima koji utječu na apsorpciju, raspodjelu, i izlučivanje toksikanta. Npr., žene imaju manje tjelesne vode u odnosu na muškarca iste tjelesne mase te postižu više koncentracije u krvi unosom iste količine alkohola.

Fetalne i novookočene životinje imaju krajnje ograničene sposobnosti metabolizma ksenobiotika, što je, osim nedovoljne razvijenosti sustava koji utječu na apsorpciju, raspodjelu i izlučivanje stranih tvari, posljedica i malog metaboličkog kapaciteta Odrasli miševi: 100 µg heksobarbitala / g tjelesne težine = 1 h sna, novookočeni: 10 µg/g tj. t. = 6 h sna. Žutica se javlja u više od 50% novorođenčadi jer jetra još nema dovoljno glukuronoziltransferaza kojima se konjugira bilirubin (žuti pigment, produkt razgradnje hema iz hemoglobina), što mu ubrzava izlučivanje u žuč. Povećana osjetljivost na toksikante je uočena i kod starijih životinja. Smatra se da je to posljedica smanjenja biokemijskih i fizioloških funkcija kod starijih (smanjenje aktivnosti metaboličkih enzima i/ili slabija raspoloživost kofaktora), što utječe i na odgovor na toksikante.

Utjecaj okolišnih faktora

Nedostatak minerala (Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, Mo, Se, i dr.) i vitamina (C, E, B-kompleks) dovodi do slabljenja biotransformacijske funkcije zbog toga što su kofaktori i koenzimi metaboličkih enzima. Analogno, nedostatak bjelančevina u prehrani (zbog ograničene sinteze biotransformacijskih enzima) povećava toksicitet ksenobiotika koji su u početnom obliku aktivni, a smanjuje toksicitet ksenobiotika koji se bioaktiviraju. Nedostatan unos aminokiselina sa sumporom može smanjiti rezerve glutaciona te aktivnost glutation S-transferaza i glutation peroksidaza. Gladovanje se često koristi u toksikološkim istraživanjima jer se time smanjuje sadržaj probavnog trakta i pospješuje apsorpcija oralno unešenih kemikalija što podstiče i biotransformaciju, osim nekih reakcija druge faze. S druge strane, izgladnjivanje (>48 h) dovodi do supresije biotransformacije jer i pored dostatne količine enzima, oni ne djeluju odgovarajuće zbog niskog energijskog statusa životinja. Kako je već spomenuto gore, neki sastojci hrane i vode (kao i unos lijekova) utječu na biotransformaciju indukcijom enzima. Primjerice, spojevi iz povrća, policiklički aromatski ugljikovodici iz mesa s roštilja, aditivi, ostaci pesticida, i sl. Poslije obroka s kupusom i prokulicama (općenito biljkama iz porodice kupusnjača), utvrđena je 2-3 puta niža koncentracija fenacetina u krvi tih ispitanika u odnosu na kontrole, zbog indukcije citokroma P450 (glukozinolatima i produktima) koji ga metaboliziraju. ©

Izloženost okolišnim kontaminantima također može modulirati sposobnost biotransformacije zbog indukcije enzima. Ustanovljeno je da pušači brže metaboliziraju neke toksikante (lijekove), kao i radnici u tvornicama kemikalija poput pesticida.

Okolišni kontaminanti, lijekovi, sastojci hrane, i dr., često mogu smanjiti sposobnost enzima da metaboliziraju ksenobiotike. Mehanizmi uključuju kompetitivnu ili nekompetitivnu inhibiciju enzima, vezanje za kofaktore ili utjecaj na njihovu sintezu ili razgradnju, itd. Npr., sastojci grejpa inhibiraju neke citokrome P450, CO ili cijanid se vežu za Fe²⁺ hema u citokromima, kobalt ili olovo mogu inhibirati sintezu hema, i sl. Etanol je kompetitivni inhibitor razgradnje metanola alkohol dehidrogenazom jer ima veći afinitet za enzim.

Varijacije neuroendokrine funkcije pod utjecajem cirkadijalnog ritma (tzv. unutarnji sat u hipotalamusu koji prilagođava stanje organizma dnevnim i sezonskim varijacijama svjetla i mraka u okolišu razdvajajući kataboličke i anaboličke procese) također mogu utjecati na aktivnost pojedinih metaboličkih enzima (npr. glutacion S-transferaza).

ENZIMSKE REAKCIJE I FAZE

Reakcije I faze uključuju: reakcije oksidacije, redukcije te hidrolitičke reakcije. U nastavku će detaljnije biti opisani samo najznačajniji metabolički enzimi svake skupine.

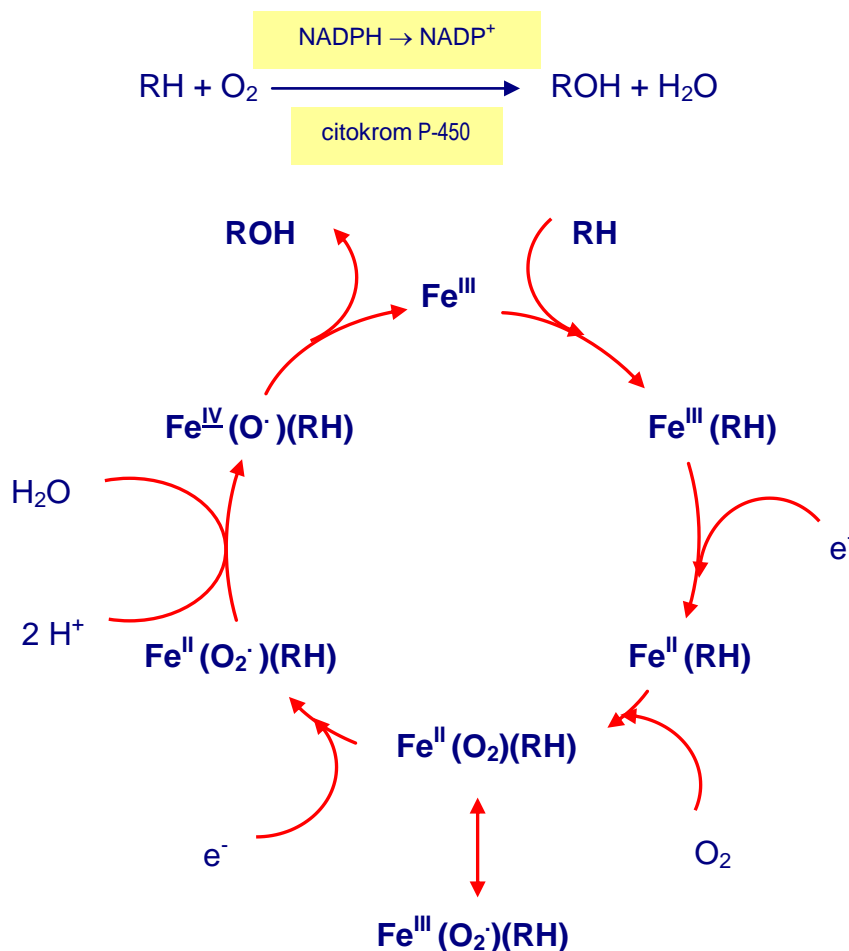
Reakcije oksidacije i redukcije

Enzimi koji ih provode uključuju citokrome P450, monooksigenaze ovisne o flavinu, dioksigenaze, amin oksidaze, alkohol dehidrogenaze, aldehyd dehidrogenaze, aldo-keto reduktaze, ksantin i aldehyd oksidazu, peroksidaze, NAD(P)H-kinon oksidoreduktaze, i dr.

Citokromi P450

Ovo je najvažnija skupina enzima u metabolizmu stranih spojeva i točniji naziv im je: monooksigenaze ovisne o citokromu P450. Smješteni su u endoplazmatskom retikulumu i sastoje se od dva enzima: NADPH-citokrom P450 reduktaze (flavoprotein reduktaza) i citokroma P450 s hemom (porfirinska jezgra & Fe) kao kofaktorom. ©

Princip djelovanja:

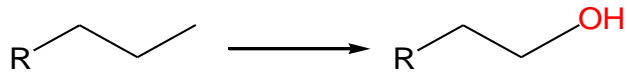


Pojašnjenje katalitičkog ciklusa: oksidirani citokrom P450 (Fe^{3+}) se povezuje s toksikantom u kompleks; NADPH daje elektron flavoprotein reduktazi, koja zatim reducira nastali kompleks (Fe^{2+}). Drugi elektron iz NADPH preko iste flavoprotein reduktaze (ili preko citokroma b5 uz citokrom P450 reduktazu ili citokrom b5 reduktazu) reducira molekularni kisik, pri čemu nastaje kompleks tzv. aktiviranog kisika, spoja i citokroma P450. Dolazi do prijenosa aktiviranog kisika na toksikant uz nastanak oksidiranog produkta, dok dva elektrona ostaju na drugom atomu kisika koji uz dva protona daje molekulu vode.

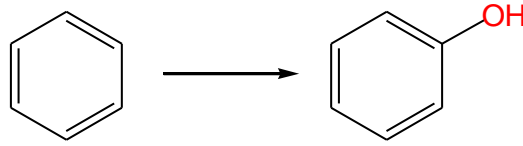
Snažna oksidacijska moć 'aktiviranog kisika' omogućava oksidaciju širokog opsega supstrata. Jedino zajedničko strukturno svojstvo toksikanata koje metabolizira ovaj enzimni kompleks je velika lipofilnost. Specifičnost za supstrate je vrlo mala. Postoji veći broj izoenzima citokroma P450 (60ak kod ljudi; označavaju se kraticama CYP2B1, CYP3A4, itd.) koji kataliziraju niz različitih reakcija. Isti spoj s različitim izoenzimima može dati različite produkte (npr. benzo[a]piren). Značajno svojstvo im je i inducibilnost tj. povećana sinteza potaknuta izloženošću stanice spojevima koje mogu metabolizirati. ©

Primjeri oksidativnih reakcija kataliziranih citokromima P450:

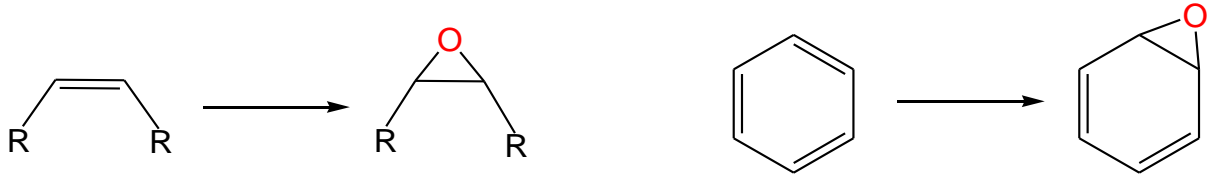
Alifatska hidroksilacija



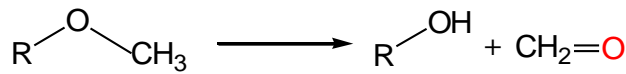
Aromatska hidroksilacija



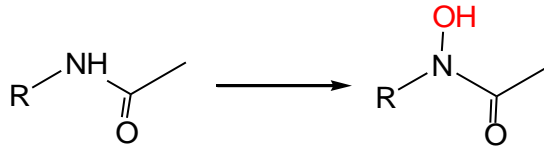
Epoksidacija



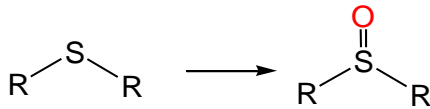
Dealkilacija heteroatoma (N, O, S)



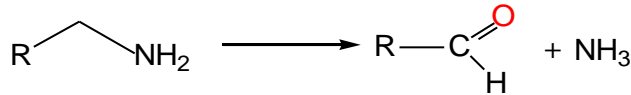
N-hidroksilacija



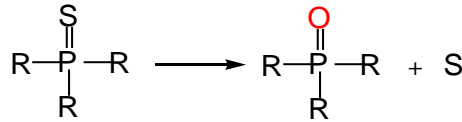
Sulfoksidacija



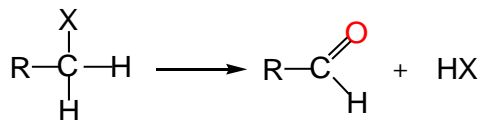
Deaminacija



Desulfuracija

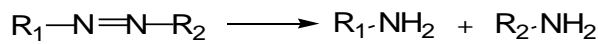


Dehalogenacija

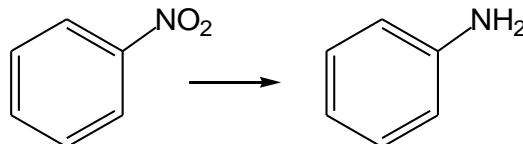


Kod reduktivne biotransformacije uz citokrom P450 elektrone prima supstrat, a ne kisik, te su ovakve reakcije moguće jedino u uvjetima niskog parcijalnog pritiska kisika (poput uvjeta rasta crijevne mikroflore). Primjeri:

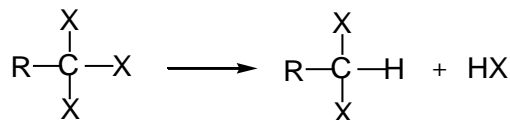
Azo redukcija



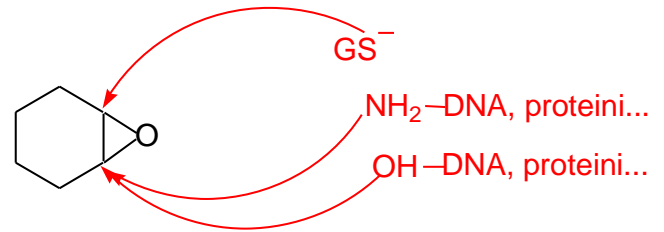
Aromatska nitro redukcija



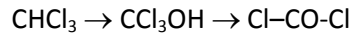
Reduktivna dehalogenacija



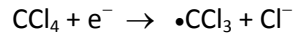
Najčešća bioaktivacijska reakcija citokromima P450 je uvođenje epoksida na dvostruku vezu. Epoksidi su reaktivni elektrofilni spojevi koji s nukleofilima stvaraju kovalentne veze. Ako je nukleofil (npr. SH, NH₂, OH i sl. skupine) dio važne makromolekule poput DNA, proteina, i sl., nastala biokemijska lezija može dovesti do različitih patoloških promjena, uključujući rak.



Oksidativnom dehalogenacijom također mogu nastati elektrofilni. Npr., iz kloroforma oksidacijom preko nestabilnog triklorometanola nastaje fozgen koji je snažan alkilirajući agens zbog elektrofilnog atoma ugljika:



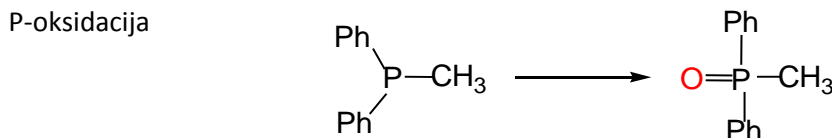
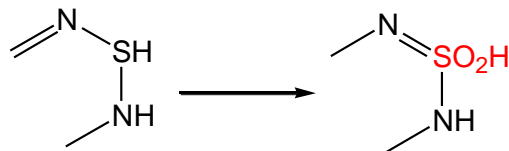
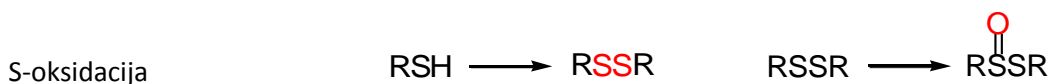
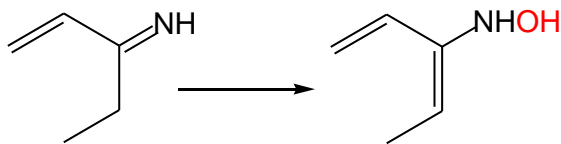
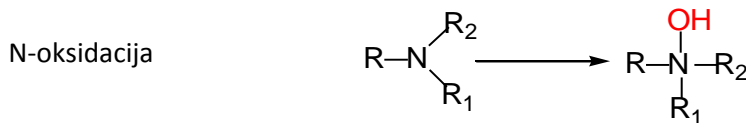
Reduktivnom dehalogenacijom specifičnih halogeniranih alifatskih spojeva mogu nastati slobodni radikali:



Dodatni primjeri bioaktivacije citokromom P450 nalaze se u prezentacijama predavanja. ©

Monooksigenaze koje sadrže flavin

Flavin monooksigenaze (najmanje pet izoenzima, FMO1-FMO5) su smještene u endoplazmatskom retikulumu, a ime su dobile zbog činjenice da sadrže FAD kao kofaktor. Obično kataliziraju reakcije oksidacije (reduciraju FAD uz NADPH, prenose elektrone na molekulu kisika uz nastanak vode i prenose atom kisika na supstrat) na N, S ili P atomu organskih molekula, ali i anorganskih tvari (jod, jodid, jodati, sulfidi, tiocijanati, selenidi, itd.), pri čemu mnoge od ovih reakcija provodi i citokrom P450, npr.:



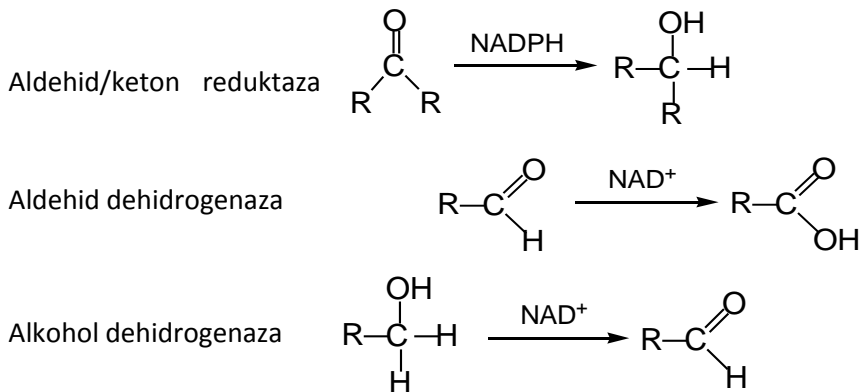
Amin oksidaze

Monoamin oksidaze (izoenzimi MAO A i MAO B, te SSAO - amin oksidaza osjetljiva na semikarbazid), diamin oksidaze (DAO) i poliamin oksidaze (PAO), dovode do oksidativne deaminacije (MAO i PAO: isti princip kao kod gornjeg primjera oksidativne deaminacije citokromom P450, osim što atom kisika potječe iz vode; FAD je kofaktor koji se najprije reducira, a zatim reoksidira redukcijom molekule kisika u H₂O₂; DAO i SSAO: Cu kao kofaktor). Glavna uloga ovih nemikrosomalnih enzima (smještenih u mitohondrijskoj membrani) je razgradnja endogenih biogenih amina (adrenalin, dopamin, histamin, serotonin, itd.) ©, ali mogu metabolizirati i strane spojeve s amino

skupinom ili biogene amine iz hrane (dopamin, fenetilamin, histamin, tiramin, itd.), te značajno pridonose razgradnji amina apsorbiranih iz hrane u stanicama crijevne sluznice (učinak prvog prolaza).

Oksidacijsko-redukcijski sustavi za alkohole, aldehide i ketone

Uključuju enzime poput aldo-keto reduktaza te alkohol i aldehyd dehidrogenaza:



Ostali važni enzimi u oksidoredukciji toksikanata i njihovih produkata

Ksantin oksidaza i aldehyd oksidaza. Oksidiraju ksantine uz nastajanje keto skupine (npr. pretvorba ksantina u mokraćnu kiselinu), ali i druge spojeve uz oksidaciju karbonilne u karboksilnu skupinu, i sl. ☺

Superoksid dismutaza (SOD). Katalizira pretvorbu superoksid radikala ($\text{O}_2^- \cdot$) u molekularni kisik i vodikov peroksid. ☺ Superoksid anion nastaje i endogeno (prijenosom jednog elektrona na molekularni kisik), npr. u respiratornom lancu, ili ga proizvode fagociti tijekom imunološke reakcije.

Katalaza (CAT) razgrađuje vodikov peroksid. ☺ Može provoditi i tzv. peroksidativnu reakciju (oksidacija alkohola, formaldehida i sl. spojeva): $\text{RH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{R} + 2 \text{H}_2\text{O}$

Glutation peroksidaze (GPX) uz glutation kao kofaktor reduciraju organske perokside i vodikov peroksid. ☺

NAD(P)H kinon oksidoreduktaze (NQO) kataliziraju redukciju kinona u hidrokinone. Polovična redukcija kinona (NADPH citokrom P450 reduktazom) daje reaktivne semikinon radikale koji izazivaju oksidativni stres reakcijom s O_2 čime stvaraju reaktivne vrste kisika. ☺

Prostaglandin H sintetaze ili ciklooksigenaze (COX). Sastavni su dio puta biosinteze prostaglandina, ali mogu oksidirati i neke toksikante (npr. paracetamol, benzo[a]piren).

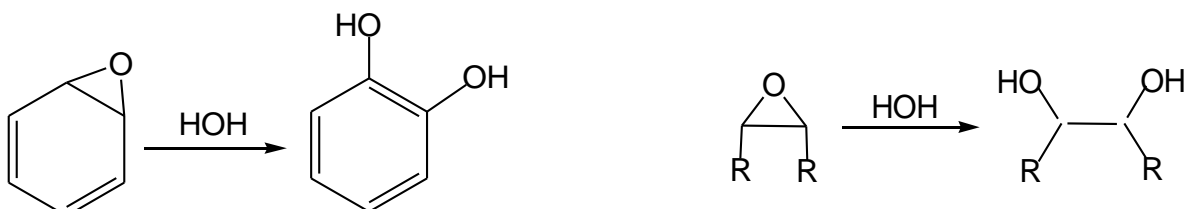
Peroksidaze (tiroidna peroksidaza, eozinofilna peroksidaza, mijeloperoksidaza, laktoperoksidaza, i dr.). Također razgrađuju vodikov peroksid i organske (lipidne) perokside, uz opću reakciju: $\text{ROOR}' \rightarrow \text{R-OH} + \text{R}'\text{-OH}$ ☺

Reakcije hidrolize

Relevantni enzimi uključuju karboksilesteraze, epoksid hidrolaze, paraoksonaze (hidroliziraju estere fosfatne kiseline, tzv. paraoksone, laktone, i slične molekule ☺), peptidaze, kolinesteraze (najpoznatiji predstavnik, acetilkolinesteraza (AChE), hidrolizira acetilkolin koji je važna signalna molekula u živčanom sustavu ☺, ali ovaj i srodni enzimi mogu hidrolizirati i velik broj sličnih spojeva), alkalne fosfataze (hidroliziraju fosfatnu skupinu spojeva ☺).

Epoksid hidrolaze

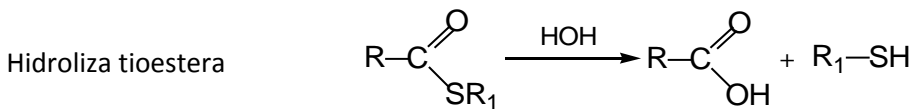
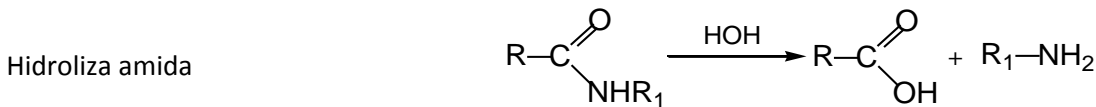
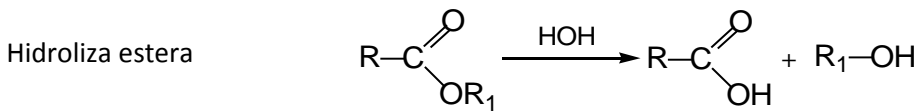
Kataliziraju hidraciju aren oksida i alifatskih epoksida. Elektrofili epoksidi nastaju biotransformacijama koje provode citokromi P450. Hidracijom nastaju dioli koji su manje elektrofili i time manje reaktivni od epoksida.



Postoji mikrosomalni (vezan za ER) i citosolni oblik epoksid hidrolaza koji se nadopunjuju po specifičnosti za supstrate. Na prije spomenutom primjeru benzo[a]pirena je zapravo utvrđeno da su najreaktivniji metaboliti (u smislu nastanka tzv. DNA adukata tj. sposobnosti vezanja za DNA) diolepoksidi, koji nastaju naizmjeničnim reakcijama epoksidacije i hidrolize epoksida. Najreaktivniji su ni koji nastaju u tzv. 'zaljevskom području' (C7-C11 molekule).

Karboksilesteraze

Oslobađaju COOH skupinu uz nastajanje amina, alkohola i tiola koji se dalje konjugiraju. Kataliziraju tri skupine reakcija:



ENZIMSKE REAKCIJE II FAZE

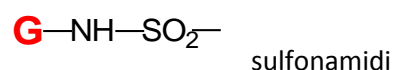
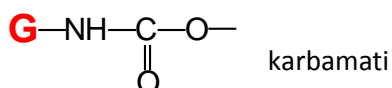
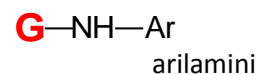
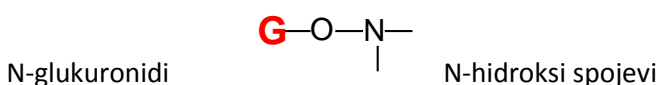
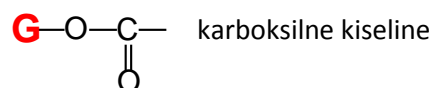
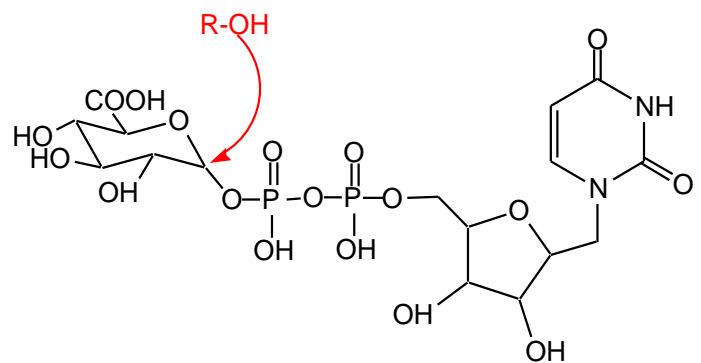
Za provedbu ovih biosintetskih reakcija (između endogenih molekula i stranih tvari) je potrebna energija što se postiže aktivacijom kofaktora (u jednom slučaju i supstrata) u visokoenergetske međuprodukte. Nastali konjugati su, u pravilu, vodotopljiviji od produkata biotransformacije enzimima I faze, što produktima uvelike pospješuje izlučivanje putem žuči (glukuronidi, glutationski konjugati) ili urina (glukuronidi, sulfati, aminokiselinski konjugati, glutationski konjugati). Konjugati su supstrati hidrolitičkih enzima crijevne mikroflora (vidi odlomak o enterohepatičkom ciklusu u poglavlju **IZLUČIVANJE U ŽUČI**) ili su nestabilni te se raspadaju (npr. uslijed kiselog pH urina).

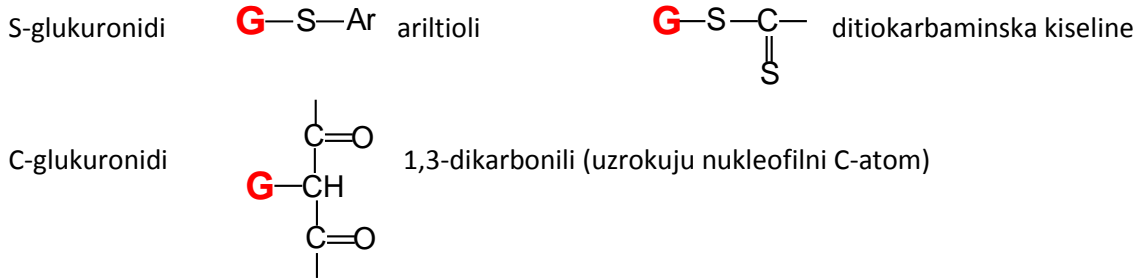
Glukuronoziltransferaze

Provode najvažniju konjugaciju kod sisavaca. Nalaze se u ER-u nasuprot većini enzima II faze.

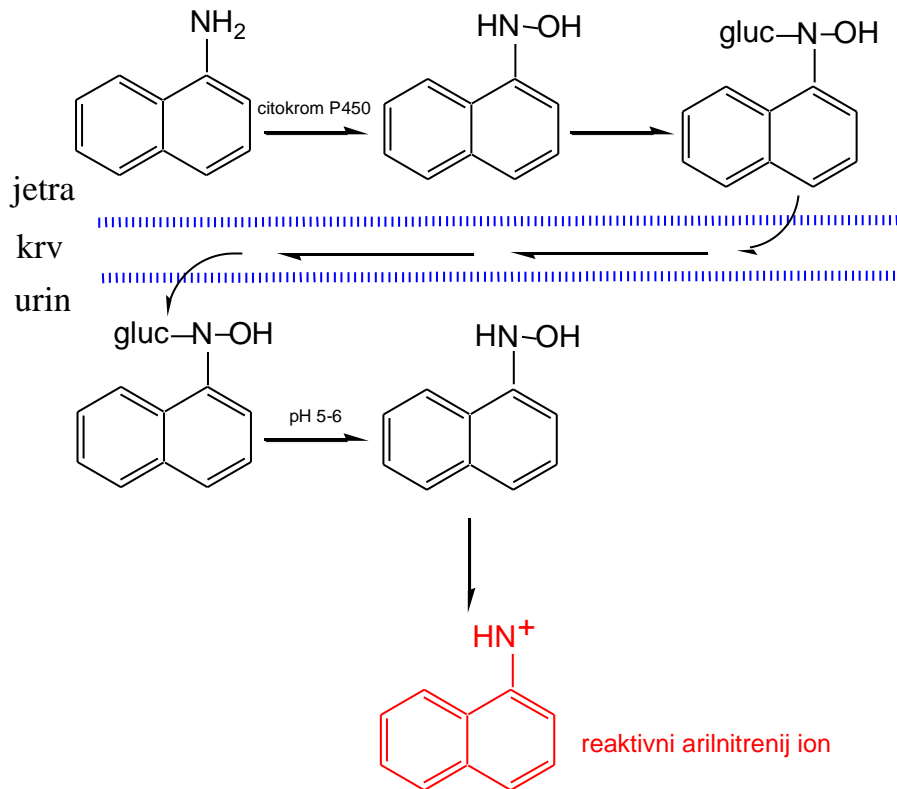
UDP-glukuronoziltransferaze (UGT) kataliziraju reakciju između glukuronske kiseline (povezane na visokoenergetski nukleotid UDP) i funkcionalne skupine akceptorske molekule.

Reakcije koje ovi enzimi kataliziraju mogu se podijeliti prema tipovima glukuronida koji nastaju napadom nukleofilnog atoma toksikanta (O, N, S, C) na elektrofilni C atom u molekuli glukuronske kiseline. ©



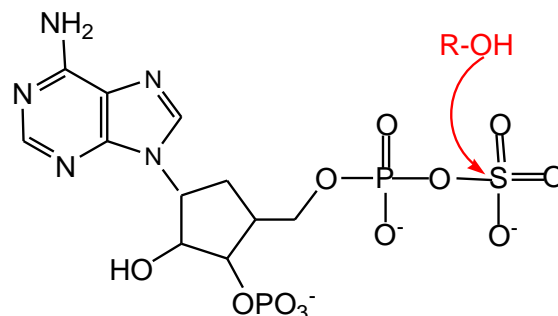


Glukuronidni konjugati ponekad mogu biti reaktivne molekule (npr. acil-glukuronidi iz Voltarena). Glukuronidacija ima i neizravnu ulogu u metaboličkoj aktivaciji jer se neki toksikanti u obliku glukuronida transportiraju do mjesta djelovanja, gdje se razgrađuju uz nastajanje reaktivnih spojeva. Aromatski amini se uz citokrome P450 prevode u karcinogene N-hidroksiarilamine. Ovi uz UGT daju N-glukuronide koji se transportiraju u mokraćni mjehur gdje se spontano, u kiselom urinu, oslobađaju N-hidroksiarilamini koji su nestabilni te se mogu razgraditi u reaktivne elektrofile.




Sulfotransferaze

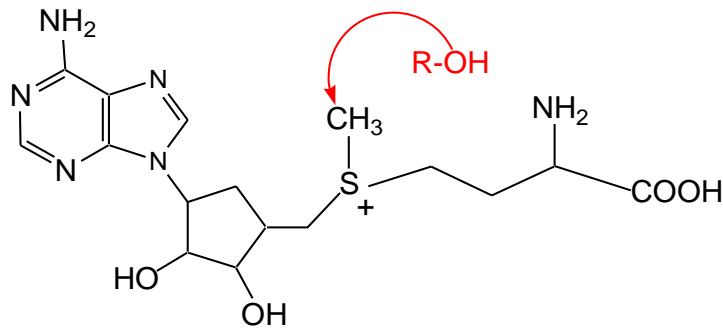
SULT izoenzimi prenose anorganski sulfat na OH (fenoli, alkoholi) P i NH_2 -skupine (alifatski i aromatski amini, hidroksilamini) toksikanata (nukleofilni atomi toksikanta napadaju elektrofilni atom S u sulfatu). Kofaktor je PAPS (3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat).



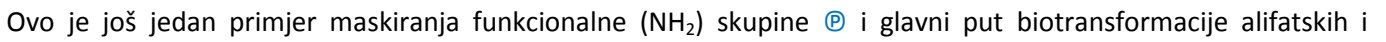
Konjugati toksikanata sa sulfatom su ponekad nestabilni pa se razgrađuju uz nastanak reaktivnih produkata. P

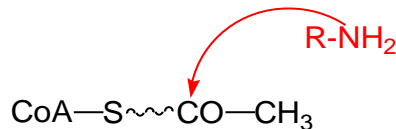
Metiltransferaze

Ovi enzimi (MT) su važni u metabolizmu endogenih spojeva, pa će sličnost tim supstratima uvjetovati metabolizam ksenobiotika. Metilacija maskira funkcionalnu skupinu (OH (fenoli, alkoholi), NH₂ (alifatski i aromatski amini) i SH-skupine), te smanjuje topljivost u vodi i daljnju konjugaciju. Prednost je smanjenje reaktivnosti nastalih spojeva. Enzimi su N-metil, S-metil i O-metil transferaze. **Primjerice, katehol O-metil transferaza (COMT) je enzim koji razgrađuje endogene i strane spojeve s kateholaminskom građom poput neurotransmitera dopamina, adrenalina, noradrenalina, ili flavonoida. N-metil transferaze sudjeluju u biotransformaciji nikotina i histamina, dok As3MT metilira anorganske spojeve arsena.** 




N-acetil transferaze

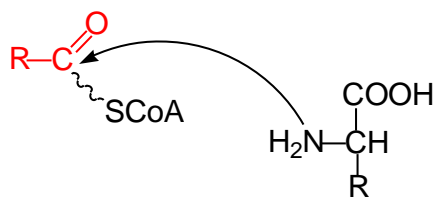
Ovo je još jedan primjer maskiranja funkcionalne (NH₂) skupine  i glavni put biotransformacije alifatskih i arilamina, hidrazina (R-NH-NH₂), sulfonamida (R-SO₂-NH₂), i dr. Kofaktor NAT je koenzim A (nukleofilni atom dušika toksikanta napada elektrofilni C atom acetilne skupine).



Primjer bioaktivacije ovim enzimima pregradnjom nastalih acetiliranih toksikanata: 


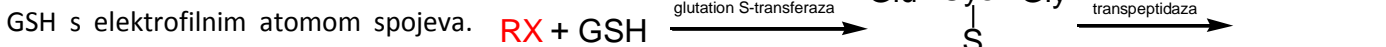






N-acil transferaze

Vrše konjugaciju toksikanta s aminokiselinama formiranjem amida između COOH skupine toksikanta (npr. aromatske i heterocikličke karboksilne kiseline, ariloctene kiseline, itd.) i NH₂ skupine jedne od endogenih aminokiselina (kod ljudi: glicin, glutamin, taurin (NH₂-CH₂-CH₂-SO₃⁻, za konjugaciju žučnih kiselina); kod ptica i reptila: ornitin, i dr.).  Dvije osnovne reakcije su:



1-aktivacija toksikanta u tioesterski derivat koenzima A (uz ATP-ovisne kiselina-CoA ligaze) i 2-prijenos acila tioestera koenzima A na amino skupinu aminokiseline (uz N-acil transferaze).

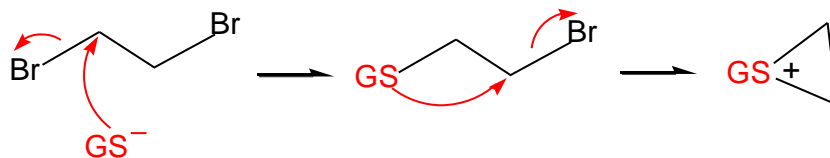
Glutation S-transferaze

GST enzimi kataliziraju početni korak u stvaranju derivata N-acetilcisteina (to su tzv. merkapturne kiseline), povezivanjem nukleofilne SH-skupine GSH s elektrofilnim atomom spojeva. **RX + GSH**  **Glu-Cys-Gly**  **Glu-Cys-Gly**  **Cys-Gly**  **Cys**  **Cys**  **NH-C(=O)-CH3**  **Cys** 

transferaze. Citokromi P450 često stvaraju jako reaktivne elektrofilne spojeve koji se mogu kovalentno vezati za različite makromolekule stanice, ili se mogu vezati za GSH. ☹️ Kod visokih doza ksenobiotika može doći do iscrpljivanja zaliha GSH, pa gomilanje elektrofila dovodi do toksičnih učinaka (uočeno u slučaju paracetamola, brombenzena, itd.).

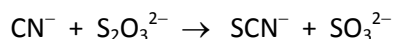
Osim kataliziranja reakcije između toksikanta i GSH, glutation S-transferaze mogu vezati elektrofile na površinu enzima (što može i ne mora inhibirati katalitičku aktivnost enzima) ili aktivno mjesto enzima (stvaraju se kovalentne veze koje inhibiraju enzim), čime se sprječava vezanje elektrofila za nukleofilna mjesta važnih makromolekula. Ova 'ligandinska' aktivnost nekih izoenzima GST predstavlja dodatni detoksikacijski mehanizam.

Konjugacija 1,2-dihaloetana sa GSH je primjer bioaktivacijske reakcije katalizirane GST-om:



Tiosulfat S-transferaza

TST ili rodaneza je lokalizirana u mitohondrijima i provodi detoksikaciju cijanida (cijanid nastaje uobičajenim staničnim metabolizmom (npr. razgradnjom vitamina B₁₂), a ima ga i u hrani (tzv. cijanogeni glikozidi u gorkim bademima, sijeku, kasavi, itd.) i duhanskom dimu) po reakciji:



Atom S se prenosi s tiosulfata na cijanid, pri čemu nastaje znatno manje toksični tiocijanat.

IZLUČIVANJE TOKSIKANATA

Fizikalno-kemijska svojstva tvari i metabolita su najvažnije odrednice načina i brzine izlučivanja. Najviše se toksikanata izlučuje preko bubrega (urinom). Nešto toksikanata se izlučuje preko jetre u žuči (DDT, Pb), dok se plinovi (CO) i neke hlapljive tvari (dimetilselenid, kloroform) izlučuju preko pluća. Vrlo male količine se izlučuju putem ostalih tjelesnih izlučevina (znoj, mlijeko, suze, probavni sokovi, sjemena tekućina).

Tvari koje su u početnom obliku hidrofilne se odmah mogu izlučiti putem žuči ili urina. Ostale tvari se prethodno biotransformiraju u vodotopljive oblike. Nastaju konjugati koji su hidrofilni i čiju ekskretornu sudbinu određuju transportni proteini koji im omogućavaju prijelaz preko staničnih membrana te ih usmjeravaju prema urinu ili žuči. Mogući putevi izlučivanja toksikanta konjugiranog u stanicama jetre su: hepatocit --> krv --> bubrezi (urin) ili hepatocit --> žuč --> tanko crijevo (feces). Veličina molekule utječe na put izlučivanja te će se konjugati spojeva veće molekulske mase uglavnom izlučivati putem žuči:

Spoj	Mr	Udio ukupno izlučene količine (%)	
		Urin	Žuč
Bifenil	154	80	20
4-Monoklorobifenil	188	50	50
4,4'-Diklorobifenil	223	34	66
2,4,5,2',5'-Pentaklorobifenil	326	11	89
2,3,6,2',3',6',-Heksaklorobifenil	361	1	99

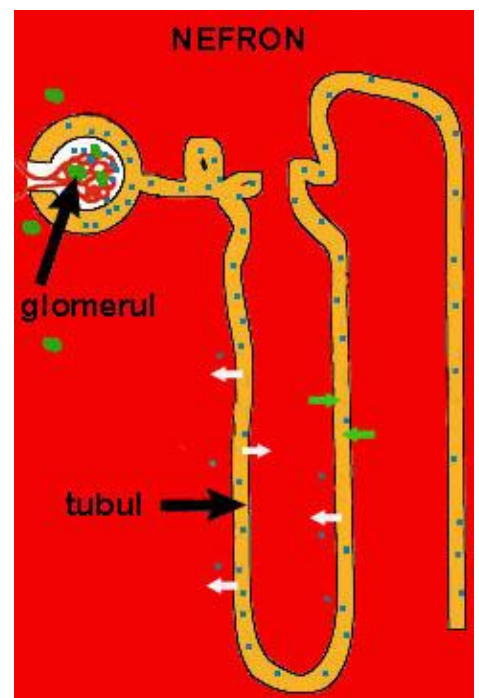
Životno doba, spol, zdravlje, genetski polimorfizmi, prehrana, i okolišni faktori mogu utjecati i na izlučivanje ksenobiotika. Starija životna dob, bolest ili oštećenje jetre ili bubrega slabe bilijarnu odnosno urinarnu ekskreciju. Ekskretorni sustavi jetre i bubrega (npr. sustavi aktivnog transporta) nisu potpuno razvijeni kod novorođenčadi, što, u većini slučajeva, podrazumijeva veću toksičnost nekih tvari nego za odrasle. Genetske varijacije mogu, npr., utjecati na kapacitet sustava aktivnog transporta toksikanata, ali već se i razlike u metabolizmu stranih tvari mogu odraziti na izlučivanje. Metaboliti mogu biti reaktivni spojevi koji će se duže zadržati u organizmu zbog interakcija s tkivnim sastojcima ili mogu koristiti drukčije puteve izlučivanja. **Utvrđena je razlika u brzini izlučivanja antipirina kod neidentičnih, za razliku od para identičnih blizanaca.** Jačanje ekskretorne funkcije jetre je utvrđeno nakon tretiranja s nekim tvarima (fenobarbital) koje induciraju biotransformacijske enzime što povećava tok žuči i izlučivanje pojedinih toksikanata. Slično (indukcijom ili inhibicijom metaboličkih enzima) djeluju tvari iz hrane i okoliša. **Primjerice, spojevi iz grejpa inhibiraju citokrome P450 i/ili P-glikoprotein što može značajno usporiti izlučivanje nekih toksikanata.**

IZLUČIVANJE URINOM

Toksikanti se mokraćom izlučuju istim mehanizmima kojima se preko bubrega izlučuju produkti metabolizma, a koji uključuju: glomerularnu filtraciju, tubularno izlučivanje i tubularnu reapsorpciju. **Osnovna strukturna jedinica bubrega je nefron koji se sastoji od glomerula i tubula (na slici).**

Glomerularna filtracija

Kroz pore glomerularnih kapilara \otimes prolaze molekule sa Mr manjom od 60000. Proteini plazme i toksikanti vezani za njih ostaju u plazmi, dok 20% slobodnog oblika toksikanta odlazi sa 20% vode plazme u filtrat.



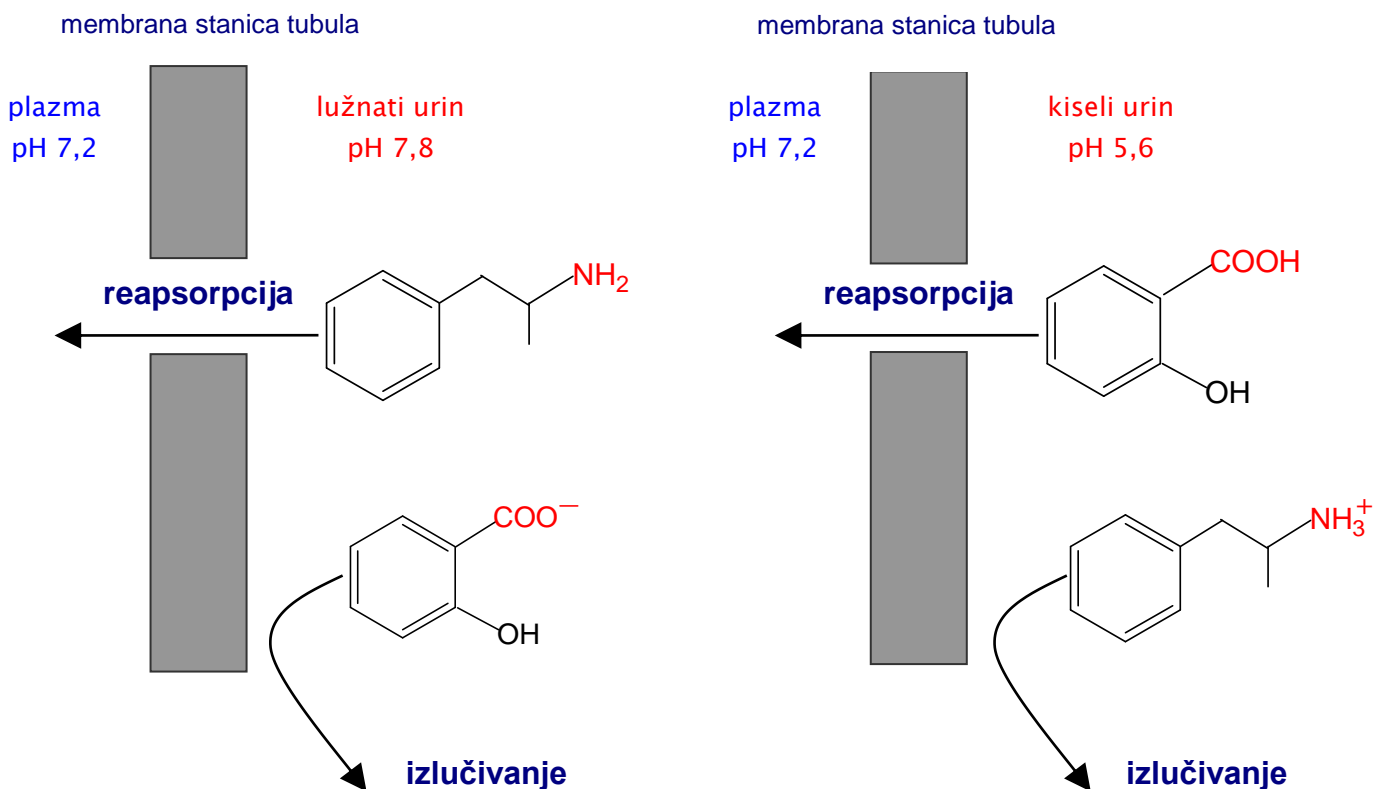
Tubularno izlučivanje

Stanice tubula bubrega imaju nekoliko sustava aktivnog transporta (smjer: krv --> stanice tubula --> glomerularni filtrat tj. urin), među kojima su najvažniji transporteri organskih aniona tj. kiselina (OAT), transporteri organskih kationa tj. baza (OCT), OATP (koji transportiraju anione, katione i neutralne molekule), MRP, BCRP proteini te P-glikoprotein. Ⓢ Ovi sustavi su ograničenog kapaciteta i relativno niske specifičnosti, te se različiti spojevi natječu za njih. Penicilin se izlučuje sustavom za organske kiseline, pa je za vrijeme 2. svjetskog rata tražena kiselina (probenecid) koja će se natjecati s penicilinom za renalnu ekskreciju, da bi se time produžio njegov poluživot i djelovanje. Također, ovi transportni sustavi prepoznaju metabolite i konjugate koji nastaju biotransformacijskim reakcijama.

Obzirom na vrlo brzu disocijaciju toksikanta s proteina plazme (uslijed smanjenja koncentracije slobodnog oblika toksikanta u plazmi), i strane tvari koje imaju visok afinitet vezanja za ove proteine se mogu (glomerularnom filtracijom i tubularnim sustavima aktivnog transporta) gotovo potpuno ukloniti iz krvi jednim prolaskom kroz bubrege.

Tubularna reapsorpcija

Glomerularni filtrat na putu prema mokraćnom mjehuru prolazi kroz tubul u kojima se odvijaju procesi reapsorpcije. Ovi uključuju aktivni transport važnih hranjivih tvari (npr. glukoza, aminokiseline, voda, Na^+ , Cl^-) koje mogu koristiti toksikanti slične građe. Ⓢ Primjerice, ohratoksin A koristi OAT5 nosač za reapsorpciju iz glomerularnog filtrata. Upravo bi koncentriranje ovog mikotoksina u stanicama tubula moglo objasniti njegov nefrotoksični učinak. Pinocitozom se reapsorbiraju male molekule proteina koje su prošle pore glomerula. Ovako se reapsorbira kompleks metalotioneina i Cd (vidi RASPODJELA TOKSIKANATA), što je možda povezano s nefrotoksičnošću Cd. Također, lipofilne tvari se mogu reapsorbirati difuzijom kroz stijenke stanica tubula u krv. Na lipofilnost organskih kiselina i baza utječe pK_a funkcionalnih skupina i pH urina. Ⓢ Općenito će se bazični toksikanti izlučivati (tj. neće se reapsorbirati) kad je urin kisel, dok će se kiseli spojevi jače izlučivati kad je urin alkaličan. Fenobarbital ($\text{pK}_a=7,2$) će se reapsorbirati u kiselom urinu (nedisocirana karboksilna skupina: R-COOH), dok će se izlučivati kod lužnatog pH urina (R-COO^-). Stoga se trovanje istim lijekom alkalizacijom urina sa NaHCO_3 . Na slici su adekvatni primjeri salicilne kiseline i amfetamina.



IZLUČIVANJE U ŽUČI

Krv iz probavnog trakta prolazi kroz jetru prije ulaska u sistemsku cirkulaciju. Protok krvi kroz jetru je sporiji od protoka u drugim organima što lipofilnim sastojcima apsorbiranim u probavnom traktu daje dovoljno vremena za aktivni transport (prvenstveno OAT, OCT, OATP) [Ⓢ] ili difuziju preko staničnih membrana hepatocita. Time se uklanjaju toksikanti iz krvi i sprječava njihova raspodjela u druge dijelove tijela. Jetra je i glavno mjesto metabolizma toksikanata, pa se nastali metaboliti i/ili konjugati mogu izlučiti izravno u žuč ili u krv odakle dospijevaju do bubrega, te se izlučuju u urin. Žuč se skuplja u žučnom mjehuru i izlučuje u tanko crijevo. U idealnom slučaju, ti toksikanti nastavljaju put do debelog crijeva, te se izlučuju fecesom.

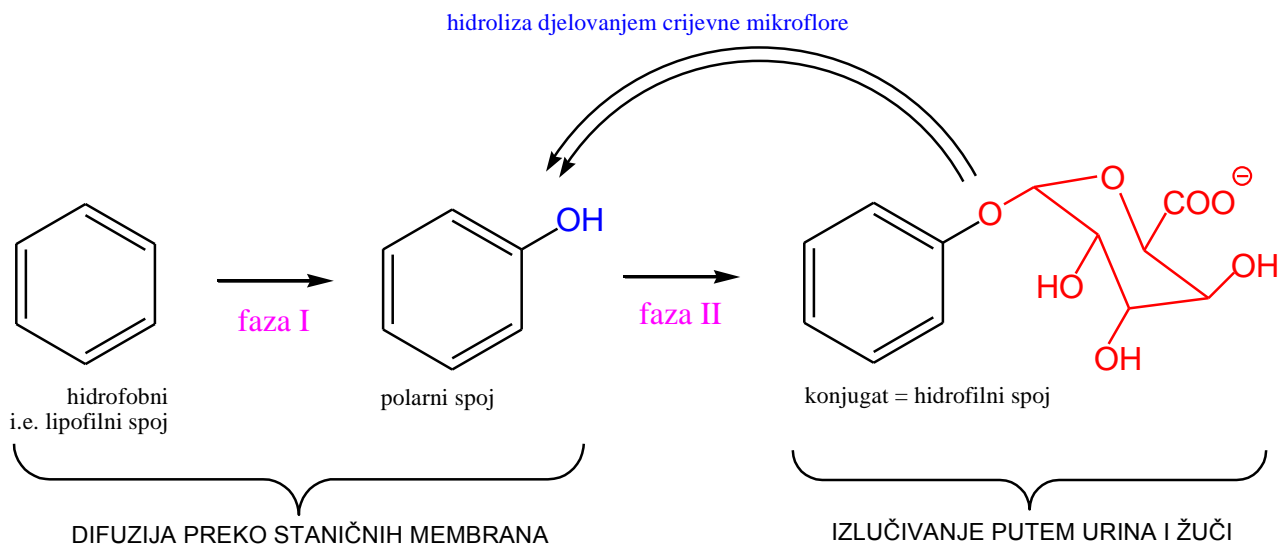
Postoje tri razreda tvari koje se izlučuju u žuč (podjela prema odnosu koncentracija u žuči i plazmi):

<1	albumin, Zn, Fe, Cr, ...
1	Na, K, glukoza, Cd, Hg, Cs, Co, ...
>1	žučne kiseline, bilirubin, Pb, As, Mn, ...

Odnos koncentracija u trećoj skupini je obično između 10 i 1000, te upućuje na aktivni transport (**bilirubin: žutica se često javlja nakon oštećenja jetre**). Ovdje važnu ulogu imaju transportni proteini poput P-glikoproteina, MRP proteina, BCRP, itd. [Ⓢ] Utvrđeno je da polimorfizam gena koji kodiraju ove proteine značajno utječe na potrebnu terapijsku dozu nekih lijekova (**ciklosporin A: zbog manje ekspresije djelatnog P-glikoproteina u jetri sporije je izlučivanje lijeka**). Međutim, tvar ne mora biti visoko koncentrirana u žuči da bi njena bilijarna ekskrecija bila važna. Primjerice, Hg se ne koncentrira u žuči, ali je to glavni put izlučivanja Hg.

Žuč se može smatrati glavnim putem izlučivanja velikih molekula (za razliku od urina) i konjugata koji nastaju biotransformacijom toksikanata.

Izlučivanje toksikanata putem žuči može usporiti tzv. enterohepatički ciklus do kojeg dolazi djelovanjem intestinalne mikroflore koja, izlučivanjem enzima u svoje okruženje, može hidrolizirati različite konjugate nastale biotransformacijom. Obnova lipofilnog karaktera toksikanta omogućuje reapsorpciju u crijevima:



Npr., glukuronidi izlučeni u žuči su supstrati β -glukuronidaze (koja hidrolizira vezu između glukuronske kiseline i toksikanta). Crijevna mikroflora ima ovaj enzim, pa je moguće oslobađanje toksikanta iz konjugata i reapsorpcija difuzijom nakon koje toksikant ponovno dospijeva u jetru itd.



Enterohepatičko kruženje može znatno produžiti vrijeme zadržavanja toksikanta u organizmu te se kod liječenja trovanja nekim tvarima nastoji prekinuti ciklus radi ubrzanja eliminacije. [Npr., kod trovanja metilživom \(koja se kompleksira s glutationom i reapsorbira sustavima aktivnog transporta u stanicama žučne vrećice što čini varijantu kruženja, tzv. bilijarno-hepatički ciklus\) se oralno daje politiolna smola koja na sebe veže metilživu pri čemu ne dolazi do reapsorpcije.](#)

OSTALI PUTEVI IZLUČIVANJA

Izlučivanje izdahnutim zrakom

Plućima se u prvom redu izlučuju tvari koje su u plinovitoj fazi na temperaturi tijela, te isparljive tekućine u ravnoteži sa svojom plinovitom fazom. Količina tekućine koju izluče pluća je u vezi s njenim pritiskom para (praktična primjena ovoga: alko-test). Difuzija je osnovni princip uklanjanja, pri čemu bolja topljivost u krvi podrazumijeva sporije izlučivanje (npr. kloroform). Eliminaciju hlapljivih spojeva usporava i odlaganje jako hidrofobnih supstanci u masno tkivo. [Zato se anestetik halotan može naći u dah u nekoliko tjedana nakon anestezije\).](#)

Izlučivanje fecesom

Osim u žuči, toksikant se može izlučiti preko probavnog trakta, te eliminirati putem fecesa jer: nije potpuno apsorbiran nakon oralnog unosa, izlučen je slinom, želučanim ili sekretornim fluidima crijeva, izlučevinama gušterače, ili je uklonjen iz dišnog sustava transportom do usta, te je progutan. Smatra se da je aktivni transport jako lipofilnih spojeva u crijevima glavni put njihova uklanjanja.

Izlučivanje cerebrospinalnom tekućinom

Toksikanti topljivi u mastima prolaze preko barijere krv-cerebrospinalna tekućina pasivnom difuzijom, ostali aktivnim transportom. Više o ovoj barijeri u podpoglavlju [BARIJERE RASPODJELI TOKSIKANATA.](#)

Izlučivanje mlijekom

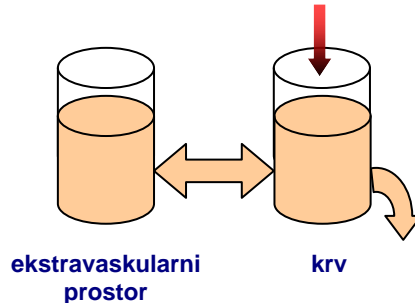
Važno zbog mogućnosti prijenosa toksikanata od majke djetetu koje se doji takvim mlijekom, te mogućnosti prijenosa s životnja koje daju mlijeko na ljude. Izlučivanje u mlijeko se odvija običnom difuzijom (pH je oko 6,5, niži od pH plazme, te više baza ostaje u mlijeku. Organske kiseline su najvećim dijelom neionizirane, te difundiraju van. Zbog 3-5% masti u mlijeku ono koncentrira hidrofobne toksikante ([poliklorirani bifenili, dioksini, pirolizidinski alkaloidi i mnogi drugi](#)) i može biti glavni put njihovog izlučivanja. Također nakuplja metale slične Ca poput olova.

Izlučivanje u znoju

Toksikanti u znoj dopijevaju difuzijom neioniziranog oblika. Ovakvo izlučivanje je količinski od vrlo malog značaja. Neki toksikanti u znoju mogu izazvati dermatitis.

TOKSIKOKINETIKA

Toksikokinetika označava praćenje kretanja stranih tvari u tijelu tj. apsorpciju, raspodjelu, metabolizam i izlučivanje, te daje korisne informacije o načinu dospjeća toksikanta na mjesto djelovanja. Naglasak ovog poglavlja je na kvantitativnim aspektima toksikokinetike tj. mjerljivim parametrima bitnim za procjenu rizika. Model koji dobro prezentira ove parametre je prikazan dolje.



Toksikantu se nakon apsorpcije koncentracija u krvi uravnotežuje s koncentracijom u tkivima i organima. Volumen odjeljaka u koji se toksikant raspodijeljuje se izražava tzv. volumenom distribucije. Jačina izlaznog protoka se naziva klirensom (eng. clearance).

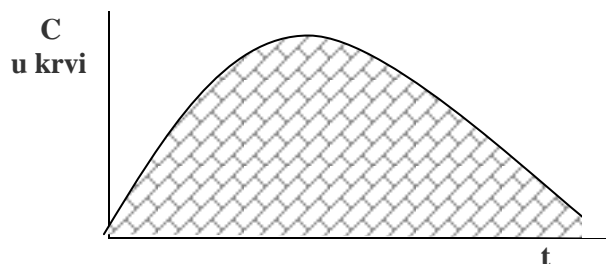
Volumen distribucije
$$V_d = \frac{A_b}{C}$$

A_b je količina toksikanta u tijelu (doza), C je koncentracija u krvi (plazmi). V_d (izražava se u L po kg tjelesne težine) je prividni volumen jer je riječ o volumenu potrebnom za homogenu raspodjelu tvari u koncentraciji utvrđenoj u krvi. Stoga V_d ponekad može biti znatno veći od ukupnog volumena tjelesnih tekućina i tkiva, ukoliko je tvar višestruko koncentriranija u ekstravaskularnim tkivima tj. nije homogeno raspoređena. Toksikanti koji se gotovo u potpunosti zadržavaju u krvi (slobodni i vezani za proteine plazme) imaju minimalni V_d koji je gotovo jednak volumenu krvnog odjeljka. **Primjerice, V_d hidrofilnog aspirina je 11 L/70 kg, a lipofilnog klorokvina (nakuplja se u masnom tkivu) 13000 L/70 kg.**

Klirens
$$CL = \frac{\text{brzina eliminacije}}{C}$$

CL je mjera sposobnosti tijela da eliminira stranu tvar tj. količina krvi koja se u jedinici vremena očisti od pojedinog toksikanta (izražava se npr. u L / min).

Većina toksikanata ima klirens koji je konstantan u opsegu uobičajenih koncentracija tj. ne dolazi do zasićenja eliminacije i brzina eliminacije je izravno proporcionalna koncentraciji (brzina eliminacije = $CL \cdot C$). CL se može izračunati i iz tzv. AUC (area under the curve) vrijednosti ili površine ispod krivulje. Riječ je o krivulji promjene koncentracije u krvi s vremenom:



AUC se ekstrapolira prema beskonačnosti
Doza = $CL \cdot AUC$

$$AUC = \int_0^{\infty} C \cdot dt \text{ i CL računa prema jednadžbi}$$

Brzina eliminacije $\frac{dC}{dt} = k$ kinetika nultog reda

$\frac{dC}{dt} = k \cdot C$ kinetika prvog reda

C je koncentracija u krvi, t je vrijeme, a k konstanta (izražava se u količini po jedinici vremena, npr. $\mu\text{g}/\text{min}$). Kod kinetike nultog reda odvija se promjena zadane koncentracije toksikanta u jedinici vremena. **Kinetika prvog reda** podrazumijeva promjenu razine toksikanta koja je proporcionalna raspoloživoj koncentraciji kemikalije. Veličine koje opisuju brzinu eliminacije su konstanta brzine eliminacije k i vrijeme poluživota $t_{1/2}$.

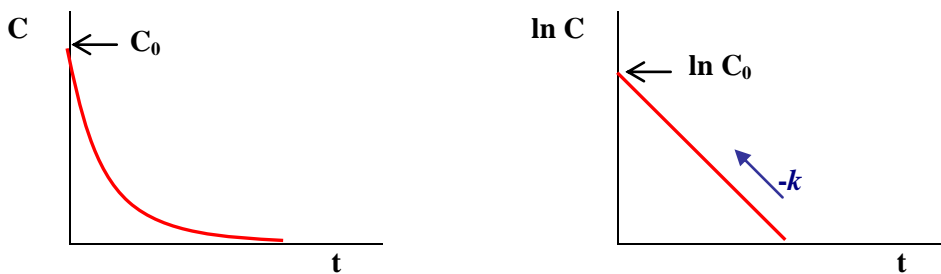
Većina procesa koji sudjeluju u kretanju kemikalije u organizmu (difuzija, nosačima posredovan aktivni transport, metabolizam, izlučivanje) odvijaju se kinetikom prvog reda pri niskim koncentracijama.

Reakcije prvog reda se mogu opisati eksponencijalnim funkcijama, te jednačba za eliminaciju supstance poprima sljedeći oblik:

$$C = C_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

$$\ln C = \ln C_0 - k \cdot t$$

C_0 je početna koncentracija. Sređivanjem se dobije jednačba pravca $y = C + m \cdot x$, gdje y predstavlja ordinatu, x apscisu, m je nagib krivulje, a C presjecište ordinate. U toksikokinetici, graf $\ln C$: vrijeme daje nagib $-k$ (za graf $\log C$: t, nagib je $-k/2,303$) i presjecište C_0 .



Klirens se također može izračunati iz konstante brzine eliminacije jer

$$k = \frac{CL}{V}$$

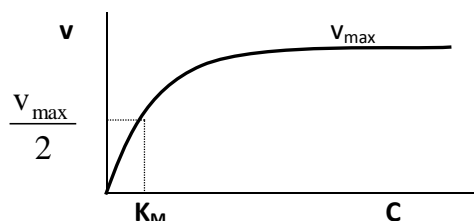
Vrijeme poluživota $\frac{C_0}{2} = C_0 \cdot e^{-k \cdot t_{1/2}}$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

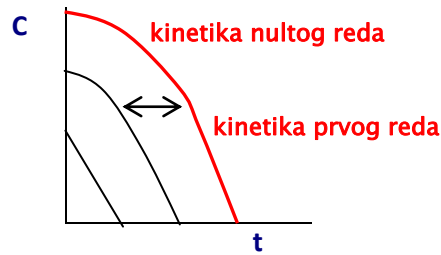
Vrijeme poluživota predstavlja vrijeme potrebno da se koncentracija u krvi smanji na polovicu.

Kinetika nultog reda postaje važna kod viših koncentracija, pri čemu enzimi i proteini uključeni u procese aktivnog transporta i biotransformacije imaju ograničeni kapacitet i mogu biti zasićeni, te povećanje koncentracije strane tvari neće povećati brzinu reakcija. To dovodi do nelinearne ili kinetike zasićenja.

Michaelis-Menten kinetika opisuje ovakve procese. M-M konstanta (K_M) je koncentracija tvari kod koje je brzina eliminacije 50% maksimalne tj. one kod koje je enzim zasićen (K_M je time mjera afiniteta enzima, pri čemu niža vrijednost podrazumijeva veći afinitet). Pri v_{\max} (maksimalna brzina eliminacije) su koncentracije strane tvari tolike da su zasićeni kapaciteti enzima i transportnih proteina.



$$v = \frac{v_{\max} \cdot C}{K_M + C}$$



Gornja krivulja prikazuje odnos koncentracije u krvi s vremenom za toksikant koji u organizmu pokazuje kinetiku zasićenja. Dok je koncentracija toksikanta niža od K_M , može se uočiti kinetika prvog reda, dok se kod viših doza vidi nelinearna eliminacija. Npr., visoka koncentracija nadmašuje kapacitet vezanja za proteine transporta i metabolizma te se povećava koncentracija slobodnog oblika tvari u krvi. Etanol je primjer gdje brzo zasićenje biotransformacije ograničava brzinu eliminacije te se konstantna količina biotransformira u jedinici vremena bez obzira na količinu etanola u tijelu. Doza pri kojoj se brzina eliminacije mijenja iz kinetike prvog reda u kinetiku zasićenja znači da tijelo postupa s kemikalijom drukčije nego pri nižim dozama, što može biti razina pri kojoj toksikant postaje opasan.

K_M i v_{max} se mogu odrediti iz krivulje prema jednadžbama:

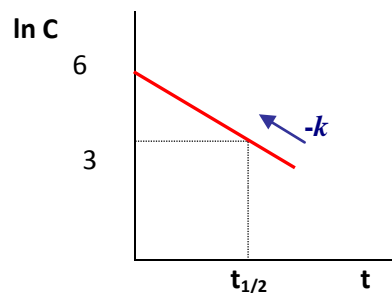
$$\ln C = \ln C_{0e} - \frac{v_{max}}{K_M} \cdot t$$

$$K_M = \frac{C_{0a}}{\ln(C_{0e} - C_{0a})}$$

C_{0e} je koncentracija kod $t = 0$ dobivena ekstrapolacijom linearnog dijela krivulje na ordinatu, a C_{0a} je izmjerena koncentracija kod $t = 0$.

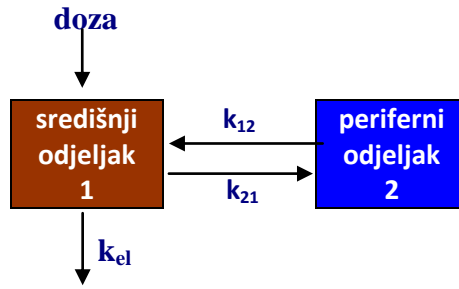
Modeliranje toksikokinetike najčešće uključuje tzv. jednodjelni ili dvodjelni otvoreni sustav.

Jednodjelni otvoreni sustav podrazumijeva tijelo kao jedan odjeljak, pri čemu otvoreni znači da se kemikalija eliminira iz organizma. Riječ je o kinetici prvog reda jer se koncentracija smanjuje za polovicu u vremenu poluživota ($t_{1/2}$), sve dok se sav toksikant ne ukloni.

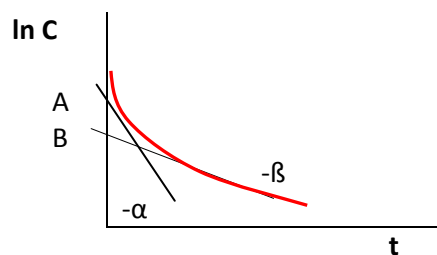


Odnos koncentracija toksikanta u tkivu i plazmi je stalan, i jednom kad je poznat, koncentracija toksikanta u tkivu se može izračunati iz koncentracije u plazmi.

Matematički i fiziološki je prikladnije tijelo smatrati **dvodjelnim otvorenim sustavom** koji se sastoji od centralnog odjeljka (plazma ili krv) i perifernog odjeljka (ekstravaskularni prostor tj. ostala tkiva i organi).



Ovaj model uključuje sporije uravnoteženje koncentracije između središnjeg i perifernog odjeljka, te u toksikokinetičkim ispitivanjima treba uzeti u obzir brzine prelaska toksikanta između ovih odjeljaka (opisane konstantama k_{12} i k_{21}). k_{el} je konstanta brzine eliminacije toksikanta iz središnjeg odjeljka. Tipična krivulja poslije intravenoznog doziranja je dana na donjem grafu:



Linearni (terminalni) dio krivulje se ekstrapolira na ordinatu i presjecište je točka B koja predstavlja početnu koncentraciju u jednom od odjeljaka. Nagib te krivulje je $-\beta$. Krivulja nagiba $-\alpha$ se dobije kao razlika izmjerene koncentracije u krvi i one dobivene ekstrapolacijom gornjeg dijela krivulje. Presjecište te krivulje je točka A (početna koncentracija u drugom odjeljku). Ove vrijednosti se mogu izračunati i linearnom regresijom podataka. Konstante k_{12} , k_{21} i k_{el} se računaju na temelju gore dobivenih vrijednosti.

$$k_{21} = \frac{\alpha \cdot B + \beta \cdot A}{A + B}$$

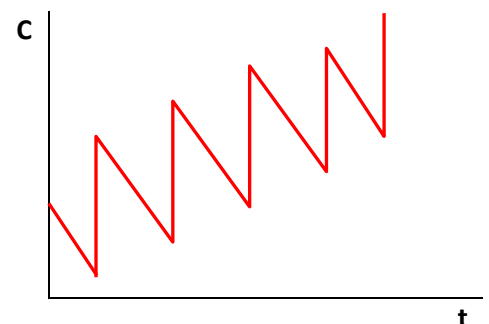
$$k_{el} = \frac{\alpha \cdot \beta}{k_{21}}$$

$$k_{12} = \alpha + \beta - k_{21} - k_{el}$$

Ove konstante brzine daju uvid u relativni doprinos procesa raspodjele i eliminacije na C–t profil toksikanta.

Kinetika ponavljano izlaganja

Ukoliko je vrijeme poluživota kratko u odnosu na interval između izlaganja toksikantu, ovaj će se skoro potpuno ukloniti za vrijeme tog intervala. S druge strane, ako je poluživot skoro isti ili veći od intervala ekspozicije, dosta toksikanta ostaje u tijelu prije drugog i daljnjih izlaganja i toksikant će se gomilati tj. dolazi do njegove kumulacije. Kumulativna svojstva najčešće imaju lipofilne tvari koje se dugo zadržavaju u masnom tkivu i organima bogatim lipidima (npr. organoklorni pesticidi). Sklonost kumulaciji imaju i spojevi žive, fluora, i sl., koji stvaraju vrlo čvrste veze s nekim tkivnim sastojcima, te se zato slabo eliminiraju.



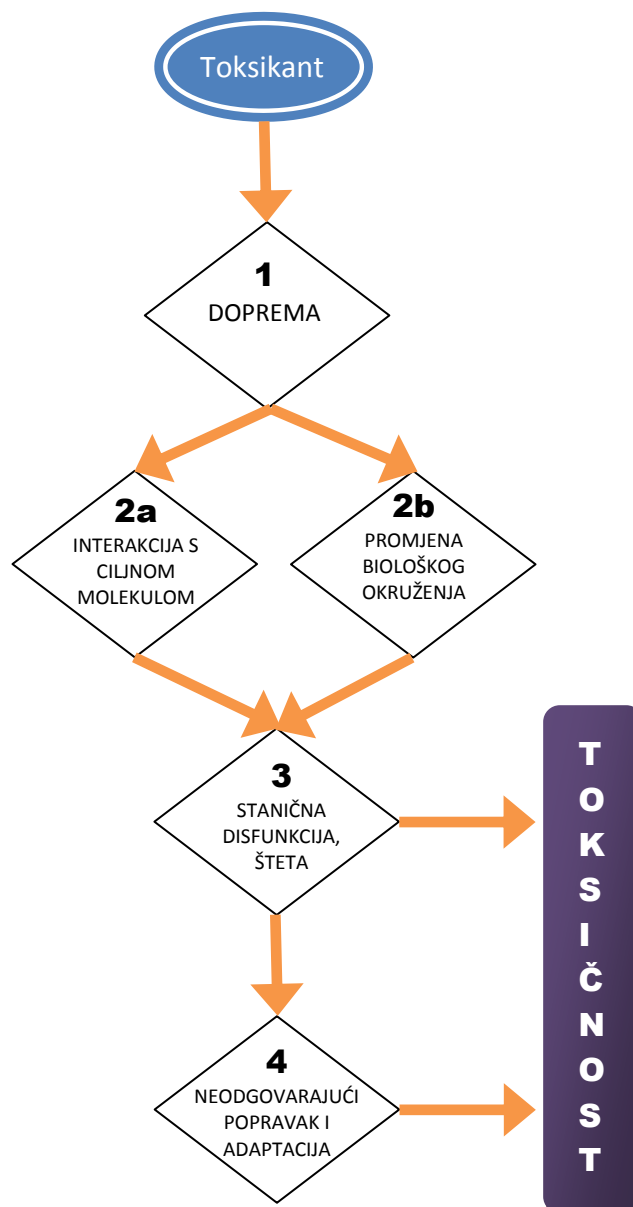
TOKSIKODINAMIKA

Toksikodinamika opisuje mehanizme djelovanja toksikanta u organizmu, kao i vezu između doze toksikanta i toksičnog učinka.

MEHANIZMI TOKSIČNOSTI

Mehanizmi toksičnosti uključuju opis dopreme toksikanta na mjesto djelovanja, interakcije s ciljnim molekulama i način na koji se organizam nosi sa štetom. Poznavanje mehanizama je važno zato što omogućuje razumijevanje simptoma i posljedica toksičnosti, predviđanje štetnosti kemikalija, osmišljavanje načina prevencije i/ili neutralizacije štetnog djelovanja, te razvoj lijekova, industrijskih kemikalija, aditiva, itd., koji su manje toksični ili (u slučaju pesticida) selektivno toksični. Otkrivanje mehanizama je unaprijedilo i znanja o mnogim temeljnim fiziološkim i biokemijskim procesima (popravlak DNA, neurotransmisija, transkripcija, prijenos staničnog signala, i dr.), kao i o podlozi patoloških stanja poput raka, Parkinsonove bolesti, itd.

Pojednostavljeno, uobičajeni put izazivanja toksičnosti prikazan je na donjoj slici, pri čemu toksikant dospjeva na ciljno mjesto, izaziva staničnu disfunkciju koja se očituje kao toksični učinak. Tetrodotoksin (iz riba napuhača), primjerice, koristi ovaj put do toksičnosti. Nakon dospjeća do Na⁺ kanala živčanih stanica (**1**) za koje se veže (**2a**), izaziva blokadu neurotransmisije živčanih stanica (**3**) i paralizu mišića. Nema sustava popravka koji mogu spriječiti pojavu ovih simptoma.



Ponekad toksikant ne reagira sa specifičnom ciljnom molekulom nego štetno djeluje na biološko okruženje (**2b**) koje rezultira toksičnošću. Npr., toksikanti mogu izazivati promjenu pH fizioloških tekućina, taložiti se u tubulima bubrega spriječavajući stvaranje urina, i sl.

Najsloženiji put do toksične reakcije podrazumijeva dopremu strane tvari do mjesta djelovanja (**1**), nakon čega može reagirati s ciljnim molekulama (**2a**) i/ili mijenjati biološko okruženje (**2b**). Slijede oštećenja stanice i/ili njene funkcije (**3**) koja adaptivnim mehanizmima potiče sustave popravka, smanjene dopreme (npr. indukcija enzima i ubrzani metabolizam toksikanta) i/ili kompenzacije disfunkcije. Ako ovi procesi ne funkcioniraju dobro ili šteta toksikantom nadilazi kapacitet popravka (**4**), posljedica je toksičnost. Rak izazvan kemikalijama obično uključuje ovakav put u četiri koraka.

Doprema s mjesta izloženosti na ciljno mjesto

Intenzitet toksičnog djelovanja ovisi o koncentraciji i vremenu zadržavanja konačnog oblika toksikanta na mjestu djelovanja. Konačni (ultimativni) toksikant je oblik koji reagira s endogenom ciljnom molekulom (receptor, enzim, ionski kanal, lipid, DNA, i dr.) ili mijenja biološko okruženje, što inicira strukturne i/ili funkcionalne promjene koje rezultiraju toksičnošću. Konačni toksikant može biti izvorni oblik toksikanta, metabolit ili reaktivne vrste kisika ili dušika (više o reaktivnim vrstama kisika i dušika i oksidativnom stresu: **OVDJE**) koje nastaju tijekom biotransformacije strane tvari ili njenim međudjelovanjem s biološkim okruženjem. Često i endogena molekula (promijenjena ili ne) nakon interakcije s izvornim toksikantom zapravo predstavlja konačni toksikant. **Primjerice, Pb ili tetrodotoksin su toksični u izvornom obliku. Etilen glikol (antifriz, prevodi se u oksalnu kiselinu), benzo[a]piren (prevodi se u elektrofilni diol epoksid), amigdalín (razgrađuje se uz oslobađanje HCN) su primjeri toksikanata koji biotransformacijom daju konačne toksikante. Vodikov peroksid u prisustvu iona tranzicijskih metala (Fe, Cu, Cr, Mn, Ni) te doksorubicin (lijek protiv raka) mogu proizvoditi hidroksil radikal (OH·), dok parakvat može proizvoditi peroksinitrit (ONOO⁻). Ugljik tetraklorid biotransformacijom daje slobodne radikale koji dovode do lipidne peroksidacije te iz endogenih nezasićenih masnih kiselina, između ostalih produkata, nastaje 4-hidroksinonenal koji se smatra jednim od konačnih toksikanata.**

Višu koncentraciju konačnog toksikanta na ciljnom mjestu podržavaju procesi apsorpcije, raspodjele prema ciljnom mjestu, reapsorpcije i bioaktivacije (ili toksikacije). Obratno djeluju procesi presistemske eliminacije, raspodjele od ciljnog mjesta, izlučivanja i detoksikacije.

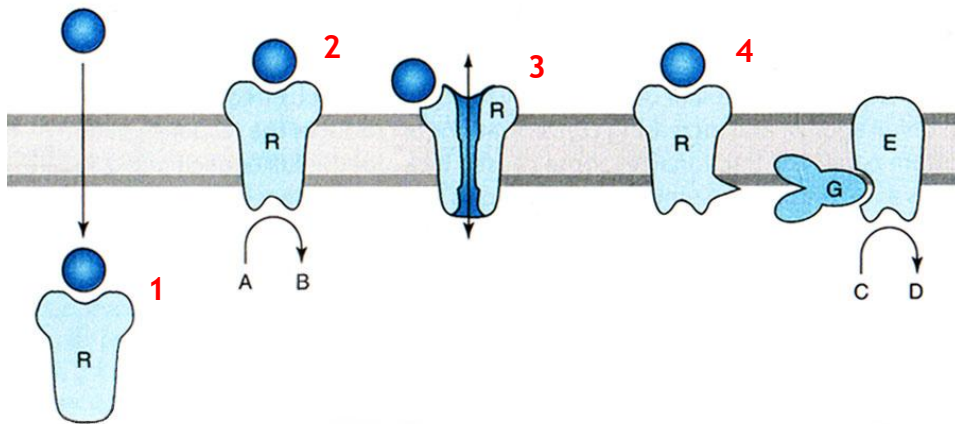
Apsorpcija podrazumijeva ulazak u sistemsku cirkulaciju i, presistemska eliminacija (transportni proteini poput P-glikoproteina, metabolički enzimi crijeva i jetre, i sl.) može to onemogućiti znatnom udjelu toksikanta. Raspodjela prema i od ciljnog mjesta, kao i procesi izlučivanja i reapsorpcije, mogu različitim načinima djelovati na razinu konačnog toksikanta na ciljnim mjestima, i o njima je bilo riječi u odgovarajućim poglavljima skripte. Toksikacijom se povećava razina i reaktivnost konačnog toksikanta u obliku nastalog metabolita (npr. elektrofil) i nusprodukata (npr. slobodni radikali). Obratno, detoksikacijskim reakcijama se količina konačnog toksikanta smanjuje i ponekad ravnoteža ova dva procesa značajno utječe na dopremu do mjesta djelovanja.

Interakcija s ciljnom molekulom ili promjena biološkog okruženja

Toksičnost najčešće uključuje vezanje konačnog toksikanta s ciljnom molekulom nakon čega dolazi do niza sekundarnih biokemijskih posljedica koje rezultiraju staničnom disfunkcijom. Alternativno, konačni toksikant može promijeniti biološko okruženje čime remeti strukturu ili funkciju važnih molekula, organela, stanica ili organa.

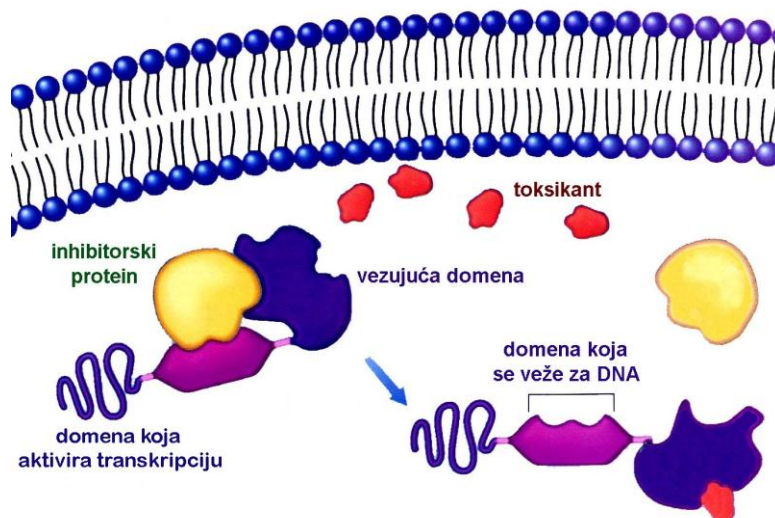
Vrste ciljnih molekula koje su toksikološki najrelevantnije su bjelančevine i nukleinske kiseline (naročito DNA). Ciljna molekula je često biotransformacijski (toksikacijski) enzim, kao i stanične strukture u blizini. **Npr., CCl₄ se citokromom P450 prevodi u slobodni radikal koji oštećuje sam enzim, ali i obližnje lipide iz membrane endoplazmatskog retikuluma. Rjeđe, konačni toksikant izaziva štetu na mjestu udaljenom od mjesta nastanka. DNA endotelnih stanica kapilara je osjetljivija na epoksid koji nastaje iz vinil klorida od DNA hepatocita u kojima se ova biotransformacija odvija.** Ciljne bjelančevine mogu biti receptori (molekule i molekularni kompleksi, najčešće u sklopu membrane, koji specifično vežu endogene molekule poput neurotransmitera ili hormona), transkripcijski

faktori (također vežu endogene molekule, a neki i toksikante, poput AhR), enzimi, transportni proteini, itd. Općeniti prikaz najvažnijih ciljnih molekula je prikazan dolje (1 = unutarstanične ili slobodne ciljne molekule poput enzima i transkripcijskih faktora; 2 = membranski receptor s unutarstaničnom enzimskom domenom; 3 = membranski receptor s ionskim kanalom ili transportni protein; 4 = membranski receptor povezan s G-proteinom; plava kuglica predstavlja ligand tj. endogenu ili stranu molekulu koja se za ciljne molekule može vezati).



Inhibicijom enzima (vezanjem toksikanta za aktivno mjesto ili alosterički) kod biosintetskih reakcija dolazi do nedostatka određene supstance, a kod enzima razgradnje do gomilanja supstrata. [Npr., liječenje kostobolje se provodi terapijom alopurinolom, inhibitorom koji se kovalentno veže i inhibira ksantin oksidazu koja prevodi ksantin u urat \(gomilanje urata u zglobovima je uzrok kostobolje\).](#)

Transkripcijski faktori (poput već spomenutog AhR i sličnih ksenosenzora) se nalaze u citoplazmi i vezanje tzv. liganata tj. endogenih spojeva (npr. steroidnih hormona) ili stranih tvari dovodi do promjene konformacije tih receptora koja im omogućuje vezanje za određene gene u lancu DNA aktivirajući sintezu proteina kojima je posredovan učinak liganda (hormona, toksikanta, i sl.) u stanici. [Mehanizam djelovanja steroidnih hormona je prikazan na donjoj slici.](#) Receptorski protein (tzv. receptor steroidnih hormona) se sastoji od tri domene: domene koja veže ligand, domene koja aktivira transkripciju i domene koja se veže za DNA. Inhibitorski protein (npr. heat-shock protein, hsp90) se veže za receptor u odsustvu liganda. Vezanje steroidnog hormona (ili toksikanta sličnog građom) za vezujuću domenu dovodi do promjene konformacije uslijed koje disocira inhibitorski protein s receptora. Ovakva aktivna konfiguracija receptora se može vezati za određeni slijed u lancu DNA (tzv. promotorsku regiju) i posebna domena aktivira transkripciju odgovarajućih gena RNA polimerazom.



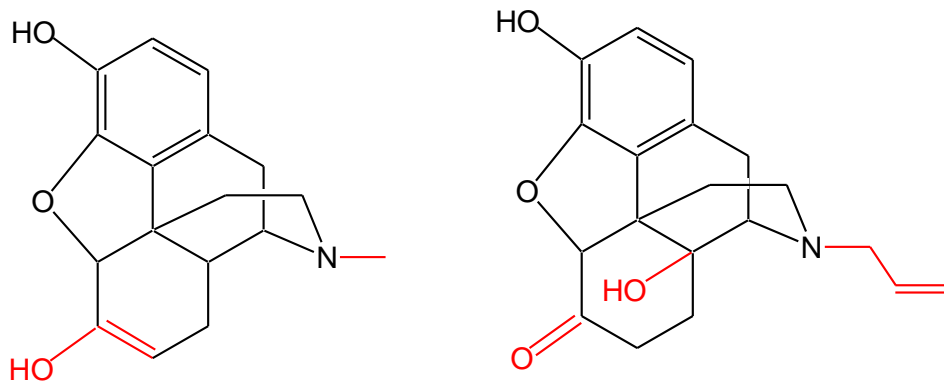
Membranski receptori su uglavnom mete toksikanata koji su slični endogenim ligandima koji se za ove receptore vežu. Uslijed vezanja za ekstracelularnu domenu membranskog receptora (receptor 2), promjena konformacije receptora može aktivirati enzimatiku aktivnost citoplazmatske domene receptora ([tako djeluje inzulin, aktivacijom membranskih tirozin kinaza](#)). Promjena konformacije membranskog receptora također može

dovesti i do promjene prostornog rasporeda tzv. G-proteina (receptor 4) koji zatim ionske kanale ili enzime (E na slici) prevodi u aktivni ili inaktivan oblik (npr. vezanje adrenalina i noradrenalina za adrenergičke receptore).

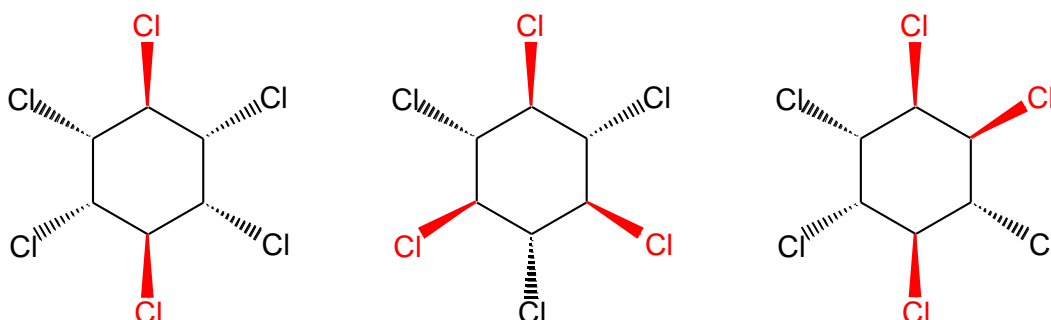
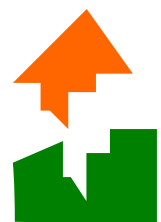
Ionski kanali i transportni proteini (na slici označeni brojem 3) su također smješteni u membranama i često su meta konačnih toksikanata. Vezanje nikotina za acetilkolinске receptore dovodi, slično acetilkolinu, do otvaranja Na^+ kanala, dok ih tetrodotoksin blokira. Prozac blokira transportne proteine serotonina.

Vrste reakcija između toksikanta i ciljne molekule uključuju:

Nekovalentne veze konačnog toksikanta i ciljne molekule (ionske, hidrofobne, vodikove, van der Waalove veze) su česte kod interakcije s receptorima, transkripcijskim faktorima, ionskim kanalima i nekim enzimima. Ionska veza je važna za velik broj tvari koje su ionizirane kod fiziološkog pH, pri čemu postoje elektrostatske sile između iona suprotnih naboja. Hidrofobna veza nastaje između nepolarnih dijelova molekule, ne toliko što se privlače, nego se povećava entropija okolnih molekula vode (tj. polarnih spojeva) sabijanjem dviju nepolarnih molekula (kida se manje vodikovih veza oko jedne veće nego oko dvije manje molekule). Van der Waalove interakcije su posljedica prisnog dodira neutralnih atoma ili skupina, pri čemu jezgra jednog atoma privlači elektrone drugog atoma i obratno. Kod vodikove veze se atom vodika raspodjeljuje između dva elektronegativna atoma, poput O, S ili N atoma (topljivost u vodi je uvjetovana vodikovim vezama). Ovakve veze između toksikanta i ciljne molekule su uglavnom slabe i reverzibilne. Afinitet vezanja toksikanta određuju fizikalno-kemijska svojstva njegove molekule poput građe, oblika, veličine, prostornog rasporeda, električnog naboja, i sl. Smatra se da je jedan dio molekule toksikanta odgovoran za vezanje za ciljnu molekulu, a drugi za djelovanje, što za posljedicu može imati velike razlike u učinku toksikanata slične građe. Npr., morfin se veže za opioidne receptore i izaziva učinak za razliku od naloksona (koristi se kao antidot kod trovanja opioidima). Nalokson ima C=O umjesto OH-skupine, dodatnu OH-skupinu i duži alkilni lanac na N atomu:

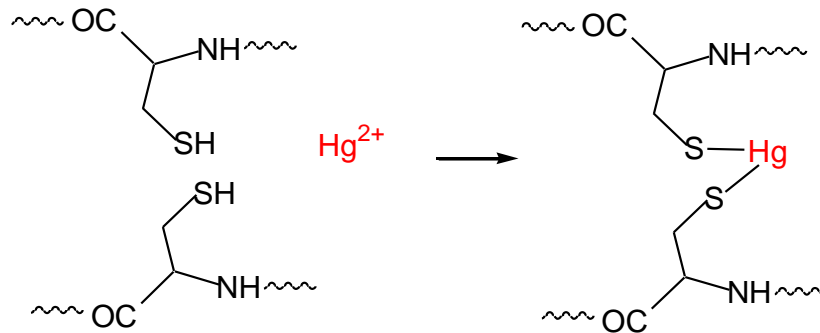


Važan je i prostorni raspored uslijed fenomena 'ključ-brava' tj. prostorne sukladnosti strane tvari s aktivnim mjestom na ciljnoj molekuli uslijed čega se može vezati. Utvrđena je ogromna razlika u učinkovitosti L- i D-adrenalina. Također, postoje znatne razlike u oralnoj toksičnosti α - ($\text{LD}_{50} = 500$ mg/kg štakora), β - ($\text{LD}_{50} = 6000$ mg/kg) i γ -heksaklorcikloheksana ($\text{LD}_{50} = 125$ mg/kg) tj. insekticida lindana (po istom redoslijedu su prikazane strukture dolje).



Kovalentne veze su od ogromnog toksikološkog značenja jer ove jake, ireverzibilne interakcije trajno mijenjaju endogene molekule. Kovalentna veza nastaje dijeljenjem elektrona u elektronskom paru, a poseban slučaj ove

veze je tzv. koordinativna veza kod koje elektronski par neke veze potječe od samo jednog atoma (npr. CO donira jedan elektronski par Fe^{2+} atomu hemoglobina). Toksikološki najrelevantnije koordinativne veze su kelati s metalnim ionima, najčešće između teških metala (Pb, Hg, As) i O, S i/ili N) atoma tjelesnih molekula. Npr. inhibicija enzima sa SH-skupinom u aktivnom centru.

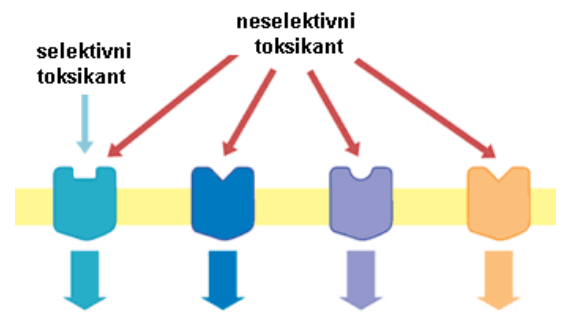


Konačni toksikanti koji su elektrofilni ili slobodni radikali su uobičajeni uzročnici kovalentnih veza koje su naročito opasne ukoliko uključuju važne molekule poput DNA (o elektrofilima: **BIOAKTIVACIJA TOKSIKANATA**). ©

Dodatne interakcije toksikanta i ciljne molekule su **abstrakcija atoma vodika** (npr. slobodni radikali mogu oduzeti atom vodika molekuli masne kiseline što inicira lipidnu peroksidaciju; više **OVDJE**), **oksidoredukcijske reakcije** (nitrit može oksidirati Fe^{2+} ion hemoglobina i izazivati methemoglobinemiju), kao i **enzimske reakcije** (primjerice, botulinum toksin je Zn-proteaza koja hidrolizira proteine koji sudjeluju u prijenosu živčanog signala acetilkolinom (konkretnije, njegovom izlučivanju u sinapsu), što dovodi do paralize).

Kvalitativni opis interakcije toksikanta i ciljne molekule uključuje selektivnost i učinak nakon interakcije.

Selektivnost toksikanta podrazumijeva vezanje za jednu molekulu i izazivanje jednog određenog učinka. S druge strane, neselektivni toksikant će se u tijelu vezati za više različitih mjesta izazivajući nezavisne toksične učinke. Heparin, kiseli šećer negativnog naboja, se vrlo selektivno veže na proteine koji sudjeluju u koagulaciji krvi, a koji su pozitivno nabijeni, rezultat čega je sprječavanje grušanja krvi. Neselektivno djeluje difenhidramin (antihistaminik) koji se veže za histaminske receptore u različitim tkivima sprječavajući djelovanje histamina uz antialergijski učinak, ali se istovremeno veže i za acetilkolinске i histaminske receptore u CNS-u remeteći prijenos živčanih impulsa (npr., izaziva pospanost).

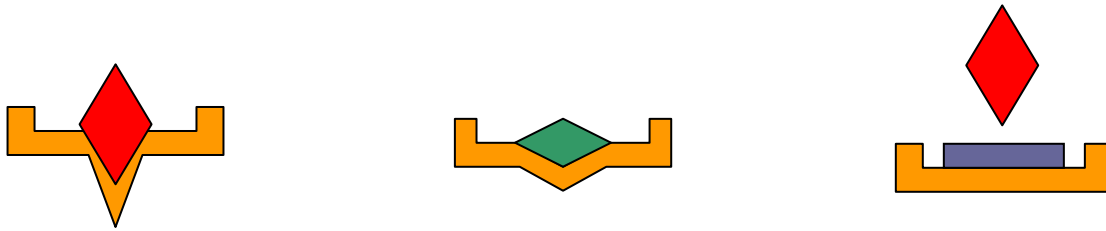


Nakon interakcije konačnog toksikanta s ciljnom molekulom može doći do aktivacije ili inhibicije receptora (ukoliko je receptor ciljna molekula), do disfunkcije ili uništenja ciljne molekule, ili stvaranja neoantigena.

	učinak
agonisti	1
parcijalni agonisti	0 – 1
antagonisti	0

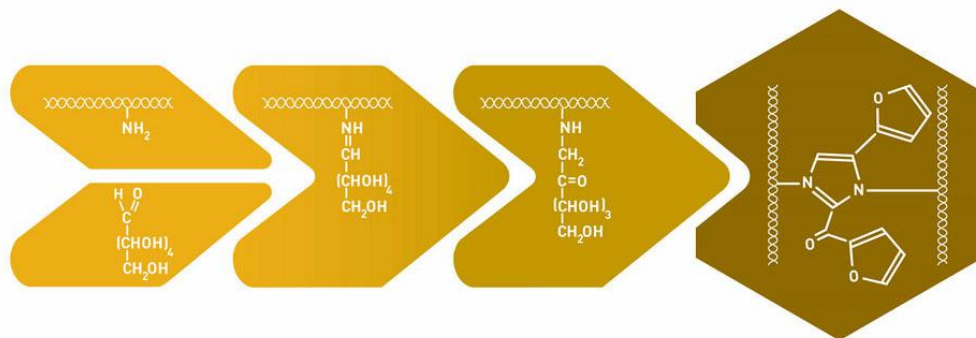
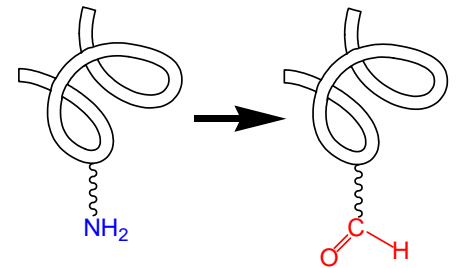
Aktivacija ili inhibicija receptora često podrazumijeva konformacijske promjene ciljne molekule koje dovode do, primjerice, aktivacije enzima ili otvaranja ionskog kanala. Prema sposobnosti aktivacije toksikanti se dijele u tri skupine navedene u tablici. Učinak agonista je jednak učinku

(endogene) tvari koja se normalno veže za ciljnu molekulu receptora te izaziva konformacijske promjene molekule koje rezultiraju učinkom. Djelovanje morfina je slično endorfinu nakon vezanja za opioidne receptore, dok mikotoksin zearalenon, zbog sličnosti estrogenu, djeluje kao agonist estrogenskog α receptora. Antagonist nakon vezanja za ciljnu molekulu ne izaziva učinak i često istovremeno sprječava agonistu pristup ciljnom mjestu. **Ovako djeluje već spomenuti nalokson interakcijom s opioidnim receptorima.** Djelovanje parcijalnih agonista je po učinkovitosti između agonista i antagonista, te često vezanjem za ciljnu molekulu ne izazivaju dovoljne konformacijske promjene koje bi dovele do njene aktivacije.



Najčešća **disfunkcija ciljne molekule** je potpuna ili djelomična inhibicija enzima uslijed blokade ključnih strukturnih dijelova, npr. tiolnih skupina. **Primjerice**, piruvat dehidrogenaza ima SH skupine u aktivnom centru koje mogu stvoriti kompleks s atomom trovalentnog arsena što inhibira ovaj enzim i proizvodnju energije glikolizom. © Također, Prozac vezanjem za transportne proteine serotonina blokira njihovu funkciju. Važan primjer disfunkcije ciljne molekule konačnim toksikantom predstavlja kovalentno povezivanje na DNA (nastanak tzv. DNA adukata) ili interkalacija (umetanje) između lanaca dvostruke uzvojnice DNA. Time DNA gubi izvorna svojstva kalupa za sintezu komplementarnih lanaca tijekom replikacije, što može dovesti do mutacije. **Npr.**, aflatoksin epoksid povezan s gvaninom dovodi do sparivanja ove promijenjene baze s adeninom umjesto citozinom (nastaje par A-T umjesto G-C), uslijed čega se formira novi kodon i, procesom translacije, dolazi do zamjene aminokiseline u bjelančevini. © Interkalacija (npr. doksorubicina), iako je riječ o relativno slabim vezama, može dovesti do ozbiljnijih mutacija u odnosu na kovalentno vezanje toksikanta.

Uništenje ciljne molekule je još jedna moguća konzekvenca interakcije s konačnim toksikantima. **Ionizirajuće zračenje** proizvodi veliku količinu slobodnih radikala (naročito OH•) koji nakon vezanja za deoksiribozu DNA uzrokuju pregradnju i pucanje fosfodiesterne veze. **Lipidnom peroksidacijom** dolazi do uništenja molekula lipida. **Bjelančevine** su osjetljive na oksidativne modifikacije (npr. slobodnim radikalima) uz nastanak proteinskih karbonila (na slici desno). Nastala karbonilna skupina može stvarati veze s NH₂ skupinama aminokiselinskih ostataka proteinskog lanca (ili drugih molekula, poput DNA) stvarajući intra- i intermolekularne veze koje mogu dovesti do disfunkcije ili uništenja molekule. **Slične reakcije** (Maillardove! Ekvivalentne reakcijama neenzimatskog posmeđivanja u hrani) nastaju i između reducirajućih šećera (dakle, karbonila) i aminokiselinskih ostataka bjelančevine (najčešće Lys), pri čemu nastaju brojni spojevi, tzv. AGE (advanced glycation endproducts) ili konačni produkti uznapredovale glikacije. Produkti uključuju one nastale unakrsnim povezivanjem proteinskih lanaca, nukleinskih kiselina i lipida. Ove reakcije se povezuju s procesom starenja i bolestima poput dijabetesa (visoka koncentracija šećera u krvi dovodi do opsežne glikacije bjelančevina).



Nastanak neoantigena (novih antigena tj. molekula koje mogu potaknuti reakciju imunog sustava) je ponekad, kod osjetljivih osoba, posljedica kovalentnog vezanja toksikanta na endogenu molekulu bjelančevine. **Primjerice**, vezanje penicilina na bjelančevine može dovesti do stvaranja neoantigena koji potiče produkciju odgovarajućih antitijela i imunu reakciju čije posljedice mogu biti bronhokonstrikcija (astma) i pad krvnog tlaka (anafilaktički šok).

Promjena biološkog okruženja je način izazivanja toksičnih posljedica bez interakcije s ciljnom molekulom. Ovdje ulaze tvari koje mijenjaju koncentraciju H^+ iona fizioloških tekućina, kao što su kiseline i molekule koje se metaboliziraju u kiseline (metanol, etilen glikol, itd.). Otapala ili detergentski mogu narušiti strukturu i funkciju fosfolipidnih dvosloja stanične membrane, dok pojedini toksikanti štetno djeluju samo zauzimanjem mjesta (nekoliko lijekova uzrokuje stvaranje netopljivih taloga u tubulima bubrega).

Stanična disfunkcija

Normalno funkcioniranje stanice uključuje programe koji određuju sudbinu stanice tj. da li će uslijediti dioba, diferencijacija (specijalizacija stanice za posebne funkcije sintezom različitih bjelančevina), ili smrt stanice (apoptoza). Ovi programi se ostvaruju **promjenom genske ekspresije**. Također, posebnim programima, **aktivacijom ili inaktivacijom djelatnih bjelančevina**, nadzirana je trenutna funkcija stanice, poput lučenja hormona, kontrakcije, brzine metabolizma, itd. Ostvarenje ovih programa podrazumijeva **održanje staničnog integriteta** uz biosintetske, metaboličke, transportne sustave, sustave proizvodnje energije, i sl. Neke ciljane molekule mogu biti dio sustava održanja staničnog integriteta.

Upravljanje navedenim programima i održanje staničnog integriteta je posredovano signalnim putevima, narušavanje kojih može podrazumijevati: deregulaciju ekspresije gena, deregulaciju razina djelatnih bjelančevina, remećenje održavanja internih funkcija stanice i/ili stanica, tkiva ili organa koji ovise o funkcioniranju stanice izložene toksikantu. U svim slučajevima aktivacije membranskih ili unutarstaničnih receptora dolazi do prijenosa signala stanici koji podržavaju toksikanti agonističkog, a prekidaju oni antagonističkog djelovanja. Toksičnost agonista se temelji na remećenju ravnoteže pretjeranom stimulacijom, dok antagonisti remete ravnotežu sprječavanjem bilo kakve signalizacije preko ciljnog receptora. Slijedi nekoliko tipičnih primjera stanične disfunkcije djelovanjem toksikanata.

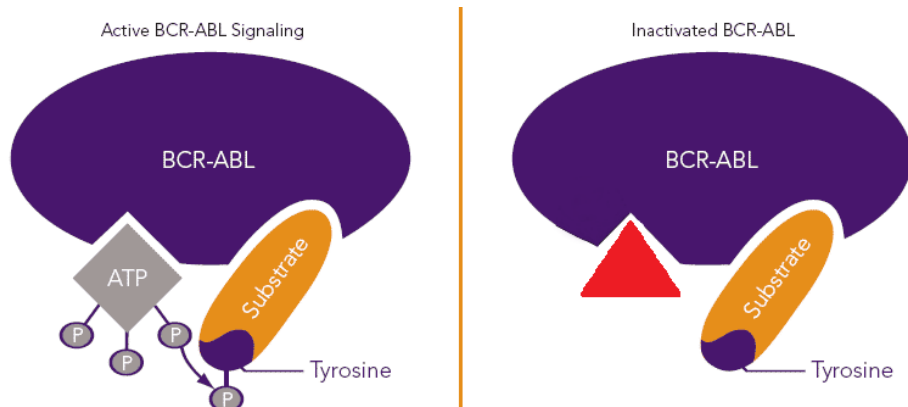
Utjecaj na transkripciju i ekspresiju gena

Remećenjem signalnih puteva koji, u konačnici, mijenjaju ekspresiju gena a time i razine bjelančevine, postepeno se mijenja funkcioniranje stanica.

[Dietilstilbestrol je sintetski analog estrogena koji se veže za estrogenske receptore i time potiče ekspresiju niza gena. Primijenjen za vrijeme kritičnih perioda fetalnog razvoja dovodi do trajnih promjena genske ekspresije u ciljnim tkivima što za vrijeme spolnog sazrijevanja može dovesti do benignih ili malignih procesa reproduktivnog trakta.](#) Trajne promjene genske ekspresije su često posljedica tzv. epigenetskih promjena. Za razliku od genetskog koda tj. redosljeda baza u lancu DNA, epigenetski kod uključuje modifikacije histona (bjelančevine koje omataju DNA; histoni se acetiliraju, metiliraju, itd.) i metilaciju baza u promotorskoj regiji gena. [Ove modifikacije utječu na transkripciju gena \(metilacija utišava gene, dok demetilacija pojačava transkripciju\) i time omogućuju prilagodbu stanice na uvjete okoliša. Mogu biti izazvane i toksikantima. Primjerice, hidralazin \(lijek protiv visokog tlaka\) može uzrokovati sistemski lupus eritematosus zato jer inhibira metilaciju DNA, čime u imunim stanicama \(CD4⁺ T-limfocitima\) dolazi do povećane ekspresije proupalnih gena.](#)

Toksikanti često imaju proliferacijski učinak (dovode do ubrzane diobe stanica) remećenjem signalnih puteva koji reguliraju stanični ciklus, što može poticati karcinogene procese (ubrzana dioba i replikacija DNA --> mutacije --> rak). [Putevi koji potiču rast stanica uključuju vezanje signalnih molekula \(citokina, faktora rasta poput TNF \$\alpha\$, IL-1, EGF, IGF, itd.\)](#) [za membranske receptore \(imaju tirozin kinaze inkorporirane u unutarstaničnu domenu receptora\), što dovodi do fosforilacije IKK \(I \$\kappa\$ B kinaza koja fosforilira i time inaktivira ovu bjelančevinu koja se normalno nalazi u kompleksu s transkripcijskim faktorom NF- \$\kappa\$ B\). Time se aktivira NF- \$\kappa\$ B koji potiče ekspresiju ciklina D1 i c-Myc transkripcijskog faktora koji stimulira ekspresiju ciklina. Ciklini navode stanicu na diobu tj. mitozu. Reaktivne vrste kisika i dušika \(ROS/RNS-ovi\) također mogu djelovati mitogeno tj. proliferacijski izravnom aktivacijom IKK ili inhibicijom fosfataza.](#) [Fosfataze \(npr. PTP\) može inhibirati i arsenit stvaranjem kovalentnih veza sa SH skupinama u aktivnom centru enzima. Protein fosfataze vrše defosforilaciju signalnih bjelančevina i time ih inaktiviraju, djelujući tako suprotno kinazama koje fosforilacijom aktiviraju bjelančevine signalne kaskade.](#)

Glivec (generičko ime: imatinib, lijek protiv leukemije; crveni trokut na donjoj slici) inhibira unutarstanične tirozin kinaze (konkretno BCR-ABL, mutirani oblik protonkoga koji sudjeluju u regulaciji proliferacije stanica) zbog sličnosti ATP-u nužnom u reakciji fosforilacije drugih mitogenih bjelančevina koju enzim provodi. Ovaj lijek tako remeti signale koji dovode do proliferacije tumorskih stanica.



Protein kinaza C (PKC) je važan enzim koji sudjeluje u signalizaciji i mogu ga aktivirati ioni Ca^{2+} nakon čega PKC fosforilira signalne, npr. mitogene, bjelančevine (Raf koji fosforilacijom aktivira MEK --> ERK --> npr. c-Myc). © Ioni Pb^{2+} mogu aktivirati PKC zbog sličnosti kalciju te izazivati proliferaciju stanica.

Utjecaj na razine djelatnih bjelančevina

Iako je riječ o gotovo identičnim mehanizmima kao kod regulacije transkripcije i ekspresije, Ca^{2+} ioni i ostali sekundarni glasnici (diacilglicerol - DAG, inozitol trifosfat – IP_3 , fosfatidilinozitol trifosfat - PIP_3 , cikloadenozin monofosfat - cAMP, itd.) uzrokuju fosforilaciju djelatnih bjelančevina i trenutnu promjenu njihove aktivnosti. Treba napomenuti da često jedan signal dovodi i do promjene genske ekspresije i do promjene aktivnosti djelatnih bjelančevina. Najrelevantnija remećenja aktivnosti bjelančevina toksikantima odnose se na živčane, mišićne i egzokrine (koje luče produkte) stanice.

Na primjer, adrenergički receptori su membranski receptori povezani uz G-protein. Vezanjem adrenalina ili noradrenalina dolazi do promjene konformacije receptora i aktivacije G proteina koji nadalje može aktivirati adenilat ciklazu (AC) koja cijepa ATP na 3',5'-cAMP i PPI. cAMP aktivira protein kinaze koje fosforilacijom aktiviraju ili inaktiviraju određene bjelančevine. Alternativno, adrenergički receptori (kao i neki receptori drugih neurotransmitera - acetilkolina i serotonina) aktivacijom G proteina aktiviraju fosfolipazu C (PLC) koja razgrađuje specifični fosfolipid stanične membrane (fosfatidilinozitol difosfat, PIP_2) na diacil glicerol (DAG) i inozitol trifosfat (IP_3). DAG aktivira protein kinaze, dok IP_3 mobilizira Ca^{2+} iz sarkoplazmatskog ili endoplazmatskog retikuluma. Oslobođeni Ca^{2+} vežu vezujući proteini poput kalmodulina ili troponina C i aktiviraju protein kinaze. © U konkretnom slučaju prijenos signala (aktivacija ili inaktivacija djelatnih bjelančevina) rezultira tzv. *fight-or-flight* (borba ili bijeg) odgovorom (stimulacija posredovana tzv. simpatičkim živčanim sustavom) na stres: ubrzano bilo i krvni tlak, širenje zjenica, mobilizaciju energije, i sl. Beta blokatori su klasa spojeva koji su antagonisti adrenergičkih receptora te se koriste kao lijekovi protiv srčanih aritmija i hipertenzije.

Aktivacija nekih acetilkolinskih receptora dovodi do otvaranja ionskih $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kanala, ulaska ovih iona u stanicu i depolarizacije membrane (naboj s unutarnje strane membrane postaje pozitivniji), čime započinje prijenos živčanog impulsa (više o mehanizmima neurotransmisije: **NEUROTOKSIČNOST**). Ioni Ca^{2+} unutar stanice djeluju kao sekundarni glasnici, vežu se za specifične proteine (vidi gore) koji aktiviraju protein kinaze. Tzv. kolinergička neurotransmisija za posljedicu ima *rest-and-digest* (odmor i probava) odgovor (destimulacija posredovana parasimpatičkim živčanim sustavom): usporavanje rada srca, pluća, sužavanje zjenica, poticanje probave i pohrane energije, itd. Nikotin se s velikim afinitetom može vezati za acetilkolinske receptore uz agonistički učinak, pri čemu njegova visoka koncentracija može uzrokovati presnažnu kolinergičku neurotransmisiju i odgovarajuću signalizaciju u stanici. ©

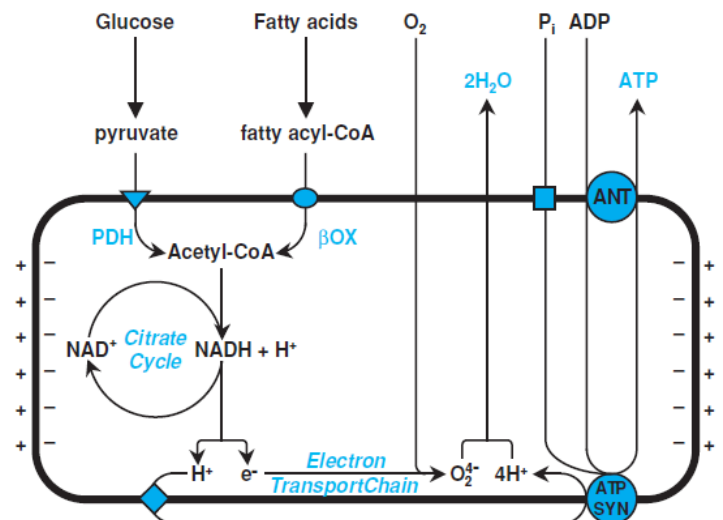
Primjećeni hipoglikemijski učinak sulfonamida (antibiotici) na pokusnim životinjama, doveo je do razvoja antidijabetičkih lijekova. Ove tvari inhibiraju kanale K^+ iona u beta stanicama gušterače (uslijed čega ga više ostaje unutar stanice), izazivajući depolarizaciju i otvaranje kanala Ca^{2+} iona i njihov ulazak u stanicu. Ioni kalcija zatim, prema gore opisanom mehanizmu, potiču aktivaciju djelatnih bjelančevina koje u beta stanicama sudjeluju u egzocitozi (lučenju) inzulina.

Utjecaj na održanje staničnog integriteta

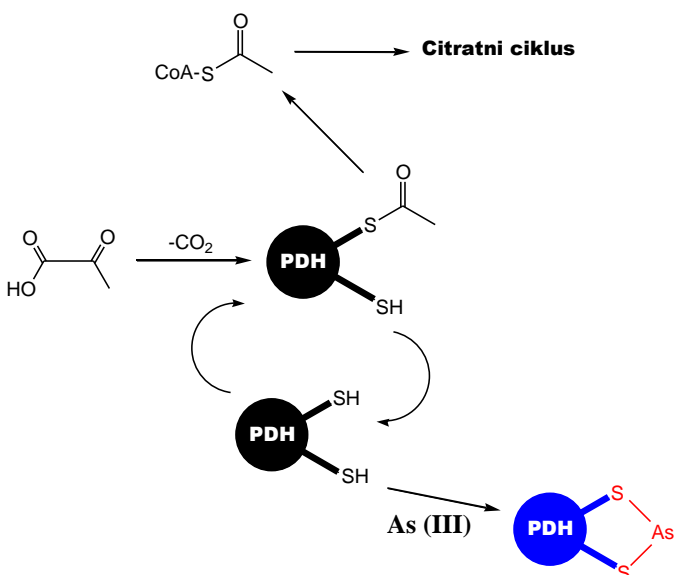
Toksične posljedice mogu nastati i uslijed narušavanja gradivnog i funkcionalnog integriteta stanice. Stanice moraju proizvoditi molekule potrebne za održavanje komponenti stanice (membrane, organele, enzimi, nukleinske kiseline, gradivne bjelančevine, ...) te moraju proizvoditi dovoljno energije koja procese održavanja pogoni. Kritični biokemijski poremećaji toksikantima koji ugrožavaju opstanak stanice su: iscrpljivanje ATP-a, dugotrajno povišenje unutarstaničnih razina Ca^{2+} , i prekomjerna produkcija ROS/RNS-ova.

ATP je nužan u biosintezi niza važnih molekula poput kofaktora i nukleinskih kiselina te prilikom aktivacije molekula (fosforilacijom, adenilacijom). Osigurava energiju za mišićnu kontrakciju, polimerizaciju citoskeleta, stanično gibanje, staničnu diobu, itd. Pogoni niz transportnih bjelančevina, npr.: Na^+/K^+ crpku (drugo ime: Na^+/K^+ ATP-aza), Ca^{2+} ATP-azu, H^+ ATP-azu, i dr. Sintaza ATP-a se odvija tijekom procesa oksidativne fosforilacije prilikom koje dolazi do pretvorbe energije dobivene oksidacijom nutrijenata u visokoenergetsku vezu između ADP i fosfata.

Prema slici, ukratko, NADH prenosi elektrone iz glikolize i citratnog ciklusa na transportni lanac elektrona u mitohondrijima, odakle konačno dospjevaju do molekule O_2 . Prijenos elektrona ujedno dovodi do stvaranja elektrokemijskog gradijenta, tj. visoke koncentracije protona s vanjske strane unutrašnje membrane mitohondrija, koji ATP-sintaza koristi za sintezu ATP-a. Ujedno dolazi do stvaranja molekule vode ($O_2 + 4 e^- + 4 H^+$). PDH = piruvat dehidrogenaza, β OX = β -oksidacija masnih kiselina, ANT = adenine nucleotide translocator, ATP SYN = ATP synthase. © Iscrpljivanje razina ATP-a u

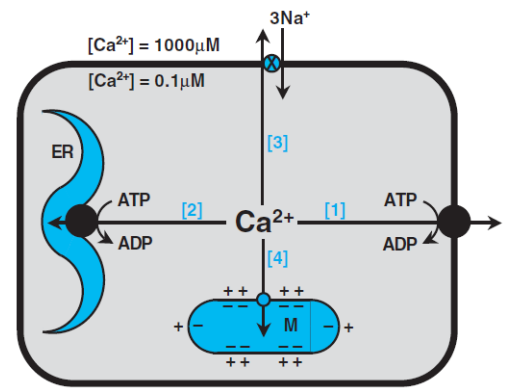


stanici je moguće uslijed štetnog djelovanja pojedinih tvari na njegovu mitohondrijsku produkciju, uključujući inhibiciju enzima koji proizvode acetil-CoA, inhibiciju enzima respiratornog lanca, ometanje dotoka O_2 respiratornom lancu, blokadu transportera fosfata, ometanje stvaranja elektrokemijskog gradijenta protona, i dr. Npr., cijanid se veže za željezni ion citokrom oksidaze respiratornog lanca i time može prekinuti prijenos elektrona i proizvodnju ATP-a. Arsenit inhibira piruvat dehidrogenazu kompleksiranjem SH skupina aktivnog centra enzima, inhibirajući tako proizvodnju acetil-CoA. Ugljični monoksid stvara kompleks s atomom Fe hemoglobina (ali i citokroma respiracijskog lanca!) te smanjuje opskrbu stanica kisikom. Slično djeluju agensi, npr. nitriti, koji mogu oksidirati fero u feri željezo (Fe^{3+} oblik ne veže O_2) te izazivati methemoglobinemiju.



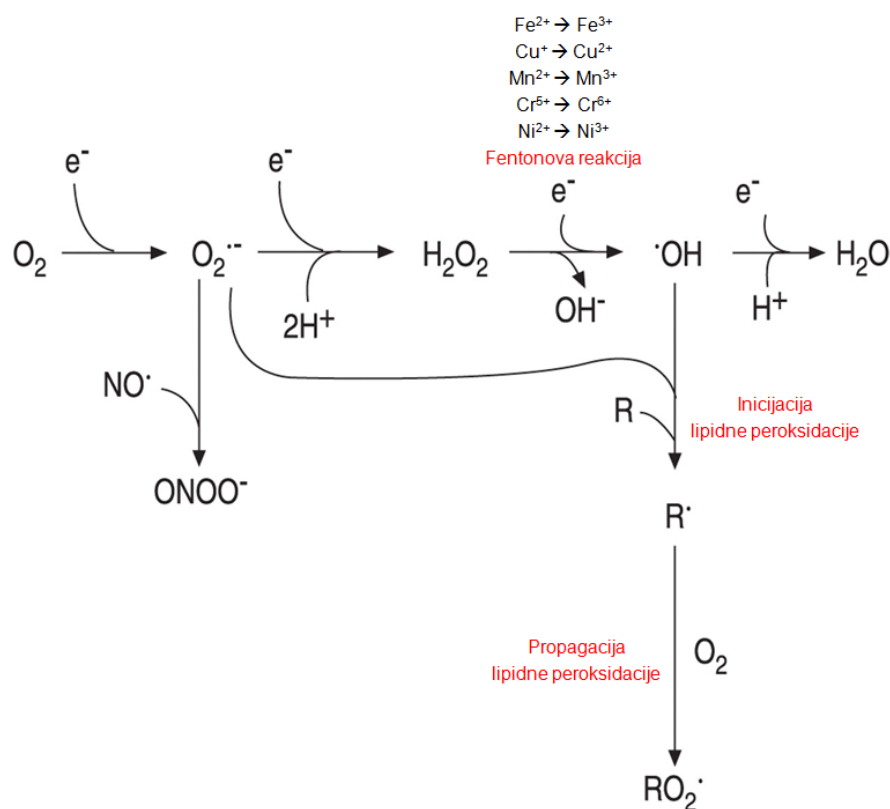
Obzirom na njihovu kritičnu ulogu u staničnoj signalizaciji, unutarstanične razine iona kalcija su strogo kontrolirane te je koncentracija Ca^{2+} u citoplazmi otprilike 10000 puta niža od one u izvanstaničnom prostoru. Ovo se postiže nepropusnošću membrane za ione kalcija i

transportnim sustavima koji uklanjaju Ca^{2+} iz citoplazme. Na donjoj slici su označene Ca^{2+} ATP-aze koje, uz utrošak energije, izbacuju ione kalcija iz stanice (1) ili u endoplazmatski retikulum (2). Stanična membrana je opremljena i transporterom koji, sekundarnim aktivnim transportom (antiport) izbacuje Ca^{2+} iz stanice uz istovremeni ulazak Na^+ iona (3). Vanjska membrana mitohondrija, pak, ima Ca^{2+} kanal (4) kojim višak iona kalcija može prijeći u mitohondrije, gdje se pohranjuje u obliku kalcij fosfata. **Dugotrajno povišenje unutarstaničnih razina Ca^{2+}** izazivaju različiti toksikanti, raznim mehanizmima, poput: oštećenja stanične membrane i posljedičnog povećanja propusnosti, otvaranje Ca^{2+} kanala, inhibicija transportera kalcija, istiskivanje iona kalcija iz endoplazmatskog retikuluma ili mitohondrija, itd. **Primjerice, zmijski otrov sadrži fosfolipaze koje razgrađuju fosfolipide membrane, dok ioni kadmija mogu inhibirati Ca^{2+} ATP-azu.**



Normalni fiziološki procesi kao što je proizvodnja energije, metaboličke enzimske reakcije (naročito citokromi P450), uništavanje bakterija fagocitima, regulacija glatkih mišića, i dr., uključuje nastanak prooksidanata i slobodnih radikala. **Npr., tijekom oksidativne fosforilacije se oko 4% kisika reducira u slobodne radikale.**

Razlikuju se tzv. reaktivne vrste kisika (reactive oxygen species, ROS) i dušika (reactive nitrogen species, RNS), i najrelevantniji su: superoksid anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), singlet kisik ($^1\text{O}_2$ – molekularni kisik višeg energetskeg stanja),



hidroksilni radikal (OH^{\cdot}), peroksilni radikal (R-OO^{\cdot}), vodik peroksid, hipoklorasta kiselina (HClO), dušik monoksid (NO^{\cdot}), peroksininitrit (ONOO^-), itd. Slikom je prikazan slijed prijenosa elektrona i reakcija kojima nastaju najvažniji ROS/RNS-ovi. Fentonova reakcija je razgradnja vodikovog peroksida katalizirana ionima tranzicijskih metala uz nastanak vrlo reaktivnog hidroksilnog radikala. Vrlo česte mete slobodnih radikala su nezasićene masne kiseline jer su sklone oštećenjima dvostruke veze abstrakcijom elektrona djelovanjem slobodnih radikala ili tranzicijskih metala. Nastaje masnokiselinski radikal (inicijacija), koji vezanjem molekularnog kisika prelazi u

peroksilni radikal masne kiseline (propagacija). Reakcijom ovog s još jednom molekulom masne kiseline nastaje hidroperoksid (R-OOH) i novi masnokiselinski radikal. Ovakva lančana reakcija oksidativne razgradnje lipida u stanici se naziva lipidnom peroksidacijom (ekvivalent autooksidacije masti i ulja u hrani) i naročito je štetna za stanične membrane. Organizam također ima mehanizme zaštite kojima štetne nuspojave ovih produkata drži pod nadzorom. Ovdje spadaju antioksidantni enzimi poput superoksid dismutaze, glutation peroksidaze, katalaze, i dr. (vidi **OVDJE**), i antioksidansi endogenog (glutation) i egzogenog podrijetla (askorbat). Stanje narušene ravnoteže između stvaranja i neutralizacije ROS/RNS-ova naziva se oksidativnim stresom. **Pretjerana produkcija ROS/RNS-ova** može biti izravna posljedica redoks svojstava toksikanata ili indirektna posljedica, npr., povišenja intracelularnih razina Ca^{2+} iona djelovanjem toksikanta. **Klasični primjer je štetno djelovanje radioaktivnih elemenata posredovano ionizacijskim zračenjem. Ono može biti elektromagnetsko (γ -zrake i X-zrake) i**

korpuskularno (α -čestice tj. jezgre He (2 p i 2 n), β -čestice tj. elektroni i pozitroni, neutroni, protoni tj. jezgre vodika, i dr.). Sva ova zračenja dovode do ionizacije izravno (izbacivanjem orbitalnog e^- iz molekule, npr.: $\text{HOH} \rightarrow \text{HOH}^+ + e^-$) ili neizravno (e^- prelaze na višu energijsku razinu te molekula disocira u slobodne radikale: $\text{HOH} \rightarrow \text{H}\cdot + \text{OH}\cdot$). Nastaju jako reaktivni slobodni radikali ($\text{H}\cdot$ i $\text{OH}\cdot$), a u prisustvu kisika također hidroperoksi radikal ($\text{HO}_2\cdot$) i vodikov peroksid. Izravnim učinkom ionizirajućeg zračenja ili reakcijom s radikalima nastalim radiolizom vode, biološke molekule daju organske slobodne radikale. Oni su stabilniji te mogu reagirati s molekulama koje su udaljenije od mjesta njihove formacije i time uzrokuju veću štetu ($\text{RH} + \text{OH}\cdot \rightarrow \text{R}\cdot$).

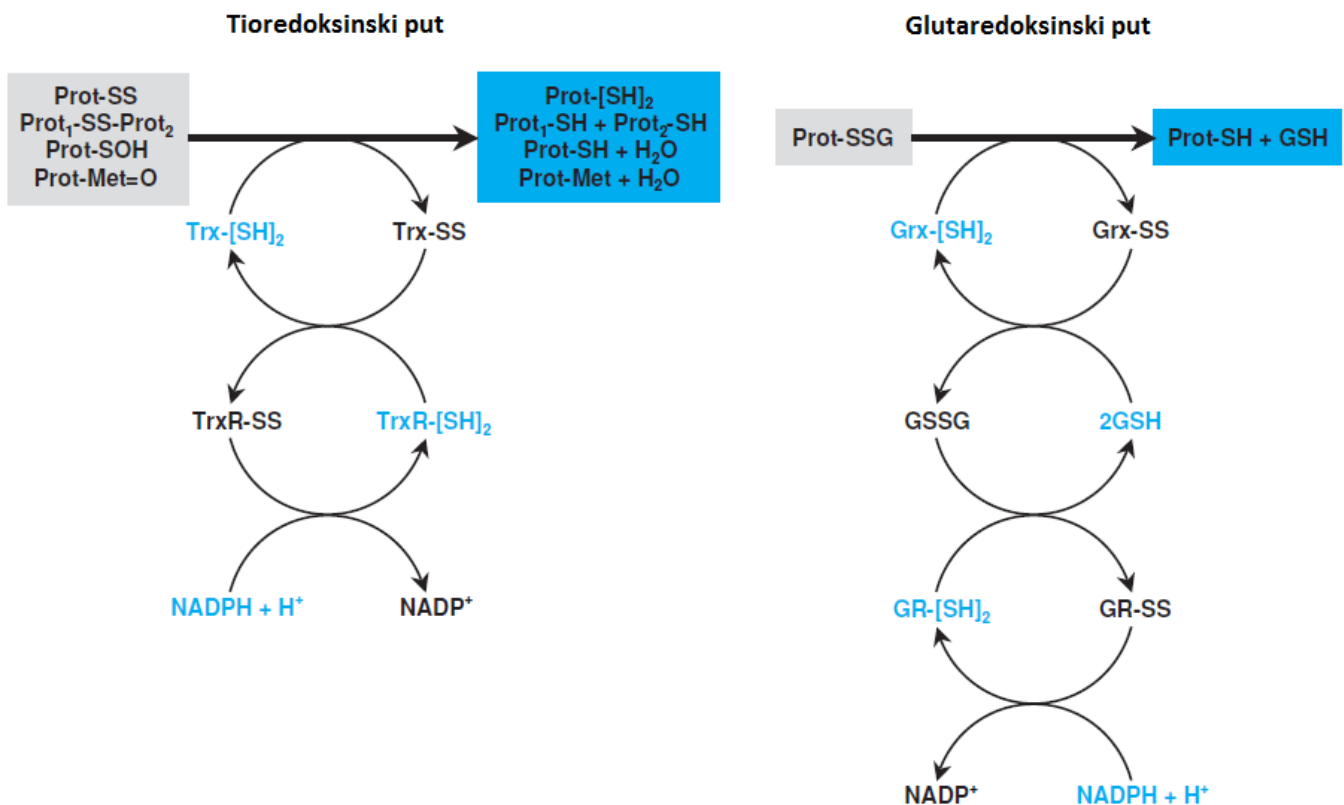
Navedeni poremećaji biokemije stanice nisu izolirani te često pojačavaju jedni druge. © Tako u neuronima povišenje intracelularnog Ca^{2+} potiče aktivnost sintaze dušik monoksida (NOS, nitric oxide synthase). $\text{NO}\cdot$ može reagirati sa O_2^- uz nastanak ONOO^- . Peroksinitrit je snažan oksidans sposoban izazvati lomove DNA lanca i inhibiciju sinteze ATP-a (blokadom enzima i kofaktora transportnog lanca elektrona). Iscrpljivanjem ATP-a smanjuje se aktivnost Ca^{2+} ATPaza i povišuje intracelularna koncentracija kalcija koji tada pojačano kalcijevim kanalom prelazi u mitohondrije. Visoka razina Ca^{2+} u mitohondrijima remeti elektrokemijski gradijent (pozitivan naboj s vanjske strane unutarnje membrane) potreban za sintezu ATP-a ATP sintazom. Ovisno o stupnju oštećenja, stanica može doživjeti smrt nekrozom (razina štete velika), apoptozom (razina osrednja) ili aktivacija mehanizama popravka ili uklanjanja oštećenja omogućuje opstanak stanice.

Neodgovarajući popravak i adaptacija

Progresija toksičnog učinka može aktivirati mehanizme popravka štete na molekularnoj, staničnoj ili razini tkiva. Također, adaptacija na toksikant ili oštećenja koja izaziva je važna strategija koju organizmi koriste. Toksičnost uslijed neadekvatnog popravka može nastati ukoliko je šteta veća od kapaciteta popravka, ukoliko oštećenja umanjuju učinkovitost samih sustava popravka, ako sam popravak doprinosi štetnom učinku, itd. Slično vrijedi za adaptacijske mehanizme.

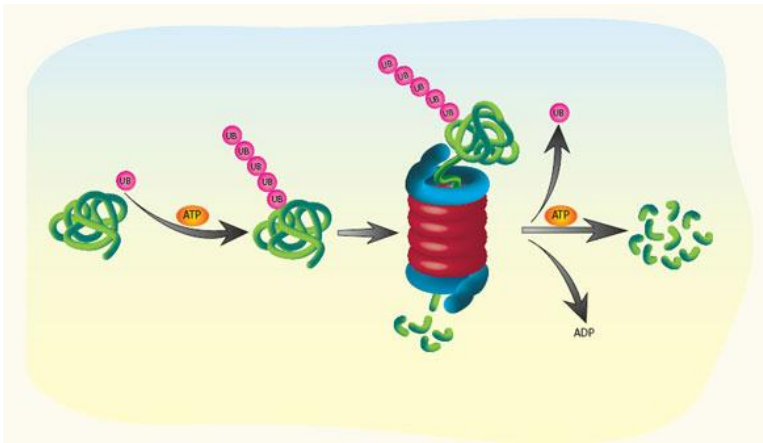
Mehanizmi popravka

Popravak oštećenih molekula može podrazumijevati uklanjanje i zamjenu oštećenog dijela ili je nužna potpuna razgradnja i sinteza nove molekule. Na primjer, funkcija mnogih važnih proteina je često posredovana SH skupinama (Prot-SH) i njihovom oksidacijom nastaju nedjelatne bjelančevine. Također, ROS-ovi vrlo često



napadaju Met ostatke u lancu bjelančevina uz oksidaciju atoma sumpora i nastajanje metionin sulfoksida (Prot-Met=O). Nastale disulfide (Prot-SS ili Prot₁-SS-Prot₂), protein-glutation disulfide (Prot-SSG) ili sulfenske kiseline (Prot-SOH) reduciraju glutaredoksin ili tioredoksin, male redoks bjelančevine s dvije tiolne skupine u aktivnom centru. Prot-Met=O reducira tioredoksin kao kofaktor metionin sulfoksid reduktaza. Regeneraciju tioredoksina provodi odgovarajuća reduktaza (TrxR), dok se glutaredoksin obnavlja redukcijom glutationom koji se regenerira glutation reduktazom (GR). Ove regeneracije se provode uz NADPH kao kofaktor.

Tzv. heat-shock bjelančevine mogu regenerirati denaturirane (promijenjen prostorni raspored)

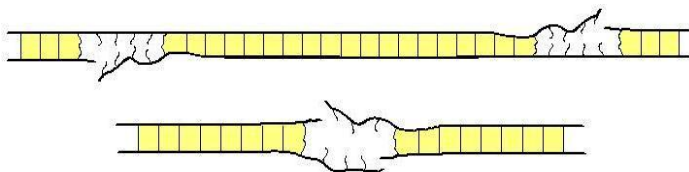
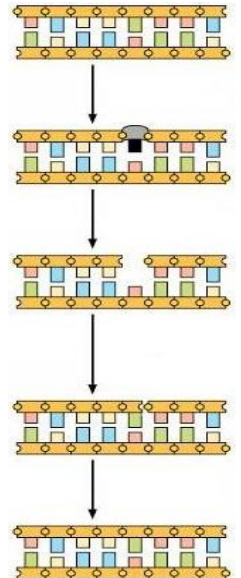


bjelančevine razmatanjem i ponovnim uvijanjem njihova polipeptidna lanca Ⓟ, ili sudjelovati u njihovu označavanju za recikliranje. Eliminacija oštećenih proteina se najčešće odvija u proteasomima (multimolekularni kompleksi proteaza) ili u lizosomima (stanične organele s koncentratom hidrolitičkih enzima, uključujući proteaze). Slika: oštećeni protein se prvo označi vezanjem ubikvitina (mala bjelančevina označena ružičastom bojom na slici) nakon čega se u

proteasomima razgrađuje do kratkih peptida. Etanol u višim dozama dovodi do prekomjerne proizvodnje ROS-ova koji mogu oštetiti sam proteasom i time umanjiti njegovu efikasnost u uklanjanju oštećenih proteina.

Stanice sadrže i enzime (fosfolipaze) koji imaju povećan afinitet za masne kiseline u sastavu fosfolipida koje imaju hidroperoksidne skupine (R-OOH). Njihovim isijecanjem iz fosfolipidne molekule i daljnjim reakcijama se masna kiselina oštećena peroksidacijom zamjenjuje novom molekulom masne kiseline.

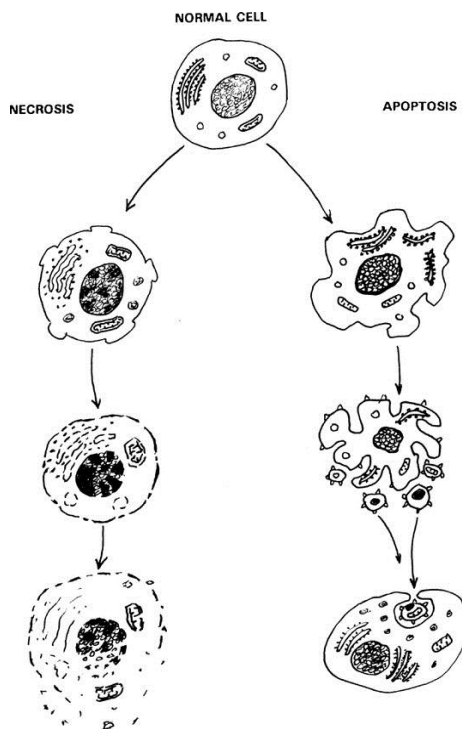
Očuvanje integriteta molekule DNA je, u dobroj mjeri, rezultat nekoliko učinkovitih sustava popravka oštećenja. Možda najpoznatija oštećenja DNA su pirimidinski dimeri koji nastaju između susjednih pirimidinskih baza djelovanjem UV zračenja. Ⓟ Uklanjanje lezija uslijed adukata na bazama provodi se alkiltransferazama koje eliminiraju alkilirajuće (najčešće metilne) adukate na DNA. Isijecanje baza (tzv. base excision repair) i isijecanje nukleotida (nucleotide excision repair) su također načini uklanjanja adukata i drugih modifikacija. Prvi se aktivira ako oštećenja ne dovode do velike deformacije uzvojnice, dok se voluminozniji adukti na bazama (npr. vezanje molekule aflatoksina ili uklanjanje dimera) uklanjaju drugim procesom. Oba načina popravka nakon isijecanja lezije zamjenjuju oštećenu bazu ili nukleotid(e) novim. Postoje i varijacije sustava popravka koji uklanjaju oštećenja nastala neposredno prije ili tijekom procesa transkripcije i replikacije DNA. Potonji se provodi rekombinacijom kojom se može popraviti i dvostruki lom DNA uzvojnice. Ⓟ Manje precizni sustavi popravka dvostrukog loma spajanjem krajeva uzvojnica se uglavnom aktiviraju tek kod oštećenja većeg obima (vidi **GENOTOKSIČNOST**). Kapacitet svih navedenih enzimskih sustava je više nego



dovoljan za kompenzaciju većine uobičajenih oštećenja DNA endogenog i egzogenog podrijetla. Treba ipak spomenuti da mehanizmi popravka troše znatne količine ATP-a, što, kako je opisano gore, može doprinijeti nepovoljnom učinku na stanicu, naročito ako je riječ o opsežnim oštećenjima.

Obnova oštećenih tkiva je sinteza odstranjivanja oštećenih stanica i njihove nadoknade. Oštećene stanice se rijetko popravljaju i najčešće dolazi do njihova uništenja, a okolne stanice diobom nadomještaju izgubljene. Riječ je o tzv. kompenzacijskoj proliferaciji. Osim stanica, obnova podrazumijeva i ekstracelularni matriks (ECM) tj. bjelančevine koje povezuju susjedne stanice u tkiva. Pretpostavlja se da signalne molekule iz oštećenih stanica stimuliraju regeneraciju u okolnom tkivu. Uočeno je, primjerice, da oštećenje stanica jetre uzrokuje lučenje

faktora rasta i citokina iz imunih stanica koji potiču ekspresiju mitogenih bjelančevina u hepatocitima i stelatnim stanicama (koje sintetiziraju ECM). U slučajevima kroničnih oštećenja, mehanizmi obnove tkiva često pogoršavaju problem proliferacijskim signalima koji mogu potaknuti karcinogeni proces, dok bujanje ekstracelularnog tkiva može dovesti do fibroze (mijenja funkciju organa i stanica).



Uklanjanje oštećenih stanica se može dogoditi prije spomenutim procesima nekroze ili apoptoze. Nekroza je nekontrolirano uništenje stanice, pri čemu stanica bubri, membrana puca i stanični sadržaj se širi po izvanstaničnom prostoru. Ovo može potaknuti imuni odgovor, upalnu reakciju i oštećenje okolnih stanica. S druge strane, apoptoza je 'programirana smrt' stanice kod koje se stanica i organele skupljaju i konačno raspadaju u tzv. apoptotička tijela okružena membranom. Fagociti i okolne stanice konzumiraju apoptotička tijela i time proces eliminacije završava bez izazivanja upale. Osim sprječavanja štete nekrotičkom smrću stanica, apoptoza pomaže u održanju integriteta organizma i prevencijom pretvorbe stanice u stanicu raka (tzv. neoplastična transformacija).

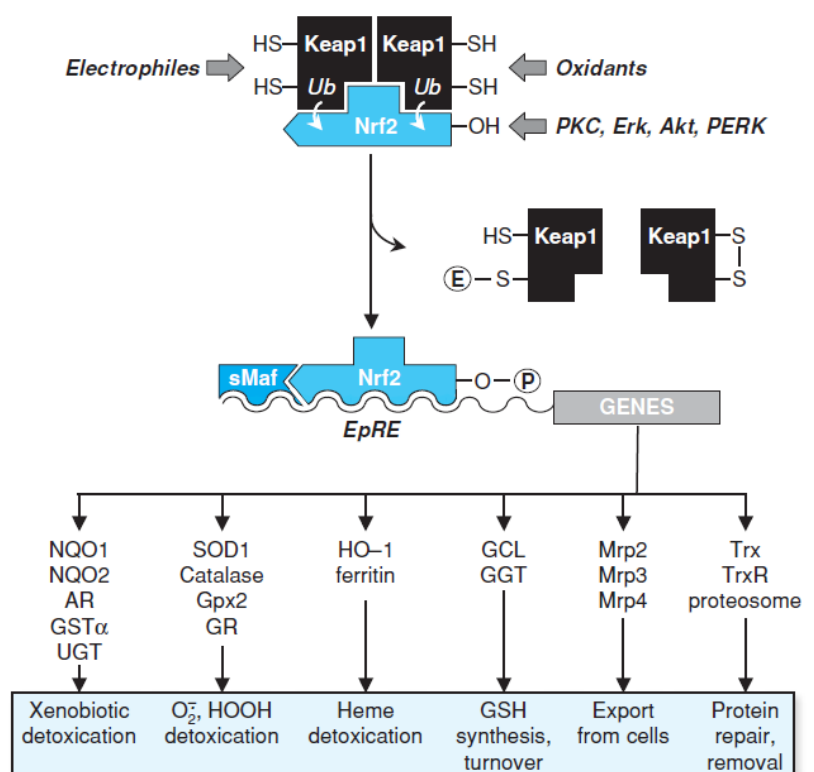
Mehanizmi adaptacije

Adaptacija organizma na izloženost toksikantu može uključivati: redukciju dopreme toksikanta do ciljnog mjesta, smanjenje osjetljivosti ciljnog mjesta, povećanje kapaciteta popravka, i jačanje sposobnosti kompenzacije štete koju toksikant izaziva. Adaptacija najčešće uključuje promjene genske ekspresije nakon detekcije toksikanta i/ili štete.

Smanjenje dopreme toksikanta postiže se smanjenjem apsorpcije, imobilizacijom, ubrzavanjem detoksikacije ili izlučivanja. Visok unos željeza smanjuje ekspresiju transportera dvovalentnih metala (DMT1) u enterocitima vezanjem za IRP1 (intracellular iron-binding protein). IRP1 se može vezati za mRNA DMT-a samo ukoliko su razine Fe u stanici niske. Time stabilizira mRNA, povećavajući njenu translaciju u DMT1. Visoke koncentracije dovode do zasićenja IRP1 željezom te se ne može vezati za mRNA. ©

Indukcija metalotioneina dovodi do imobilizacije iona Cd^{2+} . Najvjerojatniji mehanizam je neizravan tj. kadmij istiskuje ione Zn iz intracelularnih mjesta vezanja koji zatim aktiviraju transkripcijski faktor MTF-1 koji, pak, aktivira transkripciju metalotioneina.

Elektrofili i oksidansi mogu aktivirati transkripcijski faktor Nrf2 koji potiče ekspresiju gena koji sudjeluju u detoksikaciji i eliminaciji ovih tvari. Inaktivni Nrf se u citoplazmi nalazi u kompleksu s inhibitorom proteinom Keap1. Keap1 ima dvije SH skupine koje se mogu oksidirati u disulfidni most oksidansima (ili ROS-ovima) ili se za njih mogu kovalentno vezati elektrofilni, uzrokujući disocijaciju Keap1-a. Aktivni Nrf2 se može dodatno fosforilirati protein kinazama, povezuje se s koaktivatorom te veže za DNA gena koji u promotorskoj regiji imaju tzv. electrophile response element (EpRE) (alternativno, iako neadekvatno ime



je antioxidant response element, ARE), aktivirajući njihovu transkripciju RNA polimerazom.

Izloženost toksikantu također može **inducirati mehanizme popravka** oštećenih molekula ili tkiva. Npr., na gornjoj slici se može vidjeti da izloženost elektrofilima inducira Trx, TrxR i proteasom koji su prije spomenuti kao faktori koji sudjeluju u popravku ili uklanjanju oštećenih proteina.

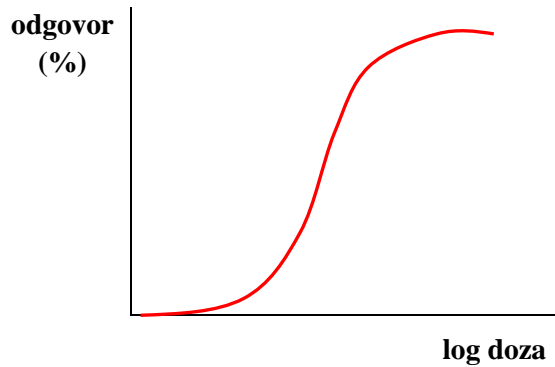
Elektrofili, oksidansi i ostali toksikanti potencijalno opasni za stanicu, imaju i proliferativni učinak. Smatra se da je to vezano uz inaktivaciju protein fosfataza koje imaju tiolne skupine u aktivnom centru. Ovi enzimi defosforiliraju i inaktiviraju receptore faktora rasta (npr. epidermal growth factor - EGF, insulin growth factor - IGF), neke protein kinaze i PIP₃, te njihovom inhibicijom dolazi do jačanja proliferacijske signalizacije. ©

Aktivacija NFκB je nužna u regeneracijskoj proliferaciji oštećenog tkiva. Međutim, ovaj transkripcijski faktor ujedno pojačava ekspresiju proupalnih citokina (TNFα, IL-1, itd.) koji, preko svojih receptora, aktiviraju NFκB. © Ovaj zatvoreni krug može dovesti do kronične upale i raka ukoliko kontinuirano oštećenje tkiva podržava NFκB signalizaciju.

Adaptacija na negativnu energetska bilancu je klasičan primjer **kompensacije štete**. Dolazi do povećane produkcije ATP-a uz smanjenje potrošnje. Senzor je AMP-aktivirana protein kinaza (AMPK). AMPK fosforilira i aktivira transportne proteine za glukozu, enzime glikolize i enzime na putu oksidacije masnih kiselina. Istovremeno inhibira sintezu glikogena, lipida, kolesterola, glukoze i bjelančevina, te rast stanice. Stanice izložene arsenitu imaju brzi rast AMP/ATP omjera i aktivnosti AMPK.

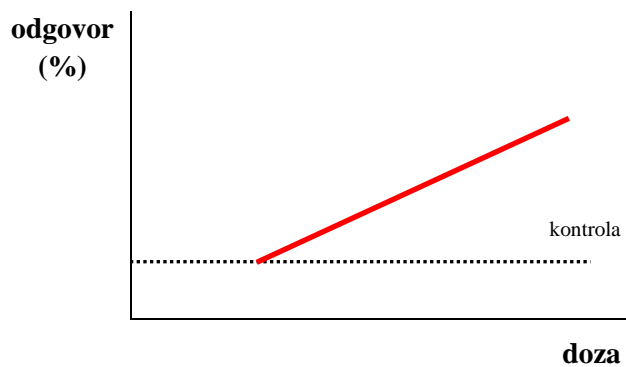
VEZA DOZE I ODGOVORA

Odnos doze i odgovora opisuje promjenu (štetnog) učinka na organizam uzrokovanu izlaganjem različitim razinama strane tvari. Tipična krivulja je prikazana dolje.

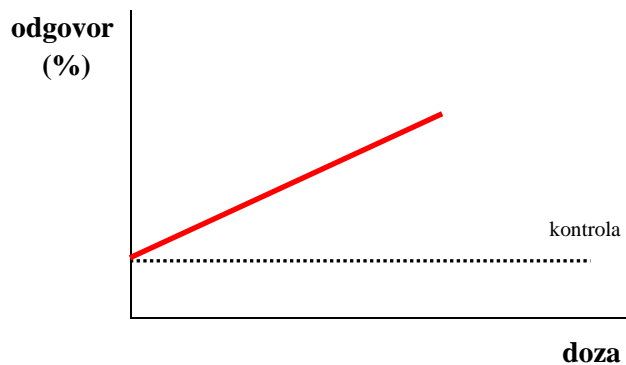


Odgovor je reakcija organizma (npr. inhibicija enzima) izražena kao postotak organizama (npr. pokusnih životinja) koje reagiraju određenim toksičnim učinkom kod pojedine doze. U skladu s gornjom krivuljom, za većinu kemikalija postoji određena doza, tzv. *prag djelovanja*, ispod kojeg se ne može uočiti učinak ili odgovor. Ovo je bitno u zakonodavnom procesu te se utvrđene doze toksikanata koje ne izazivaju nikakav učinak (vidi definiciju NOAEL-a u nastavku) koriste u definiranju sigurnog unosa aditiva ili kontaminanata. Znanstvena zajednica je podijeljena oko toga postoji li prag djelovanja i za genotoksične karcinogene te se, u regulatorne svrhe, pretpostavlja da nemaju prag djelovanja tj. da nema tako niske doze koja neće dovesti do raka. Stoga krivulje doze i odgovora mogu imati dva osnovna oblika: linearni bez praga djelovanja (tzv. LNT (linear non-threshold) model) ili model s pragom djelovanja. Model s pragom djelovanja se koristi za većinu toksikanata i polazi od pretpostavke da doza nema učinka dok se ne dostigne određeni prag. Prema LNT modelu, odgovor je izravno proporcionalan dozi, bez praga, te uvijek postoji određena razina odgovora čak i kod najniže moguće doze.

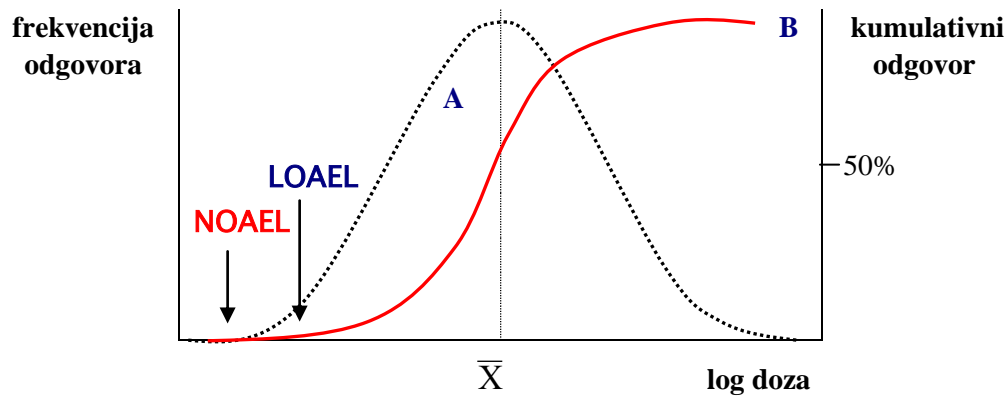
Model s pragom djelovanja:



LNT model:



Osim uobičajenog prikaza veze doze i odgovora (krivulja B), može se utvrditi i distribucija odgovora na različite doze u populaciji (A), kao što je prikazano na donjem grafikonu.



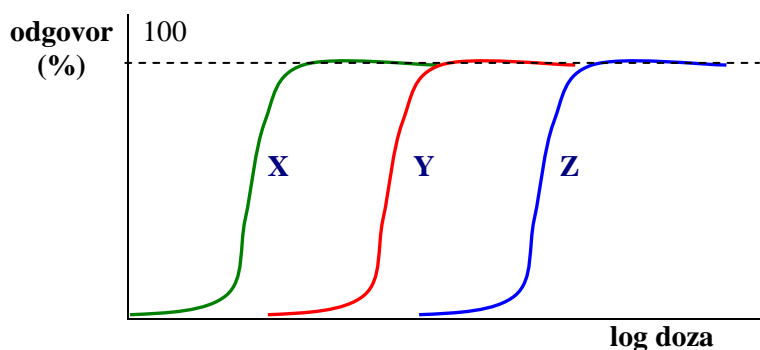
Krivulja A je krivulja normalne razdiobe s frekvencijom odgovora na toksikant na ordinati i dozom toksikanta na apscisi. Frekvencija podrazumijeva postotak ukupnog broja organizama (pokusne životinje, ispitanici) koji ima specifični odgovor kod određene doze. Specifični odgovor se opisuje u smislu 'sve ili ništa'. **Ugibaju li pokusne životinje kod te doze ili ne? Povećuje li toksikant krvni tlak iznad zadane vrijednosti ili ne?** Očito, najviše organizama reagira oko srednje doze i sve manje pri većim ili nižim koncentracijama toksikanta. Mali broj organizama, tj. najosjetljiviji dio populacije, reagira na doze koje su puno niže od srednje doze. Druga krajnost su organizmi koji reagiraju na doze puno više od srednje doze (desni dio krivulje). Ukupno, 95,5% populacije reagira na sličan način u rasponu doza $\bar{X} \pm 2 SD$.

Krivulja B prikazuje vezu doze i odgovora uz kumulativni odgovor na ordinati tj. ukupni udio organizama u skupini koji na određenu dozu reagira na specifičan način (npr. pojavom tumora). Kod srednje doze, sukladno normalnoj razdiobi, oko 50% organizama reagira specifičnim odgovorom.

Najviša od doza na koju nema odgovora je tzv. razina bez uočenog štetnog učinka ili **NOAEL** (no-observed-adverse-effect level). Također, iz krivulje se može očitati i **LOAEL** (lowest-observed-adverse-effect level) tj. najniža doza kod koje je uočen štetni učinak. Pomoću ovih veličina se utvrđuje prag djelovanja toksikanta.

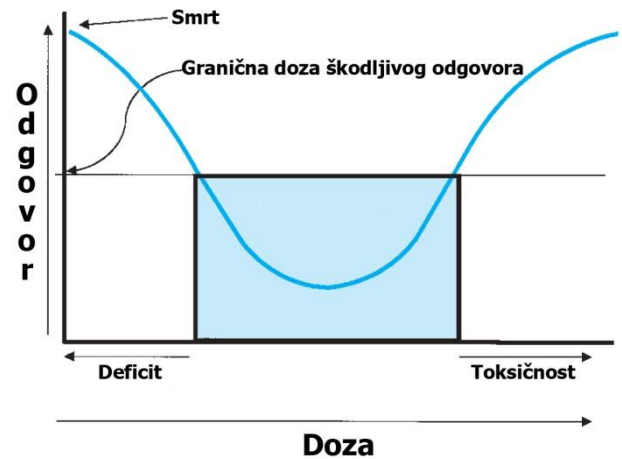
Iz krivulje kumulativnog odgovora se može očitati srednja letalna doza ili **LD₅₀**. Ova vrijednost predstavlja statistički utvrđenu dozu tvari koja uzrokuje smrt 50% životinja (tj. specifični odgovor je smrt pokusnih životinja). Ukoliko se u procjeni sigurnosti tvari uzimaju u obzir i štetni učinci koji ne dovode do smrti životinja, može se utvrditi i tzv. efektivna doza ili **ED₅₀**, koja se odnosi na dozu koja izaziva određeni učinak u 50% životinja ispitivane populacije.

Afinitet toksikanta za ciljnu molekulu se također može ustanoviti usporedbom krivulja veze doze i odgovora. Na donjoj slici je prikazana razlika u jačini odgovora tri toksikanta koji se vežu za istu ciljnu molekulu različitim afinitetima. Veći afinitet podrazumijeva nižu potrebnu koncentraciju za isti učinak (time toksikant X ima najviši afinitet).

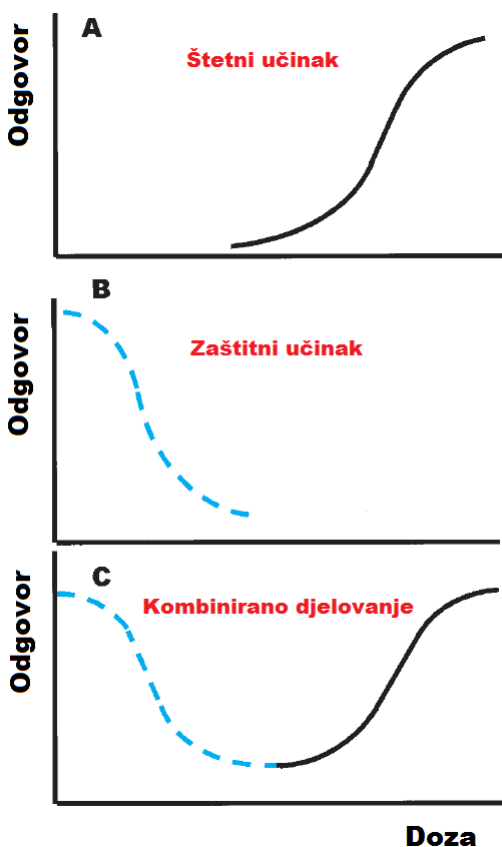
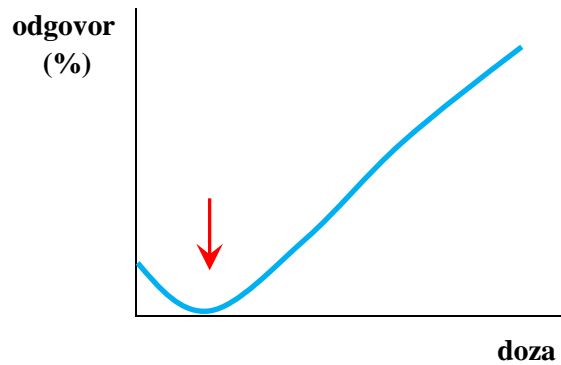


Nekonvencionalni odnosi doze i odgovora

Na donjoj slici je prikazan uobičajen **odnos doze i odgovora za hranjive tvari**, pri čemu su kod niskih doza ili potpunog nedostatka moguće teške štetne posljedice, uključujući smrt. Zatim postoji određen raspon doza koji podrazumijeva optimalno funkcioniranje organizma (tzv. područje homeostaze, označeno plavim pravokutnikom na slici), dok daljnje povišenje unosa hranjive tvari povećava rizik toksičnih posljedica za organizam. **Klasični primjer je vitamin A koji u jako visokim dozama može biti smrtonosan.**



Postoji velik broj dokaza koji upućuju na povoljne učinke malih doza toksikanata, iako izazivaju štetne učinke kod viših doza. Riječ je o **hormezi** koja je adaptivni odgovor na niske razine stresa ili oštećenja, što može imati za posljedicu pojačanu otpornost na toksikante. Male koncentracije toksikanta, primjerice, potiču ubranu sintezu sustava popravka i zaštite, što rezultira slabijim toksičnim učinkom u odnosu na više, ali i niže doze. Tipična krivulja hormetičnog odnosa doze i toksičnog odgovora izgleda ovako:



Ukoliko se ispituje širok raspon doza te odgovor na toksikant podijeli na štetni učinak (pri višim dozama) te zaštitni učinak, očigledan kod niskih doza, dobije se dvofazna krivulja u obliku slova U, vrlo slična vezi doze i odgovora za nutrijente. **Možda najpoznatiji primjer hormetičkog djelovanja toksikanta iz hrane je etanol.** Kod umjerene izloženosti smanjuje rizik kardiovaskularnih bolesti (potpuno sukladno U-krivulji, veći rizik imaju osobe koje ga uopće ne konzumiraju od umjerenih konzumenata), dok kronično visok unos povećava rizik raka usta, ždrijela, jednjaka, grla, kao i ciroze i raka jetre.

Univerzalnost blagotvornog djelovanja toksikanata kod niskih doza najvjerojatnije neće dovesti do promjene načina na koji se donose zakoni o izloženosti zbog niza razloga. Najvažniji uključuju višestruko djelovanje toksikanta i izloženost smjesama tvari identičnog djelovanja. **Uočeno je, npr., da niske doze kadmija pomažu spriječavanju nekih vrsta raka, dok istovremeno povećavaju rizik raka remećenjem hormonske ravnoteže.**

UČINCI TOKSIKANATA U ORGANIZMU

Prema **lokalizaciji učinka** postoji lokalno i sistemsko djelovanje toksikanta.

Lokalni učinci su oni koji nastaju na mjestu dodira s organizmom, npr. na koži, očima i sluznici respiratornog i probavnog trakta. **Ovakvo uglavnom djeluju kiseline, lužine i druge nagrizajuće tvari.**

Sistemski učinci nastaju poslije apsorpcije toksikanta i to na pojedinim organima ili cjelinama organizma, poput probavnog sustava, krvotoka, respiratornog sustava, i sl. **Benzen apsorbiran preko dišnog trakta je toksičan za stanice koštane srži i može uzrokovati leukemiju.**

Neke tvari uzrokuju istovremeno i lokalne i sistemne učinke. **Na primjer, koncentrirana fluorovodična kiselina u dodiru sa 2,5% površine kože može izazvati smrt poslije apsorpcije zbog stvaranja netopljivih soli između fluorida i esencijalnih minerala Ca i Mg.**

Obzirom na **tijek djelovanja** postoje akutni i kronični učinci toksikanta.

Akutni učinci nastaju neposredno po apsorpciji razmjerno velike doze toksikanta koja brzo uzrokuje toksičnu razinu u krvi i tkivima.

Kronični učinci se očituju tek poslije izvjesnog vremena, obično su blaži, a ponekad i kvalitativno drukčiji od akutnih učinaka. Nastaju kao rezultat višekratnog unošenja malih doza toksikanta, nedovoljnih da izazovu akutne učinke. Kronični učinci obično nastaju uslijed kumulacije toksikanta ili zbrojem štetnih učinaka svake pojedine doze ukoliko je oporavak od štete spor ili nepotpun do izlaganja novoj dozi.

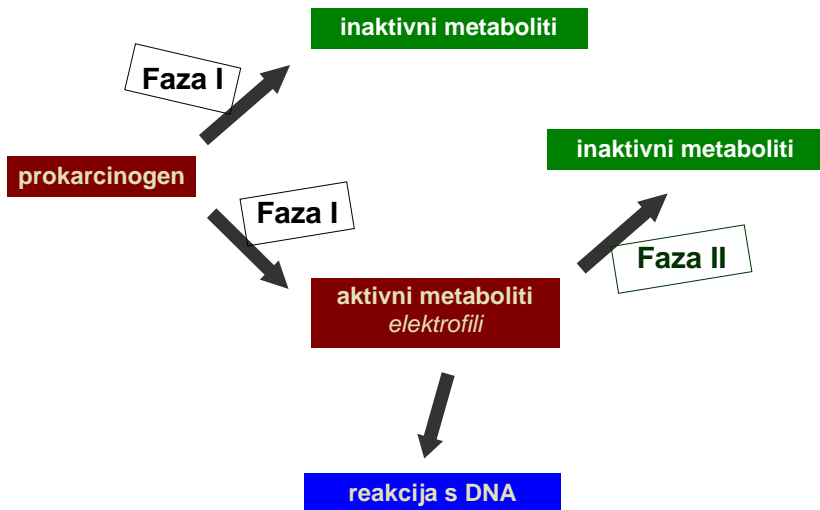
	Akutna toksičnost	Kronična toksičnost
etanol	depresija CNS-a	ciroza jetre
anorganski arsen	oštećenja GIT-a	rak jetre

Za razliku od testova na pokusnim životinjama gdje se najčešće toksičnost ispituje izlaganjem samo jednoj tvari, ljudi su najčešće izloženi složenim smjesama tvari (toksikanti u vodi, hrani, uzimanje lijekova, pušenje, itd.) te je nužno razmotriti **interakcije između kemikalija**. Primjeri najvažnijih interakcija i hipotetske promjene štetnog učinka kombinacije u odnosu na samostalni učinak tvari, navedeni su u donjoj tablici.

	Udio populacije (%) sa simptomima toksičnosti		
	toksični učinak tvari A	toksični učinak tvari B	toksični učinak kombinacije A + B
Antagonizam	20%	30%	5%
Aditivnost	20%	30%	50%
Potencijacija	0%	20%	50%
Sinergizam	5%	10%	100%

Antagonizam

Jedna tvar umanjuje toksičnost druge. Djelovanje se temelji na principu antidota tj. natječu se za ciljno mjesto (npr. nalokson, antagonist morfina), na adsorpciji (npr. aktivni ugljen, nosači i razrijeđivači praškastih pesticida), neutralizaciji (antacidi), oksidoredukciji (askorbinska kiselina reducira nitrite i time sprječava reakciju nitrita sa sekundarnim ili tercijskim aminima i nastanak karcinogenih nitrozamina), ® i dr. Tvari koje induciraju biotransformacijske enzime mogu djelovati antagonistički ubrzavanjem razgradnje toksikanta. **Vidi primjer s prokarcinogenom na donjoj slici. Ukoliko nekakav toksikant indukcijom povećava aktivnost enzima faze I koji će prokarcinogen brzo prevesti u inaktivni metabolit, riječ je antagonistu.**



Također, tvari koje inhibiraju metaboličke enzime mogu djelovati antagonistički ukoliko se metabolizmom neki toksikant bioaktivira tj. prevodi u toksičniji metabolit. Primjerice, etanol je kompeticijski inhibitor alkohol dehidrogenaze kojom se metanol prevodi u formaldehid, a zatim u toksičnu mravlju kiselinu. Antagonistički djeluju i kemikalije koje ubrzavaju izlučivanje pojedinog toksikanta. Npr. utjecajem na pH. Organske kiseline će se bolje izlučivati u alkaličnom urinu. Prehrana bogata bjelanjčevinama daje blago kiseli urin, a

vegetarijanska blago alkaličan. ©

Aditivnost

Toksičnost kombinacije dvije tvari je jednaka sumi toksičnih učinaka pojedinačnih komponenti. Npr. organofosfatni insekticidi: dva različita proizvoda koja djeluju na isti način tj. inhibicijom acetilkolinesteraze koja sudjeluje u prijenosu živčanih impulsa. Slično djeluju alkohol i sredstva za smirenje = depresija CNS-a, te klorirani insekticidi i halogenirana otapala = hepatotoksičnost.

Potencijacija i sinergizam

Obje interakcije dovode do jačanja učinka kombinacije u odnosu na pojedinačne sastojke. Mogući mehanizmi uključuju: poboljšavanje apsorpcije (citrat poboljšava apsorpciju aluminija), interakcije u probavnom traktu (nitriti u kiselom mediju želuca daju nitrozil ion koji reagira s aminima iz hrane dajući karcinogene nitrozamine), oslobađanje iz skladišnih mjesta, indukciju enzima (ukoliko će metabolizam rezultirati toksičnijim spojem; vidi primjer s bioaktivacijom prokarcinogena na slici: indukcijom specifičnih enzima faze I iz prokarcinogena nastaje karcinogen) ili inhibiciju biotransformacijskih enzima (ako enzim detoksificira ksenobiotik), usporavanja izlučivanja (npr. organske baze se mogu reapsorbirati difuzijom u alkaličnom urin; također kompeticijom za sustave aktivnog tubularnog izlučivanja) (vidi **IZLUČIVANJE TOKSIKANATA**), itd. Potencijacija se javlja kad kemikalija koja nema specifični toksični učinak, čini neki toksikant toksičnijim. Primjer je vezanje za proteine plazme, pri čemu netoksična tvar može potaknuti disocijaciju toksikanta s proteina plazme, povisujući koncentraciju slobodnog oblika koji dopjeva do mjesta djelovanja. Sulfonamidi (antibiotici) mogu potaknuti disocijaciju sulfonilurea (antidijabetici) s plazma proteina, naglo povisujući koncentraciju slobodnog oblika što može dovesti do hipoglikemijskog šoka. Sinergizam dovodi do drastičnog povećanja toksičnog učinka kombinacije dva toksikanta. Stvarni toksični učinak je znatno veći od sume toksičnih učinaka pojedinačnih sastojaka. Na primjer, rizik raka pluća uslijed izloženosti azbestu i duhanskom dimu je značajno veći od sume rizika pojedinačnih toksikanata. Kombinacija CCl_4 i alkohola je znatno hepatotoksičnija od samostalnog djelovanja.

Ista kombinacija toksikanata može pokazivati različite tipove interakcija na različitim mjestima u organizmu. Tako će klorirani insekticidi i halogenirana otapala djelovati aditivno u jetri, ali imaju antagonističke učinke u CNS-u. Klorirani ugljikovodici dovode do stimulacije, a halogenirana otapala do depresije CNS-a.

Oblikom potencijacije i/ili sinergizma može se smatrati i interakcija pojedinih toksikanata s elektromagnetskim zračenjem. Fototoksičnim reakcijama se nazivaju one pri kojima se pobuđena molekula prevodi u toksični spoj ili stvara slobodne radikale koji oštećuju lokalno tkivo. Npr. psoraleni (celer) se interkaliraju među lance DNA u stanici, ali tek nakon aktivacije UV zračenjem u koži stvaraju kovalentne veze s DNA. Kod fotoalergijskih reakcija se kemikalija pobuđuje sunčevim svjetlom te prelazi u oblik koji se povezuje s proteinima, pri čemu može nastati neoantigen koji izaziva aktivaciju imunog sustava (vidi **OVDJE**). Derivati p-aminobenzojeve kiseline (koristili su se kao kemikalije koje apsorbiraju UV zračenje u kremama za sunčanje) su danas uglavnom napušteni dobrim dijelom i zbog problema s alergijskim reakcijama.

Promjena reakcije organizma ponavljanim izlaganjem je čest fenomen te je uočeno jačanje ili slabljenje odgovora organizma kod sljedećeg kontakta.

Jačanje reakcije

Najčešće uslijed nakupljanja toksikanta u organizmu tijekom ponavljano izlaganja. Osim toga, moguća je i kumulacija štete, ukoliko organizam ne uspije popraviti štetne učinke prethodne doze prije izlaganja novoj dozi. Npr., ireverzibilna inhibicija acetilkolinesteraze organofosforinim insekticidima: ponovljenom izloženošću malim, ali netoksičnim dozama, aktivnost ovog enzima neprestano opada i može pasti ispod kritične razine, ako izloženost ne prestane. Alergijska reakcija je još jedan način višestrukog jačanja reakcije na neke toksikante (vidi **IMUNOTOKSIČNOST**).

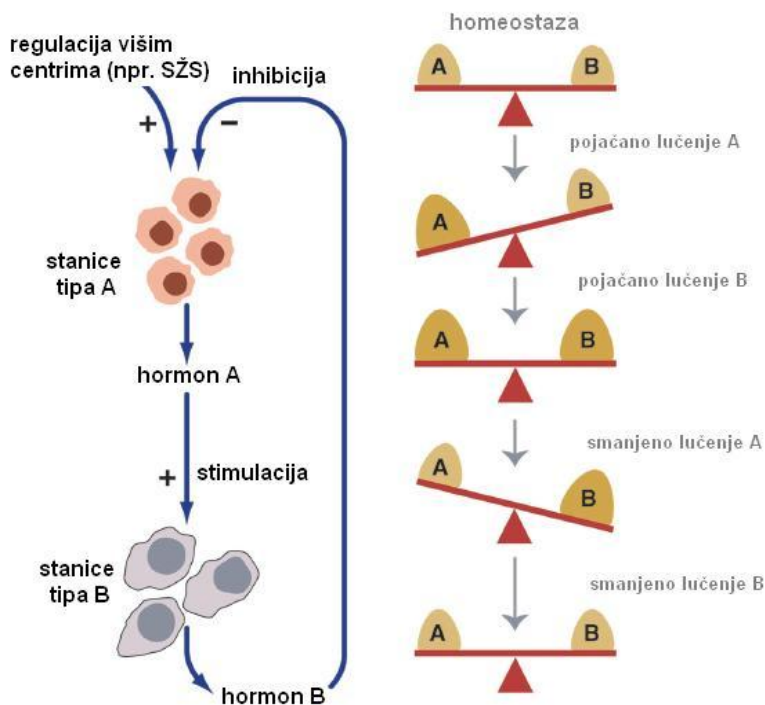
Slabljenje reakcije

Odgovor organizma na toksikant može slabiti uslijed tzv. stečene tolerancije (npr. na alkohol, nitrite, i sl.). Najčešći uzrok tolerancije je indukcija enzima koji sudjeluju u inaktivaciji toksikanta. Tolerancija na alkohol se pripisuje indukciji alkohol dehidrogenaze.

Najčešće i najrelevantnije **vrste toksičnih učinaka** navedene su u nastavku. Treba reći da većina toksikanata istovremeno izaziva višestruke posljedice u organizmu, ovisno o dozi, trajanju i tempiranju izloženosti, osjetljivosti ciljnog organizma, itd. Tako postoje endokrini disruptori karcinogenog ili imunotoksičnog djelovanja, mutageni koji su karcinogeni i teratogeni, i dr.

Remećenje endokrine funkcije

Mnogi toksikanti (tzv. endokrini disruptori), zbog sličnosti građe, mogu se vezati za hormonske receptore u organizmu te remetiti normalnu funkciju hormona. Obzirom na endokrini nadzor nad velikim brojem procesa u organizmu, narušena endokrini ravnoteža se očituje promjenama na različitim organima i sustavima organizma, poput reproduktivnog sustava, imunog sustava, i sl. Osnovna svrha endokrinog sustava je reakcija udaljenog organa na signale iz drugog organa ili okoline. Pojednostavljeno, principom klackalice prikazanim na slici, nastoji



se održati homeostaza ili ravnotežno stanje. Npr., nadbubrežna žlijezda (stanice tipa B na slici) izlučuje kortizol, glukokortikoidni hormon. Kortizol putem krvi dopijeva do hipofize (stanice tipa A) i inhibira izlučivanje ACTH (adrenokortikotropni hormon) koji stimulira izlučivanje kortizola. Petlje povratne sprege često uključuju i živčani sustav (CNS \Rightarrow hipotalamus \Leftrightarrow hipofiza \Leftrightarrow organi) te se ovaj sustav naziva i neuroendokrinim sustavom. U svrhu prilagodbe životnim uvjetima, u fetalnom i neonatalnom razdoblju organizam prolazi fazu programiranja endokrine homeostaze (odnosno utvrđivanja razine signala koji će izazvati protureakciju). Ovo se provodi tzv. epigenetskim modifikacijama koje reguliraju gensku ekspresiju (više **OVDJE**).

Upravo u ovoj fazi su organizmi najosjetljiviji, te abnormalni okoliš može dovesti do odgovarajuće adaptacije tj. stanja trajne neravnoteže. Djeca koja su bila pothranjena tijekom trudnoće mogu razviti tzv. inzulinsku rezistenciju (smanjeno djelovanje inzulina na mišićne i masne stanice i time slabiji ulazak glukoze u iste) koja perzistira i u odrasloj dobi. Najvjerojatniji uzrok je nedovoljna opskrba glukozom u fetalnom razdoblju uslijed čega je došlo do programiranja odnosa inzulina i glukokortikoida (izazivaju inzulinsku rezistenciju) koji rezultira smanjenom potrošnjom glukoze u mišićima i masnom tkivu, pri čemu ostaje više glukoze za važnija tkiva poput

mozga. Dakle, izloženost endokrinim disruptorima u odrasloj dobi se najčešće može kompenzirati homeostatskim mehanizmima i neće imati značajniji učinak. Djelovanje, pak, za vrijeme programiranja endokrinog sustava može dovesti do trajne promjene funkcije ili osjetljivosti na stimulatorne ili inhibicijske signale.

Zadnjih desetljeća je zabilježen veći broj ekoloških incidenata uzrokovanih prvenstveno sintetskim endokrinim disruptorima, uz najrazličitije uočene poremećaje koji su ponekad bili popraćeni smanjenjem populacije ptica, vodozemaca, reptila, riba ili sisavaca. Također, brojna laboratorijska ispitivanja upućuju na opasnosti od tvari s hormonskim djelovanjem, a utvrđena je i veza pojedinih poremećaja kod ljudi s izloženošću ovim toksikantima. **Npr., tretman skotnih ženki miševa bisfenolom A (monomer ili aditiv plastici) kod muškog potomstva je povećao rizik malformacija spolnih organa, a kod ženki rizik raka dojke. Veći broj malformacija spolnih organa uočen je i kod potomstva trudnica izloženih ftalatima (aditivi plastici iz koje mogu migrirati u hranu).** Među najčešće manifestacije djelovanja endokrinih disruptora ulaze:

Reproduktivni i razvojni poremećaji. Zabilježeno je kompromitirano razmnožavanje uslijed stanjivanja kore jajeta (kod ptica), ili uslijed demaskulinizacije i feminizacije mužjaka ili maskulinizacije i defeminizacije ženki. Također, izloženost estrogenima ili antiandrogenima povezano je s malformacijama reproduktivnih organa mužjaka, smanjenom plodnošću (npr. zbog redukcije broja spermija u ejakulatu), promjenom omjera spolova tj. većim udjelom ženki, spontanim pobačajima, uranjenim pubertetom, i dr.

Poremećaji živčanog sustava. Obično je riječ o endokrinim disruptorima izazvanim morfološkim i/ili funkcionalnim promjenama neuroendokrinog sustava (npr. tijekom fetalnog ili neonatalnog perioda) koje izazivaju trajne neurobihevioralne posljedice (promjene funkcije i ponašanja). **Npr. djeca trudnica izloženih smjesi polikloriranih bifenila i polikloriranih dibenzofurana putem kontaminiranog rižinog ulja (Yu-Cheng incident, Tajvan) pokazala su IQ deficite.** Spolni hormoni imaju ulogu u regeneraciji živčanog tkiva, zaštiti od štetnih tvari i sl., pa ga remećenje njihove funkcije može učiniti podložnijim štetnim procesima.

Jačanje ili slabljenje funkcije imunog sustava. Imuni i neuroendokrini sustavi surađuju u održavanju fiziološke homeostaze te postoji potencijal štetnog djelovanja na imuni sustav remećenjem endokrine funkcije, što je i dokazano uz posljedice poput veće sklonosti autoimunim bolestima (dietilstilbestrol) ili veće učestalosti infekcija (poliklorirani bifenili, dioksin).

Rak. Uočeno je povećanje učestalosti raka organa osjetljivih na djelovanje hormona poput raka dojke, testisa, prostate, maternice, štitnjače, i sl. Dokazi ukazuju na vjerojatnost kratke izloženosti fetusa, novorođenčeta ili adolescenta i razvoja raka odmah ili kasnije. Hormoni mogu djelovati i kao promotori karcinogeneze (vidi **KARCINOGENOST**) nakon inicijacije tumorskog procesa genotoksičnim agensima. Slabljenje imunog sustava endokrinim disruptorima također može uzrokovati veću podložnost raku.

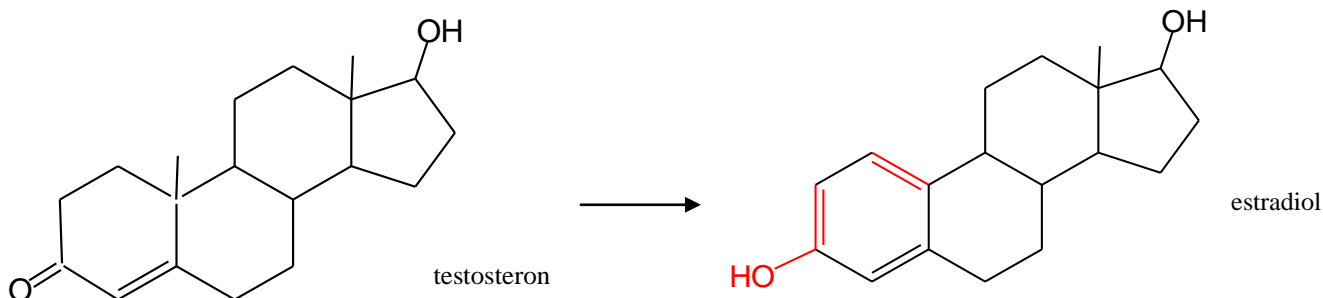
Najvažniji i najčešći mehanizmi djelovanja endokrinih disruptora navedeni su u nastavku.

Najrelevantnije je vezanje za transkripcijske faktore, npr. receptore steroidnih hormona poput estrogenskih ili androgenskih receptora (za mehanizam djelovanja vidi poglavlje **TOKSIKODINAMIKA**). Vezanje za transkripcijske faktore, dakle, može pojačavati ili smanjivati transkripciju gena koji kodiraju različite proteine koji reguliraju ekspresiju gena (uključujući epigenetske promjene) i/ili razine djelatnih bjelančevina (više: **STANIČNA DISFUNKCIJA**).

Primjerice, postoji nekoliko skupina tvari estrogenog djelovanja: ksenoestrogeni (tvari sintetskog podrijetla kao što su DDT, poliklorirani bifenili, dioksini, ftalati, bisfenoli, i dr.), fitoestrogeni (estrogeni iz biljaka: lignani, flavonoidi, kumestani) i mikoestrogeni koje sintetiziraju plijesni (zearalenon). Učinak ovisi o afinitetu za receptor, agonističkom ili antagonističkom djelovanju nakon vezanja za receptor, razinama cirkulirajućeg hormona u organizmu, i dr. **Npr., o,p-DDT ima 10000 puta manji afinitet za estrogenski receptor od endogenog estradiola i dvostruko je slabiji agonist od estradiola. Negativni utjecaj o,p-DDT na reprodukciju vezanjem za estrogenske receptore rezultat je manjeg afiniteta za estrogenske receptore, zbog čega konkurencijom umanjuje estrogenske učinke ako je razina cirkulirajućeg estradiola visoka (ovisno o fazi mjesečnog ciklusa). Ukoliko je razina estradiola niska, o,p-DDT može pojačati estrogenske učinke. S druge strane, dietilheksilftalat (aditiv plastici) je antagonist androgenskih receptora (ili antiandrogen) jer se veže za iste, konkurirajući endogenom androgenu**

(testosteron), ali ne izaziva nikakav učinak. Postoje naznake i da bi smjese tvari estrogenog djelovanja mogle djelovati sinergistički pojačavajući aktivaciju receptora.

Dosta toksikanata nakon vezanja za transkripcijske faktore dovodi do indukcije (agonisti) ili smanjenja aktivnosti enzima (antagonisti), što također može utjecati na endokrinu ravnotežu ukoliko ti enzimi sudjeluju u sintezi ili razgradnji (steroidnih) hormona. Npr., poliklorirani bifenili i TCDD aktivacijom AhR induciraju hidrosilazu aril ugljikovodika (što je zapravo citokrom CYP1A1) koja provodi korak u metabolizmu steroidnih hormona. Uočena je i pojačana konverzija androgena u estrogene indukcijom aromataze tj. citokroma CYP19A1. Herbicid atrazin tim mehanizmom uzrokuje demaskulinizaciju i feminizaciju vodozemaca.



Toksikanti mogu izazivati izravnu inhibiciju enzima značajnih u sintezi (ili razgradnji) hormona. Organokositreni spojevi poput tributilkositra (to su tzv. moluskicidi jer kontroliraju populaciju puževa tj., konkretnije, školjkaša koji obrastaju površinu brodova mijenjajući im hidrodinamička svojstva) sprječavaju pretvorbu testosterona u estradiol aromatazom, izazivajući maskulinizaciju riba i školjkaša.

Neuroendokrina sprega podrazumijeva odražavanje promjena u živčanom sustavu na endokrinu funkciju. Tvari koje imaju djelovanje na živčani sustav time mogu remetiti i endokrinu homeostazu. Tako amfetamini povisuju izlučivanje neurotransmitera dopamina koji smanjuje lučenje prolaktina u hipofizi. Posljedica je smanjeno lučenje mlijeka dojilja.

Neki toksikanti stupaju u interakcije s proteinima plazme specijaliziranim za hormone, poput transtiretina koji veže i transportira hormone štitnjače, SHBG (sex hormone-binding globulin) koji veže spolne hormone, itd. Vezanjem ili utjecajem na razine ovih proteina toksikanti utječu na raspodjelu hormona u organizmu. Npr., polibromirani difenil eteri (usporivači plamena koji se dodaju namještaju, i sl., a mogu se pronaći i u hrani) i njihovi metaboliti se vežu za ovaj protein plazme bolje od samih tiroidnih hormona. ©

Imunotoksičnost

Očitovanje imunotoksičnog djelovanja može uključivati izravno djelovanje kemikalije na imuni sustav rezultirajući imunosupresijom (uz smanjenu otpornost na infektivne bolesti i rak) ili strana tvar može svojim antigenskim svojstvima izazvati alergijske reakcije (reakcija na kemikaliju) ili autoimunost (reakcija na promijenjene molekule tijela).

Imuni sustav domaćina, kao zaštita od infektivnih agenasa i tumorskih stanica, može se ugrubo podijeliti na nespecifični ili prirodni imuni sustav i specifičnu ili stečenu imunost. Prirodni imuni sustav je prva, brzo djelujuća linija obrane koja je uglavnom lokalizirana na granici tijela s okolišem (koža, epitel GIT-a, pluća, itd. i izlučevine poput sline, sluzi, mlijeka, i sl.) i djeluje protiv širokog raspona uobičajenih patogenih mikroorganizama. Uključuje fagocite (monocite i makrofage, neutrofile, dendritske stanice) i druge leukocite (npr. NK (natural killer) stanice, eozinofile, bazofile), lizozim (enzimi koji razgrađuju komponente bakterijske membrane), antimikrobne peptide, komplement (grupa bjelančevina koja stvara rupe u membrani patogena), i dr. Stečeni imuni sustav, čiju funkciju provode T- i B-stanice, inducira se nakon prvog dodira s antigenom, pri čemu posreduju leukociti prirodnog imunog sustava. T-stanice imaju na membrani receptor specifičan za određeni antigen i diferenciraju u citotoksične T-stanice (Tc) ili pomoćničke T-stanice (Th), što čini osnovu tzv. **stanične imunosti**. Kod kontakta s antigenom patogena ili stranom tvari dolazi do aktivacije i umnožavanja T-stanica. Tc leukociti izravno uništavaju stanice koje nose određeni antigen (navodeći ih na apoptozu), dok Th leukociti izlučuju signalne tvari (citokine) kojima privlače i aktiviraju druge leukocite (Tc i fagocite te B-stanice). B-stanice na površini također nose receptor

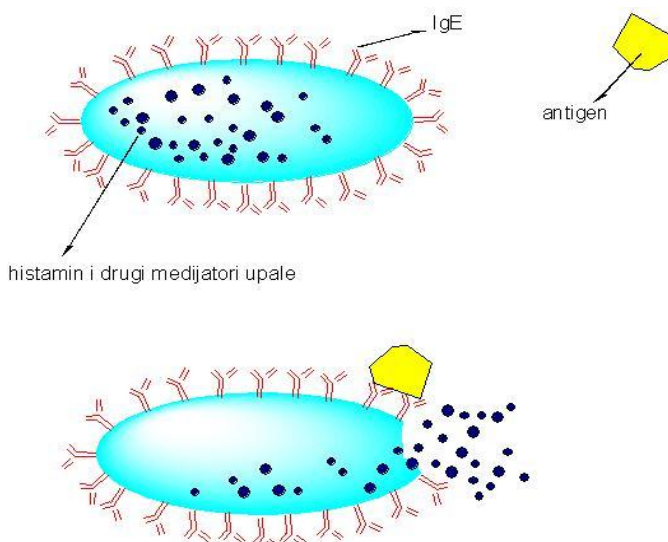
specifičan za određeni antigen i nakon dodira s antigenom (uz asistenciju Th stanica koje im potiču umnažanje) izlučuju cirkulirajuća protutijela (imunoglobuline IgA, IgE, IgM, IgD ili IgG). To je tzv. **humoralna imunost**. Imunoglobulini se vežu za antigen i označavaju ga prirodnom imunom sustavu (fagociti, ubilačke stanice, komplement) koji ga neutralizira. Strana kemijska tvar ili antigen može biti veće molekulske mase (bjelančevine, veliki polisaharidi, veliki lipoproteini), te su antigeni sami po sebi, ili može biti riječ o maloj molekuli (tzv. hapten) koja se prethodno veže za veću antigensku molekulu i time i sama postaje antigen.

Najpoznatiji oblici imunopresije, tj. smanjenja imunog odgovora, su rezultat štetnog djelovanja na stanične prekursore imunih stanica (hematopoetske matične stanice) u koštanoj srži (npr. **metotreksat** (kemoterapija tumora), **azatioprin** (liječenje autoimunih bolesti i sprječavanje odbacivanja kod transplantacije organa), **benzen**, i dr.) ili remećenja maturacije i proliferacije B ili T stanica (**organokositreni spojevi**, **poliklički aromatski ugljikovodici**, **dioksin**, itd.). Također, međusobna regulacija neuroendokrino i imunog sustava upućuje na osjetljivost imunog sustava na djelovanje endokrinih disruptora (poliklorirani bifenili) i/ili neurotoksičnih tvari (etanol), pri čemu najopsežnije promjene, uz relativno male izloženosti, nastaju u kontekstu razvojne toksičnosti.

Određen broj toksikanata može dovesti do imunostimulacije ili jačanja imunog odgovora, pokretanjem mehanizama specifične imunosti. Imunostimulacija je, u ovom kontekstu, štetna jer dovodi do prejakog odgovora imunog sustava na bezopasne antigene. Riječ je o reakcijama preosjetljivosti (npr. alergijske ili autoimune reakcije) kod osoba koje su kod prvog dodira s ksenobiotikom ili sastojkom hrane postale senzibilizirane na tu tvar. Postoje četiri tipa ovih reakcija:

Tip I ili anafilaktička preosjetljivost

Prvi dodir s antigenom dovodi do umnožavanja specifičnih imunoglobulina E koji se vežu za receptore na površini određenih leukocita (bazofila, eozinofila i mastocita). Vežanjem antigena alergena za IgE dovodi do izlučivanja medijatora upale iz ovih stanica (histamin, prostaglandini, citokini, i dr.) uz učinke poput vazodilatacije i povećane propusnosti kapilara, boli, bronhokonstrikcije, privlačenja drugih leukocita (fagocita i eozinofila) i trombocita, itd., što rezultira simptomima alergije. Simptomi mogu biti lokalnog karaktera ili sistemski, što se naziva anafilaktičkim šokom. Ovaj, najčešći tip preosjetljivosti, mogu izazvati brojne tvari i antigeni iz hrane: penicilin, sulfonamidi, svinjski inzulin, bjelančevine kikirikija, oraaha, mlijeka, jaja, školjkaša, i dr.



Tip II ili reakcije preosjetljivosti uzrokovane djelovanjem protutijela prema stanicama

Naziva se i citotoksičnom preosjetljivosti. Protutijela (IgG i IgM) se vežu na antigene na površini stanica i time mogu: aktivirati komplement (proteini u krvi koji se vežu za kompleks antigena i antitijela i uništavaju označenu stanicu), olakšati fagocitozu, omogućiti citotoksično djelovanje ubilačkih stanica (NK-stanice). Antigeni mogu biti sastavni dio stanične membrane ili se radi o haptenu vezanim na membranu stanica. Javlja se kod hemolitičke anemije (imuni sustav napada eritrocite) uzrokovane ksenobiotičima poput cefalosporina ili levodope, ili kod autoimunih bolesti poput mijastenije gravis (imuni sustav napada stanice s acetilkolinским receptorima).

Tip III ili reakcije preosjetljivosti uzrokovane imunokompleksima

Nastaju kompleksi antigena i IgG ili IgM protutijela u krvi. Imunokompleksi u pravilu ne uzrokuju oštećenja, već se brzo uklanjaju fagocitozom. Ako je, pak, količina antigena velika, takva ostaje dulje vrijeme, a odstranjivanje imunokompleksa nije dovoljno brzo, imunokompleks može aktivirati komplement i fagocite što uzrokuje upalnu reakciju. Ove reakcije se javljaju kod autoimunih bolesti, dugotrajnih infekcija, i sl. Tzv. **'farmerska pluća'** su reakcija izazvana imunokompleksima inhaliranih antigena. Serumaska bolest se javlja kao reakcija na antigene iz cjepiva poput tetanus antitoksina, dok glomerulonefritis može nastati kao posljedica odlaganja imunokompleksa u

bubrezima. Različite kemijske tvari mogu izazvati autoimune reakcije ovog tipa: poliklorirani bifenili, živa, kadmij, srebro, zlato, lindan, SiO₂, i dr.

Tip IV ili preosjetljivost posredovana stanicama

Naziva se i kasna preosjetljivost jer se najjači simptomi javljaju tek nakon 24 h. Pri ponovnom dodiru s istim antigenom specifične Th stanice izlučuju citokine koji privlače i aktiviraju citotoksične T-stanice i fagocite koji uništavaju stanice s antigenom, oštećujući okolno tkivo, rezultat čega je upalna reakcija. Primjer je kontaktni dermatitis izazvan različitim organskim i anorganskim tvarima (nikl iz nakita, toksin iz otrovnog bršljana, kromati, i sl.) te tzv. fotoalergija koju izaziva fotoantigen u koži nakon ekscitacije ultraljubičastim zračenjem (više **OVDJE**). Reumatoidni artritis i multipla skleroza su autoimune bolesti koje nastaju ovim mehanizmom preosjetljivosti.

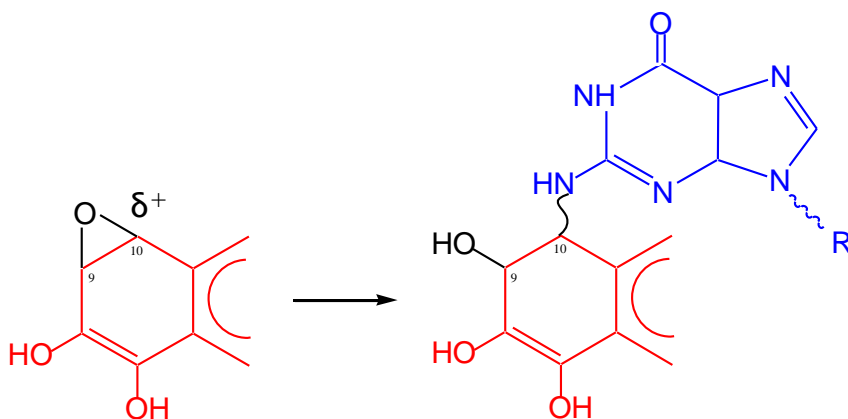
Postoje i tvari koje mogu izazvati više tipova reakcija preosjetljivosti. Primjerice, penicilin posreduje sva četiri tipa preosjetljivosti. Ponekad se može uočiti i progresija preosjetljivosti poput lateks alergena koji u početku obično izazivaju kontaktnu osjetljivost (tip IV) koja uzastopnim izlaganjem može prijeći u anafilaktički oblik preosjetljivosti. **Ustanovljeni su tragovi lateksnog brtvila pakovanja čokoladica na proizvodu što može izazvati anafilaktički šok kod senzibiliziranih osoba.** Zabilježeni su i slučajevi unakrsne reakcije na antigene. **Iako je u načelu, kontaktni alergen, p-aminobenzojeva kiselina može povećati rizik od reakcija preosjetljivosti tipa I na lokalne anestetike (benzokain) zbog slične kemijske građe.**

Genotoksičnost

Riječ je o sposobnosti toksikanta da ošteti genetski sklop tj. DNA, pri čemu, ako je riječ o stabilnim promjenama, nastaju mutacije. Postoji distinkcija u značenju pojmova genotoksičnost i mutagenost koji se često koriste kao sinonimi. Naime, mutagenost je sposobnost izazivanja mutacija, dok genotoksično djelovanje ne mora uvijek dovesti do mutacije.

Spontane (kemijska nestabilnost baza i greške pri replikaciji) i/ili inducirane (genotoksične tvari, UV-zračenje, ionizirajuće zračenje) mutacije mogu uzrokovati bolesti i poremećaje promjenama DNA spolnih ili somatskih stanica. Mutacije spolnih stanica uzrokuju nasljedne bolesti (Downov sindrom, hemofilija, anemija srpastih stanica, i dr.), neplodnost, teratogene i druge učinke. Mutacije somatskih stanica mogu rezultirati bolestima poput raka ili ateroskleroze, te poremećajima poput teratogeneze ili starenja. Postoji vrlo dobra korelacija između mutagena i karcinogena, pri čemu se 70% tvari koje su karcinogene kod životinja pokazalo genotoksičnim u jednom ili više vrsta testova.

Oštećenja izazvana toksikantima mogu uključivati lom lanca ili promjene na razini baza i nukleotida.



benzo[a]piren 9,10-diol epoksid

Potnije je najčešće posljedica stvaranja adukata na DNA, pri čemu se elektrofilna molekula ili slobodni radikal kovalentno povezuju s nukleofilnim atomima (npr. NH₂ skupine baza, na slici). Adukti mogu rezultirati zamjenom jednog para baza drugim (A : T --> G : C), tzv. točkastim mutacijama, kod replikacije DNA ili brisanjem ili dodatkom parova baza (frameshift mutacije). © Osim adukata, toksikanti se mogu umetati među lance

DNA (interkalacija), mogu izazivati deaminaciju baza, stvarati dimere unutar jednog lanca ili između komplementarnih lanaca, itd. Također, neke tvari ometaju procese umnožavanja ili popravka DNA. Primjerice, neki metalni ioni mogu utjecati na točnost DNA polimeraza.

Prema opsegu oštećenja, genotoksični učinak može se podijeliti na oštećenja kromosoma i oštećenja gena.

Oštećenja gena podrazumijevaju manje promjene slijeda baza u DNA, tj. jednog ili nekoliko parova baza. Ovakve mutacije obično nisu letalne za stanicu, nego dovode do bolesti uslijed nedostatka ili promjene određenog proteina ili do transformacije stanica u stanice raka. [Nasljedna bolest fenilketonurija je posljedica defektnog enzima fenilalanin hidroksilaze \(koja prevodi Phe u Tyr\) zbog mutacije odgovarajućeg gena. Identificirano je više od 400 različitih mutacija ovog gena.](#) Mutacijom protoonkogeni (geni koji nadziru rast stanice) može doći do njihove aktivacije u onkogene i ekspresije proteina koji dovode do nekontroliranog rasta stanice i konačno transformacije u stanicu raka. Također, mutacije gena tzv. tumorskih supresora (nadziru rast stanice, npr. p53 protein koji spriječava diobu stanice ili izaziva programiranu smrt stanice (apoptoza) ukoliko je DNA oštećena) inaktiviraju ove gene i njihove proteinske produkte, te se stanica nekontrolirano dijeli što može rezultirati nastankom stanica raka. ©

Oštećenja kromosoma ili kromosomske aberacije nastaju brisanjem nekoliko susjednih gena, inverzijom gena na kromosomu ili izmjenom većih dijelova između različitih kromosoma. Oštećenja kromosoma somatskih stanica obično dovode do smrti stanice tijekom diobe, dok oštećenja kromosoma spolnih stanica spriječavaju oplodnju ili uzrokuju ranu smrt ploda. Očito je stoga da i kod somatskih i kod spolnih stanica veća oštećenja kromosoma obično spriječavaju prijenos mutacija. Kromosomske aberacije su također uzrok nasljednih bolesti (Downov sindrom), a mogu dovesti i do raka (npr. aktivacijom onkogeni).

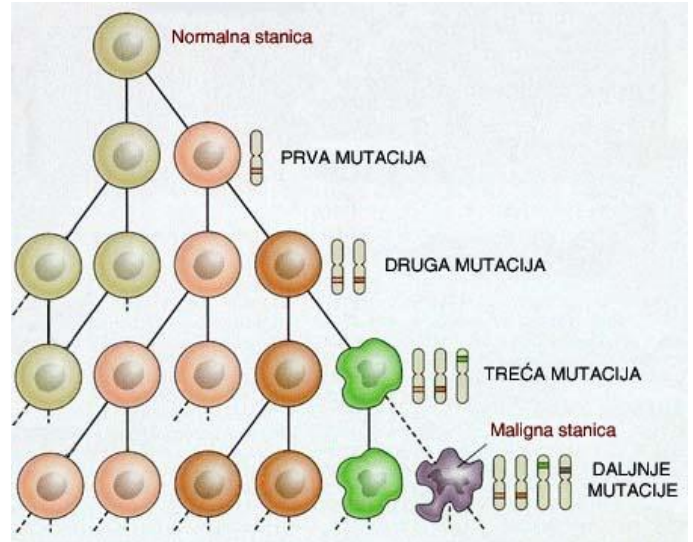
Sustavi popravka DNA imaju važnu ulogu u održanju integriteta nasljednog materijala i podcrtavaju njegov značaj za preživljavanje stanice. Uočeno je, npr., da znatan dio promjena DNA nastaje kao posljedica kemijskih reakcija s endogenim produktima staničnog metabolizma (poput oksidacijskih produkata uz reaktivne vrste kisika nastale tijekom redukcije O₂ kod respiracijskih reakcija ili reakcija citokroma P450). Masivna ili česta izloženost genotoksičnim agensima može nadvladati kapacitete popravka DNA i uzrokovati oštećenja. Također, sami sustavi popravka mogu biti odgovorni za nastanak mutacija. Naime, postoje nepogrešivi i greškama skloni enzimi popravka. Potonji se aktiviraju ako DNA ima više oštećenja nego što nepogrešivi sustavi popravka mogu popraviti. [Npr., u slučaju ionizirajućeg zračenja je utvrđeno da znatan udio mutacija nastaje popravkom DNA, a ne samim zračenjem. Kod loma dvostruke zavojnice ponekad nema preklapanja kao kod loma jedne zavojnice gdje preostala zavojnica diktira slijed baza druge zavojnice, te kod dvostrukog loma može doći do spajanja dijelova različitih kromosoma. *Deionococcus radiodurans* je bakterija izuzetno otporna na dvostruki lom DNA lanca induciran radioaktivnošću, upravo zbog povećane učinkovitosti sustava popravka.](#)

Važnost sustava za popravak DNA u mutagenizi (i karcinogenizi) je očita kod nasljednog genetskog nedostatka tih enzima, poremećaja koji se naziva xeroderma pigmentosum, kod kojeg pacijenti obolijevaju od raka kože nakon izlaganja suncu ([UV zračenje izaziva stvaranje pirimidinskih dimera međusobnim povezivanjem dvije susjedne baze](#)) i hipersenzitivni su na određene ksenobiotike uslijed nemogućnosti popravka oštećenja uzrokovanih UV zračenjem ili uklanjanja kemijskih supstituenata na bazama. Također, BRCA1 i BRCA2 geni kodiraju proteine uključene u sustave popravka DNA. Mutacije ovih gena uzrok su povećanog rizika obolijevanja od raka dojke.

Karcinogenost

Karcinogenost neke tvari je sposobnost toksikanta da izazove nastanak raka odnosno transformira normalnu u tzv. neoplastičnu stanicu (vidi dolje). *Nota bene*, postoje i nekemijski karcinogeni poput UV ili ionizirajućeg zračenja. Kemijski karcinogeni, naročito oni iz hrane, ipak nisu među najvažnijim procijenjenim uzročnicima raka. **Duhan uzrokuje 30% smrti od raka, 30% prehrana (debljina), 5% nasljedni faktori, 5% fizička neaktivnost, 5% virusi, 3% alkohol, 2% zagađenje okoliša, 2% ionizirajuće i UV zračenje, <1% aditivi i kontaminanti, itd.**

Koraci u nastanku raka su inicijacija, promocija i progresija. Inicijacija podrazumijeva ireverzibilnu promjenu DNA. Neće svaka modifikacija DNA (npr. adukt koji uzrokuje mutaciju) dovesti do inicijacije tumora. Inicijacijskim se mogu smatrati mutacije koje aktiviraju protoonkogene ili one koje inaktiviraju tumorsko supresorske gene (vidi **GENOTOKSIČNOST**). **Već ovdje može doći do abnormalne stanične proliferacije, pri čemu se takva stanica naziva neoplastičnom, a tkivo neoplazmom.** Promocija je selektivna stimulacija rasta tj. diobe iniciranih stanica pri čemu se povećava broj stanica koje mogu biti izložene daljnjim genetskim promjenama. Neke tvari, tzv. kompletni karcinogeni, su istovremeni inicijatori i promotori (benzo[a]piren). Progresija podrazumijeva daljnja genetska oštećenja i proliferaciju stanica uz ekspresiju svojstava koja potiču nastanak daljnjih mutacija sve do konačne preobrazbe benigne neoplastične u malignu stanicu.

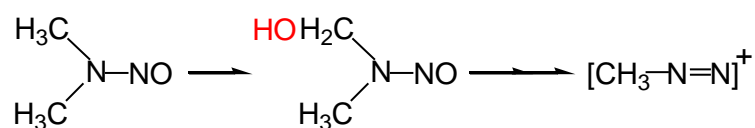


Prema mehanizmu djelovanja, kemijske karcinogene se može podijeliti na genotoksične i epigenetske ili negenotoksične.

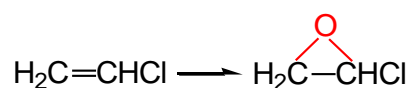
Genotoksični kemijski karcinogeni

Promjena DNA je osnovni događaj u karcinogenezi, pri čemu genotoksični karcinogeni izravno napadaju dvostruku uzvojniju. Genotoksični karcinogeni mogu biti ovisni o aktivaciji ili neovisni o aktivaciji. Potonji su u stanju izazvati štetu u izvornom obliku, dok karcinogeni ovisni o aktivaciji postaju genotoksični tek nakon metabolizma u organizmu (vidi **BIOAKTIVACIJA**). Karcinogeni neovisni o aktivaciji su reaktivne elektrofilne molekule koje traže i reagiraju s nukleofilnim atomima drugih molekula. **Npr. alkilirajući spojevi poput alkil imina, epoksidi, laktoni, sulfat esteri, aktivni halogeni spojevi poput benzil klorida ili CH₃I, i dr.** Ovisni o aktivaciji su spojevi koji se prvo prevode u elektrofile u procesu biotransformacije. **Primjerice, halogenirani ugljikovodici poput vinil klorida, policiklički aromatski ugljikovodici kao benzo[a]piren, aromatski i heterociklički amini, te nitroaromatski spojevi, azo spojevi, N-nitrozo spojevi poput nitrozamina, karbamati, aflatoksini, sterigmatocistin, biljni toksini poput safrola, itd.**

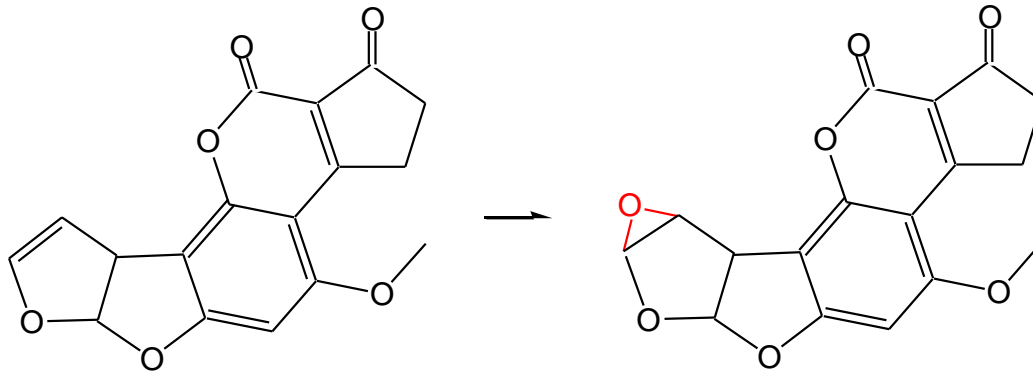
Npr., bioaktivacija nitrozamina (nastaje elektrofilni metil diazonij ion):



vinil klorid (nastaje elektrofilni epoksid):



aflatoksin B1 (nastaje elektrofilni epoksid):



Bioaktivacija ili konverzija početnog spoja u genotoksični oblik ili detoksifikacija i izlučivanje, ovise o nizu faktora (vrsta, spol, organ, vrsta stanica, genetski polimorfizmi, itd.), kako je već objašnjeno u odgovarajućem poglavlju o bioaktivaciji. Npr., utvrđen je dvostruko veći rizik obolijevanja od raka mokraćnog mjehura kod pušača koji nemaju funkcionalnu glutation S-transferazu M1 (GSTM1 0/0 genotip), za razliku od pušača s GSTM1 +/- (homozigoti za funkcionalni enzim) ili +/-0 genotipom (heterozigoti).

Epigenetski (negenotoksični) karcinogeni

Pojedine tvari su u stanju dovesti do razvoja raka bez promjene genetskog koda, stimuliranjem mehanizama uključenih u rast stanice. Ubrzana proliferacija stanica djeluje promotorski povećavajući vjerojatnost spontanih i induciranih mutacija iniciranih stanica (skraćivanjem vremena u kojem može doći do popravka DNA) te, konačno, maligne transformacije.

Najvažniji mehanizmi negenotoksične karcinogeneze su citotoksičnost, imunosupresija, endokrina disrupcija, indukcija enzima i produkcija ROS/RNS-ova.

Citotoksini izazivaju kronično oštećenje i smrt stanica što dovodi do kompenzacijske proliferacije tj. ubrzane diobe okolnih stanica (vidi odlomak o obnovi oštećenih tkiva u poglavlju **NEODGOVARAJUĆI POPRAVAK I ADAPTACIJA**). © Sličan učinak ima kronična iritacija ili prisustvo stranih tijela u tkivu. Npr., natrij saharin izaziva rak mokraćnog mjehura štakora u dozama preko 3000 mg/kg zbog mikrokristaličnog taloga u mjehuru, reakcije na strano tijelo i trajne citotoksičnosti. Potkožni plastični implantati izazivaju rak kod pokusnih životinja.

Remećenje endokrine ravnoteže može imati tumorigeni učinak poticanjem stanične diobe. Moguća je pojačana (visoke doze, dugo vrijeme) stimulacija tvarima sličnim hormonima u odrasloj dobi. Također, uočene su i trajne promjene genske ekspresije modifikacijama epigenetskog koda uslijed izloženosti endokrinim disruptorima u ranim fazama razvoja organizma (više **OVDJE**). Na primjer, sintetski estrogene pojačavaju lučenje prolaktina iz hipofize koji stimulira proliferaciju stanica mliječnih žlijezda što može dovesti do raka dojke. Indukcija enzima fenobarbitalom može ubrzati razgradnju tiroksina i time sniziti cirkulirajuće razine hormona štitnjače. Pad koncentracije tiroksina u krvi potiče lučenje TSH (tireostimilirajući hormon) iz hipofize koji stimulira proliferaciju stanica štitnjače i kronično može izazvati rak kod štakora (ljudi su otporniji zbog nižeg turnovera tiroksina).

Uočeno je karcinogeno djelovanje imunosupresivnih tvari koje se tumači slabljenjem imunog sustava i nadzora nad neoplastičnim stanicama i nekim onkogenim virusima čime se povećava vjerojatnost nastanka i razvoja malignih stanica. Analog purina azatioprin, lijek protiv odbacivanja transplantiranih organa, može izazvati rak kod pacijenata.

Visoke razine ROS/RNS-ova u stanici, potaknute toksikantima, mogu dovesti do stvaranja oksidativnih adukata na DNA (npr. oksidacija deoksigvanozina na C8 dovodi do nastanka čestog mutagenog produkta 8-oxo-dG tj. 8-oksodeoksigvanozina) ili DNA oštećuju produkti lipidne peroksidacije koju izazivaju, poput aldehida, epoksida, itd. Također, povišenje razina ROS/RNS-ova aktivira i više proliferacijskih signalnih puteva u stanici. Prethodno je opisana aktivacija NFκB (vidi **OVDJE**).

Važan negenotoksični mehanizam je i indukcija enzima koji, nadalje, mogu uzrokovati pojačanu pretvorbu stranih tvari u genotoksične produkte. Brojni spojevi aktiviraju transkripcijske faktore kao što su AhR, PXR, CAR, i

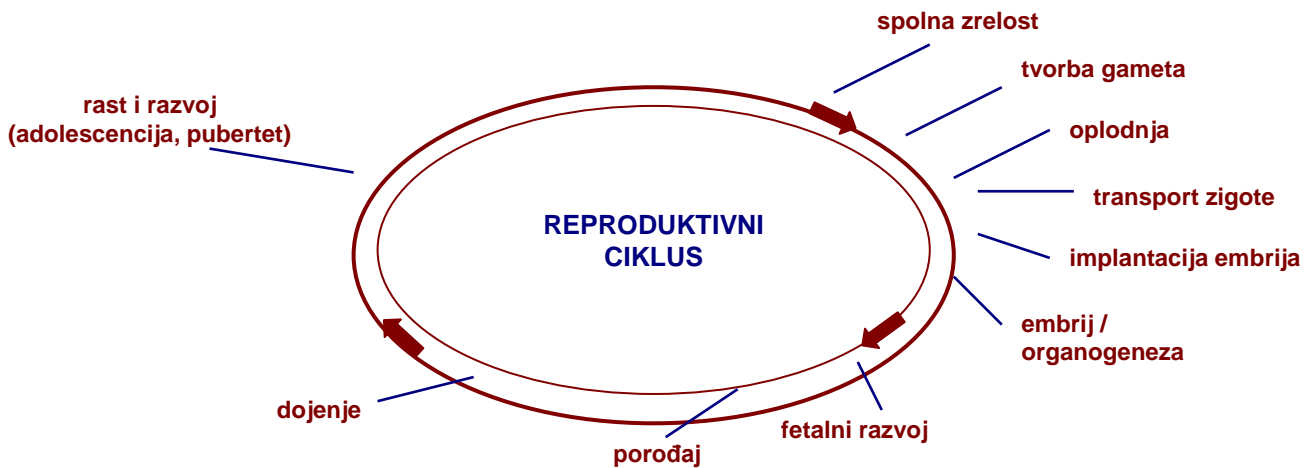
sl., koji potiču transkripciju gena različitih citokroma P450. Ovisno o induciranim enzimima ovisi i da li će se prokarcinogen najvećim dijelom biotransformirati u karcinogen ili detoksificirati (vidi primjere interakcije između kemikalija [OVDJE](#)).

Neki autori karcinogene dodatno dijele na neklasificirane tj. one o kojima se ne zna dovoljno da bi bili svrstani u genotoksične ili epigenetske, i anorganske. Anorganski karcinogeni, za koje su utvrđeni i genotoksični i negenotoksični mehanizmi, uključuju Si, Ni, Cr, Co, Pb, Mn, Be, i neke njihove derivate, te azbest.

Treba spomenuti i mogućnost sinergističkog djelovanja onkogenih virusa i kemijskih karcinogenata u tumorigenom procesu. Određeni virusi se mogu inkorporirati u genom i aktivirati onkogene i/ili inaktivirati gene tumorskih supresora domaćina ili nakon inkorporacije dolazi do ekspresije virusnog onkogenata. Kemijski karcinogeni mogu djelovati promotorski na rak induciran virusom i obratno. Utvrđena je povezanost etiologije određenih vrsta raka jetre s istovremenom izloženosti specifičnim virusima. [Npr. rak jetre: virus hepatitisa B i alkoholna pića ili aflatoksin B1, nazofaringealni rak: Epstein-Barr virus i N-nitrozamini \(iz duhana\), rak grlića maternice, usne šupljine i grla: HPV \(human papilloma virus\) i tvari iz duhana.](#)

Reproduktivna i razvojna toksičnost

Štetni učinci koji nastaju u opsegu ciljeva reproduktivnog ciklusa, od spolnih stanica, zametka, ploda, do postporođajnih jedinki u procesu sazrijevanja, nazivaju se reproduktivnom i razvojnom toksičnošću.



Reproduktivna toksičnost

Reproduktivni toksikanti remete funkciju sustava za razmnožavanje i prema ciljnom mjestu ih se može podijeliti na muške i ženske reproduktivne toksine. Reproductivna toksičnost je nerazdvojiva od razvojne toksičnosti jer se reproduktivni poremećaji roditeljskih jedinki odražavaju na potomstvo. Mnogi od ovih učinaka su posredovani endokrinim disruptorima.

Među najvažnije štetne učinke za muški reproduktivni sustav ulaze smanjenje plodnosti (npr. Pb), te spermom prenosive promjene (npr. oštećenje DNA) koje mogu imati toksični učinak na potomstvo (dietilstilbestrol).

Toksičnost za ženski reproduktivni sustav uključuje oštećenja jajne stanice, poremećaje menstrualnog ciklusa i ovulacije (alkohol), parturicije, laktacije (nikotin, sredstva za smirenje), toksičnost za jajnike, promjene spolnog ponašanja, i dr.

Razvojna toksičnost

Razvojni toksikanti štetno djeluju na oplođenim jajnim stanicama (zigotama), embrijima, fetusima i postporođajnim jedinkama sve do spolnog sazrijevanja. Ponekad se kao sinonim razvojne toksičnosti koristi i pojam teratogenost, iako on zapravo označava samo sposobnost izazivanja kongenitalnih malformacija ploda. Posljedice razvojnih toksikanata, pak, mogu biti smrt ploda, usporavanje rasta, promjene morfoloških značajki (malformacije) i promjene u funkcionalnom razvoju (npr. deficiti imunog sustava ili promjene ponašanja). Karakteristika znatnog broja razvojnih toksikanata je očitovanje toksičnog učinka i kod relativno niskih

koncentracija, te vrijeme do uočavanja prvih simptoma (promjene reproduktivnog sustava često postaju očite tek kod spolnog sazrijevanja). Također je prilično važno vrijeme izloženosti. Primjerice, toksični učinak prije implantacije će najčešće rezultirati smrću embrija ili učinka uopće neće biti. Izloženost toksikantima tijekom prvog trimestra (embriogeneza) vrlo često rezultira velikim morfološkim promjenama, dok će izloženost tijekom kasnijih faza trudnoće (fetogeneza) ili postpartum uglavnom izazivati usporeni rast i funkcionalne nedostatke. Osim stvari koje djeluju isključivo na plod, štetno djelovanje toksikanta (nereproduktivna toksičnost!) na majku često ima i posredni razvojno toksični učinak na plod.

Smatra se da dokumentirano povećanje učestalosti poremećaja i bolesti reproduktivnog sustava u novije vrijeme (rak testisa, strukturni defekti, neplodnost (broj spermija po jedinici volumena sperme), i dr.) može biti posljedica izloženosti endokrinim disruptorima za vrijeme razvoja reproduktivnog sustava *in utero*.

Neki od načina djelovanja kojima razvojni toksikanti mogu izazivati štetne učinke uključuju:

Citotoksičnost podrazumijeva remećenje replikacije, transkripcije, translacije ili diobe stanica. Tako djeluju karcinogene i mutagene stvari, radioaktivni elementi tj. ionizirajuće zračenje, inhibitori enzima ključnih za rast (npr. 5-fluorouracil), i sl. Embrij/fetus je osjetljiv na njihovo djelovanje zbog velike brzine diobe stanica. Niske doze citotoksičnog agensa uzrokuju pojačanu nekrozu tj. smrt stanica u ciljnim organima, što rezultira njihovom malformacijom dok visoke doze mogu imati za posljedicu smrt embrija/fetusa.

Pojedini razvojni toksikanti remete specifične događaje u diferencijaciji tkiva (embriogeneza ili organogeneza i fetogeneza) te najčešće ne uključuju nekrozu ili smrt embrija/fetusa. Svaka formirajuća struktura ili organ ima period maksimalne osjetljivosti na oštećenja koji koincidira s ključnim razvojnim događajima u tim strukturama. Npr. mozak je najosjetljiviji oko 10. dana, dok je urogenitalni sustav najosjetljiviji oko 16. dana embrionalnog razvitka štakora. Toksikanti ove skupine su mahom teratogeni. Predloženi mehanizam djelovanja jednog od najpoznatijih teratogena, talidomida (koristio se kao lijek protiv mučnine za vrijeme trudnoće, te je oko 8000 djece rođeno s teškim malformacijama, uglavnom udova), blokiranje je stvaranja krvnih žila. Kronični viši unos alkohola za vrijeme trudnoće može dovesti do tzv. fetalnog alkoholnog sindroma koji se očituje intrauterinim zaostajanjem u rastu, mentalnim poremećajima i malformacijama lubanje.

Nespecifična razvojna toksičnost uključuje blokiranje mehanizama uslijed kojih su svi organi i tkiva jednako pogođeni. Izazivaju zaostajanje u rastu i/ili smrt embrija/fetusa, ali bez teratogenog učinka tj. malformacija. Ovako djeluje kloramfenikol (antibiotik), koji inhibira sintezu proteina u mitohondrijima posljedica čega je zaostajanje u rastu, a preko kritične razine i smrt.

Razvojna toksičnost može biti i posljedica remećenja homeostaze majke i zametka/ploda. Toksičnost je posljedica neizravnog učinka na zametak/plod uslijed promjena u sustavu majke poput nedostatka određene stvari u majčinoj prehrani (retinol, riboflavin, folna kiselina, Fe) koji može dovesti do malformacija, zaostajanja u rastu i smrti embrija/fetusa. Ovako djeluju agensi koji smanjuju transport hranjivih stvari od majke plodu. Hipertenzivne stvari poput serotonin, adrenalina ili ergotamina smanjuju dotok krvi zametku/plodu.

Neurotoksičnost

Neurotoksičnost podrazumijeva remećenje normalne funkcije živčanog sustava. Živčani sustav čovjeka se po anatomskoj građi može podijeliti na periferni živčani sustav (PNS) koji uključuje neurone koji prenose informaciju od mišića, žlijezda i senzorskih organa do leđne moždine i mozga, te središnji živčani sustav (CNS) koji se sastoji od leđne moždine i mozga koji upravlja svim tjelesnim funkcijama. Funkcionalna podjela: autonomni živčani sustav, neovisan o volji, upravlja unutarnjim organima, žlijezdama, glatkim mišićima, i sl., te somatski živčani sustav koji upravlja skeletnim mišićima koji se mogu voljno pokretati. Autonomni sustav se još može podijeliti na simpatički (priprema tijelo na bijeg ili borbu; primjeri neurotransmitera: adrenalin, noradrenalin; signal i receptori: adrenergički) i parasimpatički živčani sustav (dovodi do opuštanja; neurotransmiter: acetilkolin; signal i receptori: kolinergički). Uz ovakav, krajnje simplificiran opis, moglo bi se reći da ova dva sustava djeluju antagonistički na istom organu. Složenost i važnost živčanog sustava pojašnjavaju brojnost potencijalnih ciljnih mjesta toksičnog djelovanja. Ipak, može se izdvojiti nekoliko najčešćih načina neurotoksikogenosti:

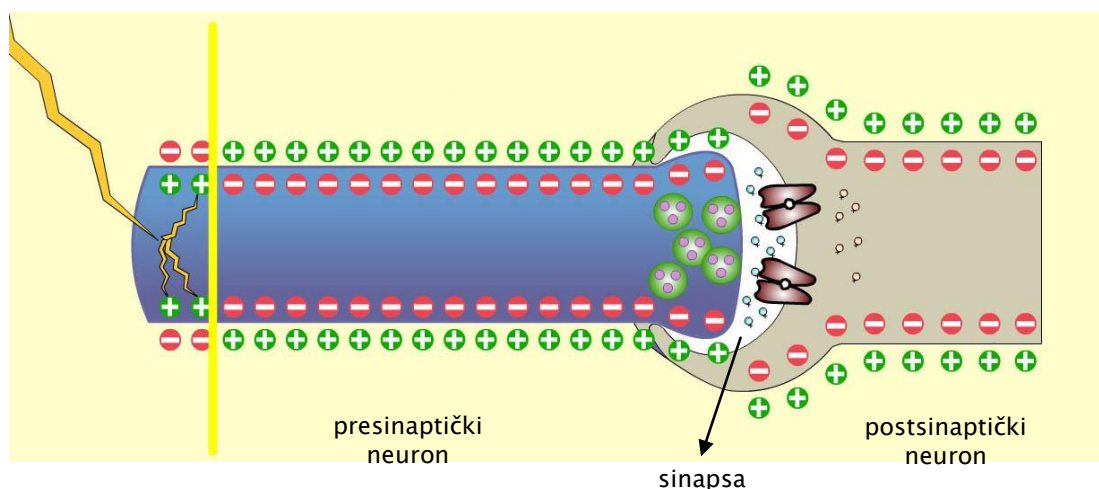
Remećenje sinteze i oštećenje važnih makromolekula

Oštećenje ili nedostatak ključnih makromolekula poput DNA, RNA, proteina, lipida, glikolipida, glikoproteina, i sl., može uzrokovati odumiranje neurona. Primjerice, olovo oštećuje mijelinsku ovojnicu (izolatorski sloj koji omogućuje prijenos električnog signala) neurona toksičnim djelovanjem na oligodendrocite (potpuno tkivo oko neurona u CNS) koji proizvode mijelin. ©

Utjecaj na prijenos živčanih impulsa

Živčani impuls podrazumijeva električni signal tj. membranski potencijal (koncentracija iona s jedne i druge strane membrane) koji se širi uzduž membrane neurona, te kemijski signal u komunikaciji između neurona. © U stanju mirovanja je membrana polarizirana tj. viši je pozitivni naboj s vanjske strane membrane. Ovakav potencijal održava se djelovanjem ionskih crpki i kanala (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) u membrani neurona. Npr., Na-K crpka izbacuje tri iona Na, a ubacuje dva iona K u jednom ciklusu. © Tijekom prijenosa živčanog impulsa otvaraju se ionski kanali u membrani uslijed čega se mijenja potencijal membrane tj. pozitivni ioni ulaze u stanicu i dolazi do *depolarizacije*. Depolarizacija započinje vezanjem neurotransmitera za receptore koji su povezani s ionskim kanalima i otvaranjem ovih kanala ulaze pozitivno nabijeni ioni. Ova inicijalna promjena naboja unutar stanice nadalje dovodi do kaskadnog otvaranja susjednih ionskih kanala i širenja depolarizacijskog električnog signala uzduž membrane neurona. Točnije, ionski kanali uz receptore su tzv. kanali otvarani ligandom (ligand-gated ion channels) tj. neurotransmitterom, dok su ostali ionski kanali u membrani tzv. ionski kanali otvarani naponom (voltage-gated ion channels). Osim depolarizacije, neki neurotransmiteri dovode do inhibicije prijenosa živčanih signala procesom *hiperpolarizacije*. Vezanjem za ove receptore otvaraju se ionski kanali koji dovode do ulaska negativno nabijenih iona (Cl^-) ili izlaska pozitivno nabijenih iona (K^+) ©, čime povećavaju pozitivan naboj s vanjske strane membrane. Prijenos živčanog signala jednim neuronom je, dakle, električni impuls.

Prijenos između neurona se, najčešće, odvija kemijskim signalima tj. neurotransmiterima. Naime, između neurona postoji pukotina koja omogućuje prijenos signala s jednog neurona na veći broj susjednih neurona i drugih stanica. Neuron koji 'donosi' signal u sinapsu se naziva presinaptičkim, a neuron koji prima signal neurotransmiterima je postsinaptički. Neurotransmiteri su pohranjeni u specijalnim tvorbama, tzv. vezikulama, koje se nalaze na kraju presinaptičke živčane stanice. Električni impuls u presinaptičkom neuronu dovodi do oslobađanja neurotransmitera iz vezikula u sinapsu. Postsinaptički neuron na svom sinaptičkom kraju ima receptore za neurotransmitere koji su povezani s ionskim kanalima. Vezanje neurotransmitera izaziva promjenu konformacije receptora i ionskog kanala, čime dolazi do otvaranja ionskog kanala tj. promjene potencijala membrane postsinaptičkog neurona. Time je ponovno pokrenut električni signal tj. prijenos živčanog signala.

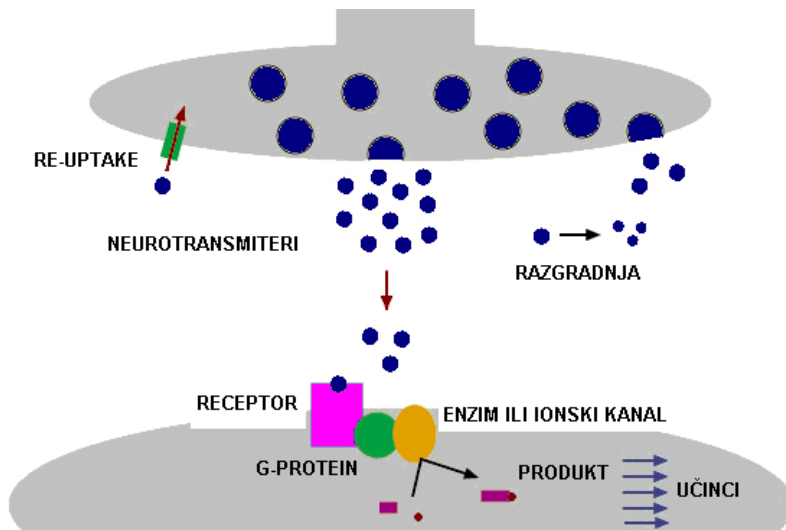


Neki ksenobiotici (olovo, metilživa, tetrodotoksin) vezanjem za ionske kanale (blokiraju protok kroz njih ili ih drže stalno otvorenim) prekidaju prijenos živčanih impulsa.

Mnogi neurotoksikanti remete prijenos živčanih impulsa u sinapsi, gdje se signal prenosi neurotransmiterima. Toksikanti mogu inhibirati sintezu neurotransmitera, spriječiti ili uzrokovati oslobađanje

neurotransmitera, zaposjesti postsinaptičke receptore neurotransmitera uz agonistički ili antagonistički učinak. Npr., organoživini spojevi inhibiraju kolin acetiltransferazu koja sintetizira acetilkolin. Mehanizam sprječavanja oslobađanja acetilkolina botulinum toksinom je spomenut prije, vidi OVDJE. Tiramin je biogeni amin (nastaje u fermentiranim namirnicama) koji može dovesti do oslobađanja adrenalina i noradrenalina iz vezikula adrenergičkih neurona i time pojačavati signalizaciju simpatičkog živčanog sustava, uključujući učinak poput kontrakcije glatkih mišića krvnih žila što dovodi do povišenja krvnog tlaka. Tiramin je istovremeno i agonist adrenergičkih receptora, dok je nikotin snažan agonist acetilkolinskih receptora (opisan OVDJE).

U sinapsi se nalaze i enzimi koji razgrađuju neurotransmitere nakon vezanja za receptor i disocijacije s receptora (sprječavajući produženu stimulaciju postsinaptičkog neurona nakon prijenosa signala; vidi sliku).



Pojedini toksikanti mogu inhibirati enzime koji vrše razgradnju neurotransmitera. Acetilkinesteraza (razgrađuje acetilkolin) je, tako, meta organofosfatnih spojeva čime se pojačava prijenos signala acetilkolinom. Inhibitori monoaminoksidaze (npr. antidepresivi poput Deprenyla) sprječavaju razgradnju dopamina i noradrenalina.

Na membrani presinaptičkog neurona također postoje i transportni proteini koji oslobodene neurotransmitere vraćaju iz sinapse u neuron (tzv. reuptake). Neki toksikanti mogu blokirati ove transportne proteine (kokain, ecstasy, Prozac). **Blokom transportnih proteina serotonina u CNS-u, Prozac povećava koncentraciju serotonina u sinapsi i njegovo vezanje za receptore neurona, a time i serotonergičku transmisiju (= poboljšanje raspoloženja).** ©

Općenito, posljedice poremećaja u prijenosu živčanih impulsa mogu biti jačanje ili slabljenje djelovanja simpatičkog (ubrzava rad srca, ritam disanja, peristaltiku, širi zjenice, i dr.) ili parasimpatičkog (usporava rad srca, pluća, peristaltiku, sužuje zjenice, i dr.) živčanog sustava.

Remećenje energijskog metabolizma neurona

Živčani sustav troši puno energije za prijenos živčanih signala (ionske pumpe (Na-K crpka, Ca²⁺ pumpa) koriste energiju za održavanje membranskog potencijala) te je osjetljiv na toksikante koji inhibiraju stvaranje energije. Ovdje, primjerice, ulaze toksikanti koji umanju opskrbu neurona kisikom poput CO (jer se trajno veže za hemoglobin), cijanida (blokira citokrom oksidaze respiracijskog ciklusa), i dr.

Toksičnost za ostale organe i tkiva

Ovisno o načinu ulaska u organizam i afinitetu za mjesta vezanja, toksični učinak se može očitovati i na drugim organima i sustavima organizma, npr.:

Dermatotoksičnost

Toksični učinci na kožu se javljaju uslijed kontakta kože s toksikantom koji: nagrizava ili iritira (kislina), uzrokuje alergijske reakcije (tip I: žitarice, tip IV: Ni), rak (UV zračenje), neimunološku urtikariju (benzojeva kiselina), i dr.

Toksičnost za dišni sustav

Respiratorna toksikologija je povezana s inhalacijskom toksikologijom koja se bavi svim toksikantima koji u organizam ulaze dišnim putem (plinovi, pare, aerosoli), a koji, ovisno o kemijskoj reaktivnosti (reakcije s tkivnim molekulama), topljivosti, i sl., mogu izazvati lokalne (zadržavanje u respiratornom traktu) ili sistemske učinke.

Među najtoksičnijim tvarima za dišni sustav su aerosoli krutih čestica (npr. azbest) koji se zadržavaju u plućima izazivajući kroničnu upalu koja može uzrokovati plućnu fibrozu ili rak.

Hepatotoksičnost

Jetra je izloženija toksičnom djelovanju kemikalija iz hrane zbog toga što krv nakon probavnog trakta odmah ide u jetru, zbog velike prokrvljenosti i aktivnog izvlačenja toksikanata iz krvi, kao i zbog svoje biotransformacijske uloge i lučenja toksikanata i metabolita u žuč. Među češćim mehanizmima toksičnog djelovanja su: inhibicija enzima, stvaranje reaktivnih elektrofilnih metabolita biotransformacijom toksikanata koji se vežu za važne stanične makromolekule uz učinke poput oksidativnog stresa, lipidne peroksidacije ili stvaranje adukata na DNA, iscrpljivanje važnih molekula, akumulacija kolagena u izvanstaničnom prostoru tj. hepatska fibroza, i dr.

Na primjer, valproična kiselina (antiepileptični lijek) se oksidira citokromom P450 u toksični elektrofilni produkt koji inhibira mitohondrijske enzime na putu beta oksidacije masnih kiselina, što može uzrokovati masnu infiltraciju jetre uslijed nakupljanja velikih količina masti u hepatocitima.

Alkoholizam također može rezultirati masnom infiltracijom jetre zbog proizvodnje velikih količina NADH oksidacijom etanola koji služi kao signal pozitivne energetske bilance koji dovodi do inhibicije razgradnje masnih kiselina uz istovremeno poticanje njihove sinteze.

Oksidacija etanola i acetaldehida i posljedično povećanje NADH/NAD⁺ omjera smanjuje aktivnost ključnih enzima u proizvodnji ATP-a, uzrokujući time smanjenu sintezu proteina.

Oksidacija etanola katalazom i citokromom P450 također stvara reaktivne vrste kisika, što, između ostalog, iscrpljuje zalihe GSH. Ovaj učinak ima i niz drugih reaktivnih spojeva.

Galaktozamin se povezuje s UDP u pokušaju metabolizma poput galaktoze (pretvorba u glukoza 6-fosfat i daljnji metabolizam glikolizom ili putem pentozna fosfata), ali dolazi do nakupljanja neiskoristivih UDP aminošećera i, izloženošću visokim dozama, do iscrpljivanja staničnog UTP-a koji je supstrat za RNA polimerazu što rezultira inhibicijom sinteze RNA i proteina.

Acetaldehid nastao oksidacijom etanola povećava transkripciju alfa-1 kolagen gena jer vezanjem za genski produkt i modifikacijama istog sprječava regulaciju povratnom spregom.

Nefrotoksičnost

Toksičnost za bubrege uključuje toksičnost za glomerul (SiO₂), glomerulonefritis imunološkog podrijetla (penicilamin), toksičnost za tubul (paracetamol, Hg, Pb, Cd, ohratoksin A), inhibiciju regulacije bubrežne funkcije (kalij dikromat), i dr.

Toksičnost za kardiovaskularni sustav

Podrazumijeva toksičnost za makrocirkulaciju, koja se sastoji od srca (adriamicin) i velikih krvnih žila (vene i arterije) (vinil klorid), mikrocirkulaciju (arteriole i kapilare) (As), i krv (plazma i stanice specijaliziranih funkcija) (CO, Pb).

Gastrointestinalna toksičnost

Riječ je o kontaktu s nagrizajućim tvarima pri prolasku kroz probavni trakt (kisljine, lužine) ili toksikantima koji izazivaju štetu interakcijom sa stanicama GIT-a (npr. Voltaren smanjuje lučenje želučane sluzi; bakterijski enterotoksini uzrokuju lučenje kloridnih iona i vode iz stanica te dovode do proljeva).

ODREĐIVANJE TOKSIKANATA

Poglavlje je usredotočeno na najrelevantnije metode u analizi toksikanata u hrani.

KVALITATIVNA ANALIZA

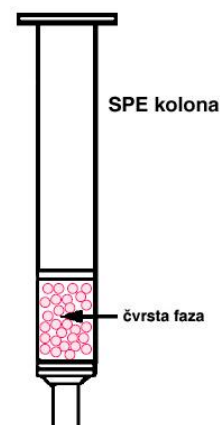
Ukoliko se pretpostavlja postojanje nepoznatog toksikanta u nekoj namirnici, hrana se mora razdvojiti na frakcije i svakoj se testira toksičnost dok se ne odredi aktivna frakcija. Iz aktivne frakcije se izolira čisti toksikant. Zatim se kemijski identificira građa tog spoja modernim analitičkim metodama (UV/Vis spektroskopija, IR (infracrvena) spektroskopija, MS (masena) spektrometrija, NMR (nuklearna magnetska rezonanca) spektroskopija, itd.). Novootkriveni toksikant se potom i kvantitativno određuje u namirnici posebno osmišljenom kemijskom analizom.

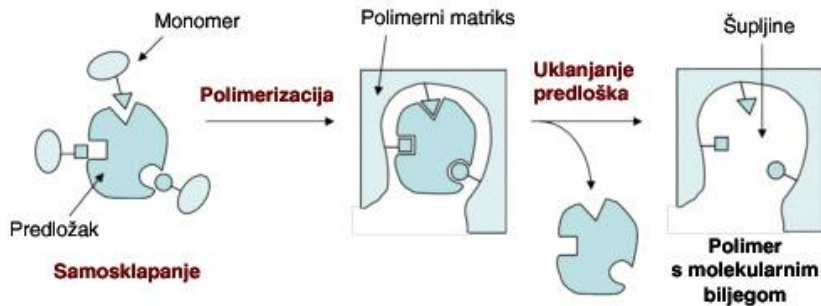
KVANTITATIVNA ANALIZA

Kvantitativno određivanje poznatih toksikanata (npr. ispitivanje kvalitete namirnica (količina aditiva, ostataka pesticida, i sl.) prema važećim pravilnicima) uključuje odvajanje toksikanta od drugih sastojaka hrane i zatim utvrđivanje njegove količine. Analizi toksikanta u hrani prethodi uzorkovanje, ekstrakcija ili razaranje (kod određivanja ukupne količine elemenata) i pročišćavanje.

Uzorkovanje mora biti u skladu s ciljem ispitivanja i mora dati reprezentativan uzorak. [Primjerice, ukoliko se želi odrediti količina ostataka pesticida u polju žita, uzima se određen broj uzoraka s pojedinačnih biljaka s različitih točaka u polju, uz uzorkovanje u obliku slova X ili S.](#) Kod uzorkovanja je, naravno, bitno i agregatno stanje uzorka. [Zbog lakše homogenizacije jednostavnije je uzorkovanje tekućina nego krutina, npr.](#) Obično se koriste različite statističke metode u procjeni potrebnog broja uzoraka. Potrebno je uzeti reprezentativan broj uzoraka kod procjene količine u rasutom proizvodu ili pakiranim proizvodima, što, za potrebe službene analize, propisuju odgovarajući pravilnici i metodologije se prilagođavaju vrsti prehrambene sirovine ili proizvoda. [© Poseban slučaj je uzorkovanje \(krvi, urina, kose, noktiju, i sl.\) za potrebe epidemioloških ispitivanja, pri čemu uzorak mora odgovarati populaciji na koju bi se rezultati trebali odnositi. Količina uzorka također, mora biti dovoljna za provedbu namjeranih analiza te treba uzeti u obzir očekivanu koncentraciju toksikanta da bi ovaj bio mjerljiv analitičkim uređajem ili neinstrumentalnim metodama. Često se uzorci moraju tretirati odmah po prikupljanju \(na terenu\) da se spriječi dezintegracija ispitivane kemikalije \(npr. kiselinom za spriječavanje raspada u lužnatoj sredini\). Alternativno, uzorak se čuva na niskoj temperaturi ili zamrzava do analize.](#)

Ekstrakcija podrazumijeva odvajanje ispitivane tvari iz matriksa uzorka. Kruti uzorak se prethodno može usitniti i homogenizirati, nakon čega se otapa u odgovarajućem otapalu i filtracijom se uklanjaju vlakna i netopljivi dio. Izbor otapala je ključan u ekstrakciji. Važni čimbenici u izboru otapala su: dobra topljivost za ciljne kemikalije, visoka čistoća (da ne unosi nečistoće), niska temperatura vrelišta (lako se uklanja), niska cijena (često ga treba puno), i mala toksičnost. Polarna otapala se koriste za ekstrakciju hidrofilnih, a nepolarna za liposolubilne tvari. Često se koriste i smjese otapala različitih polarnosti (npr. metanol-voda-metilen klorid). Ako ispitivana tvar ima skupinu koja može biti ionizirana pri jednom, a neionizirana na drugom pH, modifikacijama pH se može potaknuti prijelaz iz polarne u nepolaru fazu. Osim klasične tekućinsko-tekućinske ili čvrsto-tekućinske ekstrakcije, koriste se i novije metode. Npr., ekstrakcija tvari iz čvrstog uzorka može se provoditi uz primjenu visokog tlaka, temperature, superkritičnih fluida, mikrovalova, ultrazvuka, itd. Pored dijalize, kod ekstrakcije iz tekućeg uzorka su sve popularnije metode ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE, solid phase extraction) uz C8 ili C18 silikagel, polimerne smole, silikate, Al_2O_3 , antitijela, polimere s molekularnim biljegom (molecularly imprinted polymers, MIP), i sl., kao čvrsta faza. Čvrsta faza razdvaja ispitivanu tvar od nečistoća, vezanjem ispitivane tvari ili nečistoća. [Vidi sliku s ilustracijom pripreme MIP čvrste faze na sljedećoj stranici.](#)



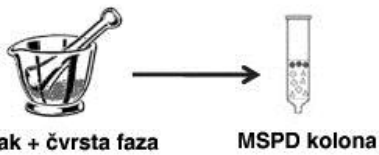
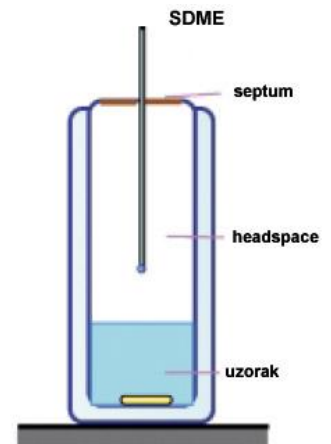


'Predložak' je spoj koji se želi izdvojiti iz tekućeg medija i koji se miješa s monomerom. Nakon polimerizacije i uklanjanja predloška, zaostaje polimer koji ima šupljine s velikim afinitetom za određivani spoj tj. propuštanjem tekućine u kojoj se toksikant nalazi, on će zaostajati na čvrstoj fazi. Također se sve više koriste

mikroekstrakcijske metode poput LPME, SPME ili SDME (liquid phase, solid phase ili single drop microextraction).

Kod prve se na vrhu sonde nalazi sloj otapala koji se uranja u tekućinu uzorka drukčije polarnosti i dolazi do uravnoteženja koncentracija toksikanta između faza.

Sonda se zatim uvodi u injektor analitičkog uređaja gdje termalnom desorpcijom dolazi do oslobađanja ispitivane tvari. Analogan je princip mikroekstrakcijskih sonde sa čvrstom fazom ili jednom kapi. Sve tri inačice se mogu primjenjivati i u tzv. headspace analizi kod koje se sonda uranja u sloj plina iznad hlapljive tekućine (tzv. headspace u bočici; vidi sliku) gdje dolazi do uravnoteženja koncentracije ispitivane tvari između plinske faze i čvrste ili tekuće faze sonde (istovremeno je parcijalni tlak tvari u headspaceu, prema Henryjevom zakonu, u ravnoteži s koncentracijom u tekućini). Hlapljivi sastojci koji se nalaze u vrlo niskim

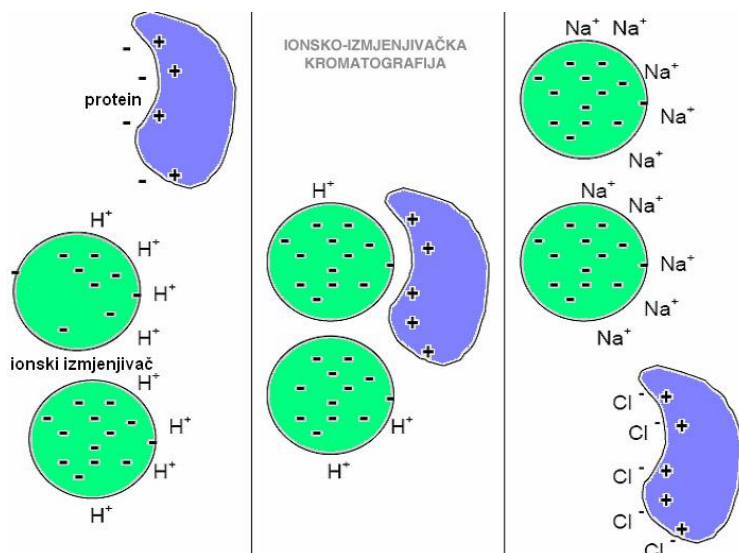
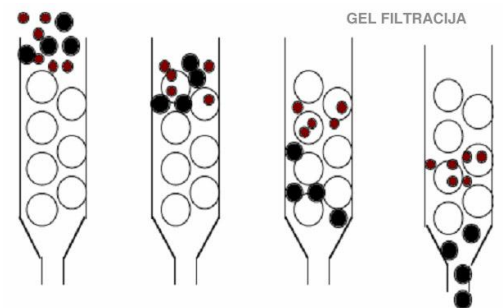


koncentracijama u uzorcima se mogu ekstrahirati i koncentrirati primjenom vodene pare (uz tzv. Lickens-Nickersonov aparat za SDE (simultaneous

distillation and extraction) tj. simultanu destilaciju i ekstrakciju). © MSPD (matrix solid phase dispersion) se temelji na disperziji uzorka i čvrste faze, transferu smjese u kolonu i eluiranju (učinkovito, jeftinije i brzo). Može se primjenjivati za ekstrakciju sa čvrstih, polutekućih i tekućih uzoraka.

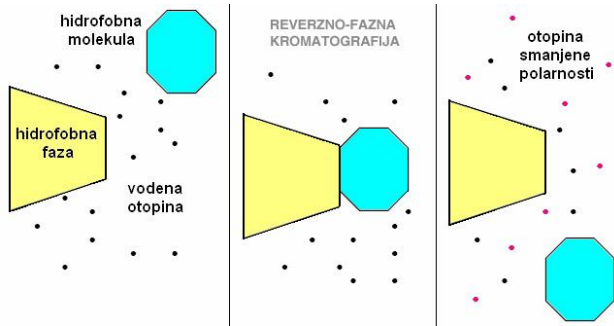
Pročišćavanje (ili cleanup) uključuje svako daljnje izdvajanje ispitivane tvari iz matriksa prije analitičkog uređaja. Potrebno je reducirati količinu suvišnih kemikalija koje se ubrizgavaju u osjetljivi analitički uređaj, a radi očuvanja injektora i kolona što je duže moguće. Nečistoće također mogu smetati u kvalitativnom i kvantitativnom određivanju ispitivane tvari. Najčešće se koriste preparativne kromatografske metode (kolonska kromatografija) za razdvajanje tvari prema naboju, veličini molekula, topljivosti, imunoafinitetu, i dr.

Primjerice, gel filtracija razdvaja molekule po veličini, pri čemu male



molekule ulaze u pore gela od polimera (dekstran, agaroz, akrilamid) i duže se zadržavaju u koloni od većih molekula.

Ionsko-izmjenjivačka kromatografija (na slici lijevo) služi za separaciju prema naboju. Kolona je ispunjena nosačem na koji su pričvršćene skupine koje vrše ionsku izmjenu (npr. karboksimetilceluloza kao kationski izmjenjivač ili dietilaminoetil celuloza kao anionski izmjenjivač). Ionizirana molekula određenog naboja se može vezati za ionski izmjenjivač i zaostaje na koloni te se naknadno eluira s otopinom NaCl.

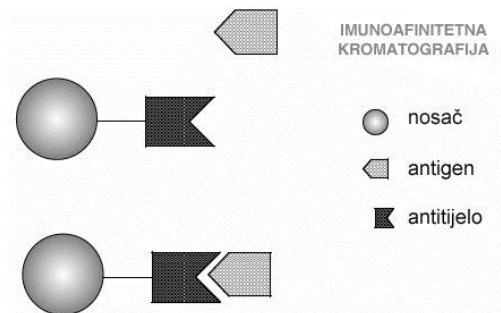


Reverzno fazna kromatografija razdvaja uzorke prema topljivosti u hidrofobnoj stacionarnoj fazi, najčešće silikagelu na koji su vezani dugački ugljikovodični lanci, npr. C18. Hidrofobne molekule zbog afiniteta za stacionarnu fazu sporije prolaze kroz kolonu.

Imunoafinitetna kromatografija uključuje nosač čvrste faze koji na sebi ima pričvršćena antitijela za tvar koja se ekstrahira. Prolaskom otopine, tvar tj. antigen ostaje vezan, dok se ostale nečistoće ispiru s kolone.

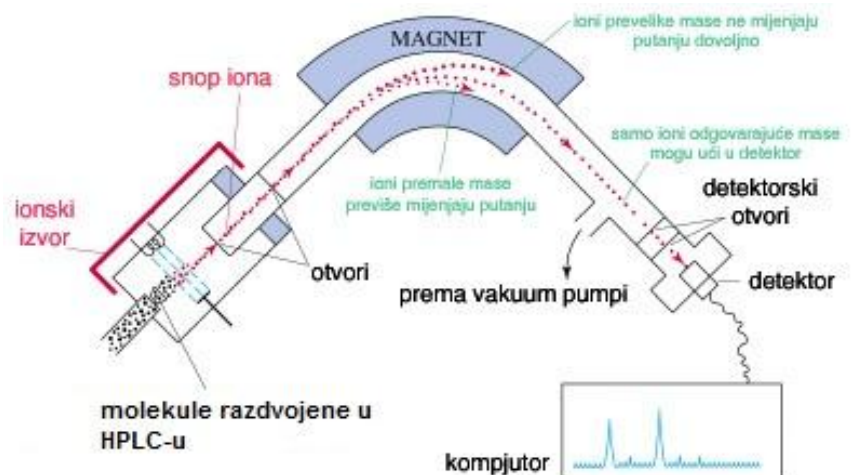
Međutim, mnoge od prethodno opisanih, suvremenih metoda ekstrakcije, daju dovoljno čist uzorak. Metode ekstrakcije i pročišćavanja su dobile i svoje automatizirane verzije ili tzv. on-line uređaje povezane s analitičkim instrumentom i koji mogu serijski pripremati veći broj uzoraka.

Razaranje uzorka se primjenjuje u pripremi za analizu elemenata, pri čemu se uzorak 'spaljuje' ili razara s ciljem razgradnje organske tvari. Ovo se može postići suhim spaljivanjem na visokoj temperaturi ili vlažnim spaljivanjem, u smjesi kiselina i vodikovog peroksida koji dovode do potpune oksidacije organske tvari. Ovako pripremljen uzorak omogućava atomizaciju elementa i analizu optičko (apsorpcijske, emisijske i fluorescentne) spektroskopskim ili maseno spektroskopskim metodama.



Instrumentalna analiza osjetljivim analitičkim metodama omogućuje identifikaciju i količinsko mjerenje najrazličitijih tvari. Važne za analizu toksikanata su kromatografske metode poput plinske (GC) i tekućinske (LC & HPLC) kromatografije, spektrometrijske metode poput UV/Vis, IR spektrometrije, atomske apsorpcijske spektrometrije (AAS), atomske emisijske spektrometrije uz induktivno povezanu plazmu (ICP-AES), nuklearne magnetske rezonancije (NMR), elektronske paramagnetske rezonancije (EPR, za analizu slobodnih radikala), masene spektroskopije (MS, ICP-MS), te kombinacije poput LC-MS/MS (na slici), GC-MS, itd. Koristi se i kapilarna elektroforeza za razdvajanje iona u električnom polju, imunokemijske, enzimne metode, radiometrijske metode (određuje se ili sam radioaktivni izotop ili se neka molekula njime označi i mjeri spektrometrom γ -zraka, scintilacijskim tehnikama, i sl.), i dr.

LC-MS i LC-MS/MS su tehnike koje imaju jako široku primjenu u svim vidovima toksikoloških istraživanja zbog iznimne osjetljivosti i specifičnosti. Nakon razdvajanja komponenti u tekućinskom kromatografu, molekule se različitim tehnikama ioniziraju te se snop iona razdvaja u magnetnom polju (tzv. kvadrupolu koji se sastoji od četiri šipke pod naponom). Magnetno polje se može podešavati i prilagođavati karakterističnom ionu molekule koja se određuje te samo taj ion prolazi prema detektoru koji mu bilježi odziv tj. količinu. Izvedbe s trostrukim kvadrupolom (MS/MS) dodatno unaprijeđuju specifičnost i osjetljivost uređaja jer se nakon izdvajanja iona od interesa u prvom kvadrupolu, on ponovno fragmentira u drugom, da bi se 'filtrirao' specifični ion u trećem kvadrupolu.



Kvalitetna i pouzdana provedba analize i provjera metodologije se može osigurati mjerama poput određivanja recoveryja (iskorištenja), ponovljivosti, reproducibilnosti i analize

referentnog materijala. Pravilnici propisuju izvedbene kriterije za metode koji se moraju zadovoljiti u službenoj analizi količine pojedinih toksikanata.

ZAKONSKA REGULATIVA

Posljednjih desetljeća je značajno povećan broj propisa kojima se reguliraju toksične kemikalije. Među najvažnijim razlozima za ovo su: veća svjesnost o ogromnom broju toksikanata koje su ljudi raspršili u okolišu, napredak analitičkih metoda koje su omogućile detekciju vrlo niskih koncentracija toksikanata u okolišu, hrani, itd., te utvrđivanje veze između nekih bolesti i kronične izloženosti određenim tvarima, često kod niskih koncentracija.

Donošenju propisa prethodi *procjena rizika* (sigurnosti) toksikanta koja se temelji na znanstvenoj procjeni potencijalnih štetnih učinaka toksikanta. Integralni dijelovi procjene rizika su:

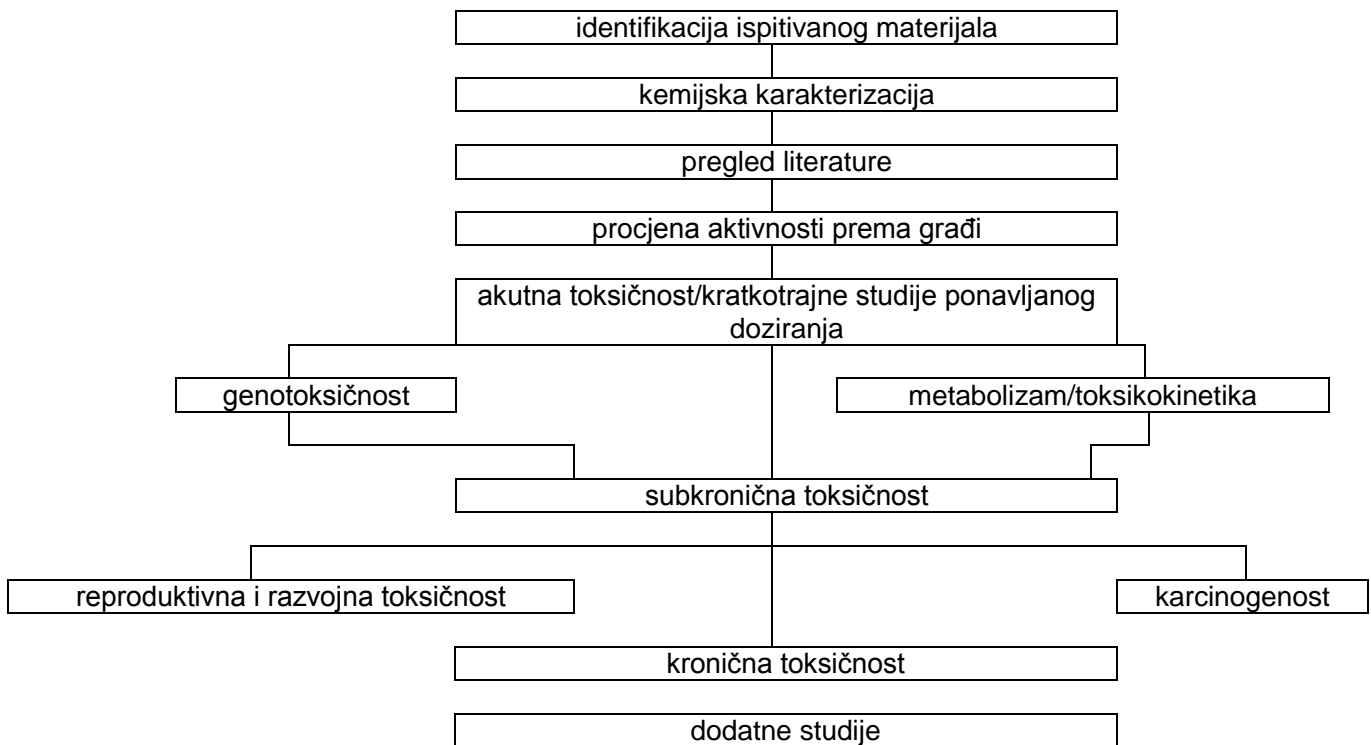
- identifikacija opasnosti (na temelju dokaza da toksikant može djelovati štetno za ljude),
- određivanje veze doze i odgovora (kao kvantifikacija toksičnog učinka), te
- procjena izloženosti (koje vrste, razine i trajanja izloženosti se mogu očekivati).

Time se omogućuje kvalitetna *karakterizacija rizika* na temelju koje se zakonski regulira izloženost toksikantu u procesu poznatijem kao *upravljanje rizikom*.

IDENTIFIKACIJA OPASNOSTI I ODREĐIVANJE VEZE DOZE I ODGOVORA

Uvođenje novih kemikalija (pesticidi, lijekovi, aditivi, itd.) na tržište je zakonski regulirano u svim industrijaliziranim zemljama uz upute i/ili zahtjeve za procjenu njihove sigurnosti. Također, može se testirati toksičnost različitih drugih kemikalija (npr. postojećih ali netestiranih), kontaminanata, i sl.

U posljednje vrijeme jačaju napori međunarodnih organizacija (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD, International Conference on Harmonisation, ICH) prema definiranju uputa za testiranje toksičnosti koje bi bile prihvatljive za sve zemlje. Tipični program procjene sigurnosti je prikazan na slici:



Pripremni koraci

Najprije se provodi identifikacija ispitivane tvari, što utječe na sam program procjene sigurnosti (npr. prema namijenjenoj primjeni se biraju studije koje će se provesti, putevi izlaganja, i sl.). Sljedeći korak je kemijska karakterizacija tvari ili smjese koja se ispituje. Na temelju toga se pretražuje literatura da bi se utvrdilo koliko se zna, ako uopće, o biološkoj aktivnosti ispitivane tvari. Kod nedostatka informacija se koriste podaci o spojevima slične kemijske građe. Uz podatke o građi i raspoloživim toksikološkim podacima može se napraviti statistička procjena toksičnosti prema strukturi. Postoje i kompjutorske, tzv. QSAR (quantitative structure-activity relationship) baze, koje su specijalizirane za ovakvu vrstu procjenu toksičnog ili inog učinka.

Akutna toksičnost

Prema definiciji OECD-a, akutna toksičnost (AT) se definira kao 'štetni učinci koji se javljaju ubrzo nakon jedne ili višestrukih (oralnih) doza neke tvari primijenjenih tijekom 24 h'. Informacije dobivene testom AT na pokusnim životinjama (opservacijskim pregledom, autopsijom) se obično koriste kao osnova za utvrđivanje postavki za daljnje testove toksičnosti (za određivanje ciljnih mjesta, doze, mehanizama). Utvrđuje se veza doze i odgovora na toksikant i određuju NOAEL, LOAEL i LD₅₀ (vidi [VEZA DOZE I ODGOVORA](#)). LD₅₀ je najvažniji rezultat ovih testova i mjera AT tvari. Usporedbom s istim parametrom za druge tvari, može se preliminarno ocijeniti prikladnost korištenja pojedine tvari u hrani. [Zbog korištenja životinja u ovim i drugim testovima, OECD, EU, EPA, i druga tijela preporučuju modificirane testove AT koji daju odgovarajuće informacije uz smanjenje broja i patnje korištenih životinja.](#)

Kratkotrajna, subkronična i kronična toksičnost

Riječ je o studijama ponavljano doziranja koje se prema vremenu trajanja dijele na kratkotrajne (1-4 tjedna), subkronične (tri mjeseca), te kronične (6-12 mjeseci i duže). Podaci dobiveni studijama kratkotrajnog ponavljano doziranja su potrebni za uspješni dizajn testova subkronične toksičnosti. Također, podaci iz subkroničnih studija su neophodni za dizajn kroničnih studija, a koriste se i u dizajnu testova reproduktivne toksičnosti i karcinogenosti. Općenito, testovi uključuju procjene stanja životinja tijekom tretiranja ([fizički izgled i ponašanje, tjelesna težina, potrošnja hrane, pregledi očiju, biokemijski testovi krvi i urina, itd.](#)), te post-mortem ispitivanja ([pregled tkiva i organa, težina organa i žlijezda, histopatološka ispitivanja tkiva](#)). Ponekad se u subkronične i kronične studije mogu uklopiti ispitivanja genotoksičnosti, neurotoksičnosti, imunotoksičnosti, i sl.

Među najvažnijim rezultatima kratkotrajnih studija su identifikacija karakterističnih štetnih učinaka i ciljnih organa, te određivanje odnosa doze i odgovora i NOAEL-a na osnovi kojih se odabire opseg doza u kasnijim testovima.

Testovima subkronične i kronične toksičnosti se mogu otkriti štetni učinci koji nisu uočeni testovima kraćeg trajanja, potvrditi već utvrđene i/ili identificirati nove ciljne organe i mjesta djelovanja, potvrditi NOAEL ([općenito je pouzdaniji NOAEL dobiven ovim, u odnosu na kratkotrajnije testove](#)), ustanoviti potreba za specijaliziranim testovima (npr. ispitivanje neurotoksičnosti), i dr. Duži testovi uglavnom podrazumijevaju primjenu nižih doza, što je realističnije za procjenu toksičnosti obzirom na očekivanu izloženost ljudi, ali to obično znači i korištenje većeg broja životinja. Naime, kod nižih doza je manja vjerojatnost pojave toksične posljedice, pa broj životinja s određenim odgovorom može biti premali za statističku obradu rezultata. Tomu se može pribjeći primjenom viših doza, ali je upitno koliko su takvi rezultati relevantni za ljude i njihovu uobičajenu izloženost ispitivanoj tvari. Testiranjem subkronične toksičnosti se određuje i maksimalno tolerirana doza (MTD) koja se koristi u ispitivanju karcinogenosti. MTD je doza toksikanta koja nije netoksična, nego uzrokuje određenu razinu prihvatljive toksičnosti (koja ne skraćuje prirodni životni vijek životinje).

Genotoksičnost

Sposobnost oštećenja nasljednog materijala se ispituje uz više testova čiji odabir ovisi o značajkama tvari koja se ispituje te zahtjevima regulatornih tijela. Među najvažnije ulaze: testovi mutacija gena, poput testova reverzne mutacije na bakterijama ili testa mišjeg limfoma, kao i *in vitro* i *in vivo* testovi kromosomskih aberacija.

[Amesov test je test mutacije gena koji koristi sojeve *Salmonelle typhimurium* \(noviji testovi i *Escherichije coli*\) koji imaju mutaciju na genu važnom u biosintezi histidina, pa bakterije ne mogu rasti ako u hranjivoj podlozi nema ove aminokiseline. Test se provodi i uz dodatak tkivnog homogenata sisavaca \(najčešće jetre\) da bi se oponašala biotransformacija toksikanata \(prije pripreme tkivnog homogenata donorska životinja se tretira s određenim agensima \(npr. fenobarbital\) koji induciraju biotransformacijske enzime, čime se povećava vjerojatnost aktivacije mutagena\). Kolonije bakterija će rasti samo nakon pojave mutacije koja obnavlja put biosinteze histidina.](#)

U testu mišjeg limfoma koriste se stanice limfoma miša koje preživljavaju samo ako ispitivana tvar izazove mutaciju druge kopije gena za enzim koji sudjeluje u ugradnji toksičnih analoga timidina u DNA. Provodi se također i uz aktivaciju tkivnim homogenatom sisavaca.

Test kromosomskih aberacija stanica jajnika kineskog hrčka uključuje tretiranje kulture stanica ispitivanom tvari uz dodatak tkivnog homogenata sisavaca u svrhu aktivacije, te se posebnim metodama mjere kromosomske aberacije.

Mikronukleus test glodavaca je *in vivo* ispitivanje kromosomskih aberacija kod kojeg se štakori ili miševi tretiraju ispitivanom tvari, te se u stanicama pretečama eritrocita iz koštane srži ispituju eventualni klastogeni učinci tj. lomovi kromosoma.

Novije metode, koje imaju niz prednosti u odnosu na prethodno navedene, uključuju korištenje transgenskih glodavaca, polimeraznu lančanu reakciju, gel elektroforezu DNA, i dr.

Transgenskim glodavcima je genetskim inženjeringom inkorporiran gen koji se ispituje na mutacije nakon izlaganja životinja ispitivanoj tvari.

PCR (polimerase chain reaction) nalazi primjenu nakon izolacije DNA iz stanica tretiranih životinja. DNA polimeraza proizvodi milijune kopija odabranih dijelova DNA, osiguravajući dovoljnu količinu za analizu mutacija.

Comet test se modifikacija gel elektroforetske metode koja služi za identifikaciju loma zavojnice, pri čemu se DNA fragmenti razdvajaju prema veličini.



Ako studije genotoksičnosti otkriju da je tvar mutagena u nekoliko testova, a uporaba tvari podrazumijeva prilično veliku izloženost ljudi, onda se bez daljnjeg testiranja može zabraniti uporaba tvari (ili odustati od daljnjeg razvoja i komercijalizacije). Ako se utvrdi mali genotoksični rizik tvari (npr. tvar je mutagena u nekoliko testova, ali samo u vrlo visokim dozama, ili je mutagena aktivnost uočena u samo jednom testu), onda se moraju provesti daljnje studije.

Metabolizam i toksikokinetika

Cilj ovih studija je razumijevanje apsorpcije, biotransformacije, raspodjele, i uklanjanja ispitivane tvari. Danas se toksikokinetska ispitivanja apsorpcije, raspodjele i uklanjanja toksikanata uglavnom provode mjerenjem koncentracije toksikanta i metabolita u različitim tjelesnim tkivima i tekućinama uz moderne analitičke tehnike poput HPLC-a, LC-MS/MS-a, i sl. Metabolizam tj. biotransformacija toksikanata se obično ispituje u kulturama substaničnih struktura (mikrosoma), stanica, tkiva, i sl., što, ukoliko je riječ o ljudskim stanicama, omogućuje uvid u metabolizam bez *in vivo* izlaganja toksikantu.

Ako je fiziološka sudbina ispitivane tvari poznata, procjena sigurnosti tvari se može donijeti na toj osnovi. Primjerice, ako se znaju svi metaboliti i za sve se zna da su bezopasni, onda se ispitivana tvar smatra sigurnom. Međutim, ako su neki metaboliti toksični ili se puno početne tvari zadržava u određenim tkivima, onda je potrebno provesti daljnja istraživanja. Za procjenu sigurnosti neke tvari za ljude potrebno je znati i da li je metabolizam u testiranoj vrsti sličan humanom metabolizmu.

Karcinogenost

Kao najsigurniji, zakonski uvjetovan test, koristi se studija raka kod glodavaca (rodent cancer bioassay, RCB) tijekom koje su životinje svakodnevno tijekom 24 mjeseca izložene (oralno, parenteralno, dermalno, itd.) ispitivanoj tvari. Najviša primijenjena doza je gore spomenuti MTD, dobivena testovima subkronične toksičnosti. Po završetku studije se utvrđuje da li je došlo do povećane učestalosti neoplazmi kod tretiranih životinja u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultate recenziraju različite institucije i organizacije (EPA, IARC, i dr.) te ispitivanu tvar klasificiraju prema karcinogenom potencijalu za ljude.

Osim RCB-a, u procjeni rizika izazivanja raka se mogu koristiti dodatne, jeftinije metode kojima se može otkriti karcinogen, npr.: ispitivanje kemijske građe (elektrofili ili sličnost građi poznatih karcinogena), ispitivanje genotoksičnosti, ispitivanje epigenetskih učinaka (npr. povećana proliferacija stanica, indukcija citokroma P450, peroksisomna proliferacija, imunosupresija, remećenje hormonske ravnoteže, i dr.), *in vivo* testovi sposobnosti inicijacije (genotoksični karcinogeni) ili promocije (epigenetski karcinogeni) karcinogeneze (prati se pojava preneoplastičnih lezija ili neoplazmi kod glodavaca i transgenskih miševa koji imaju nedostatak tumorsko supresorskih gena, gena za popravak DNA, ili su im u genom inkorporirane kopije ljudskih onkogeni, i dr.

Reproduktivna i razvojna toksičnost

Najčešći testovi za ispitivanje toksičnosti za muški reproduktivni sustav su: jedno- i višegeneracijski reprodukcijski testovi (kontinuirana izloženost pokusnih životinja ispitivanoj tvari tijekom jedne ili više generacija, uz procjenu reproduktivne sposobnosti), kratkotrajni reprodukcijski testovi (npr. test spermatotoksičnosti, ili dominantno-letalni test kojim se detektiraju mutageni učinci na spermij koji dovode do smrti njime začetog embrija/fetusa, itd.), te testovi za ispitivanje učinka endokrinih disruptora (antiandrogena ili androgena) (npr. izlaganje muških štakora ispitivanoj tvari od odbijanja od sise te tijekom puberteta, nakon čega se važu reproduktivni organi, određuju razine hormona i vrši procjena značajki puberteta). Neki pokazatelji toksičnosti za muški reproduktivni sustav (npr. težina spolnih organa, histopatološki nalazi testisa, i dr.) se dobivaju i standardnim testovima subkronične toksičnosti.

Upute (prema ICH) za testiranje toksičnosti za ženski reproduktivni sustav, te razvojne toksičnosti, se temelje na podjeli reproduktivnog procesa na stadije od perioda prije parenja ženki do potpune spolne zrelosti okočene životinje. Najčešće je riječ o višegeneracijskoj studiji uz početak tretiranja životinja prije parenja pa sve do okota potomstva ženki druge generacije. Na taj način se mogu utvrditi štetni učinci na funkciju spolnih žlijezda (vrši se pregled jajnika, maternice, menstrualnog ciklusa, razine hormona, i dr.), spolno ponašanje ženki, oplodnju (npr. broj oplođenih ženki u skupini, i sl.), rane i kasne stadije gestacije (skotnost) (pregled jajnika, sadržaj maternice (mrtvi ili živi embrij ili fetus), pregled fetusa na malformacije, itd.), parturiciju (okot) (npr. promatranje okota uz bilježenje eventualnih komplikacija ili nenormalnog ponašanja majke, procjena novooočeenih životinja, i dr.), laktaciju, i razvoj potomstva (npr. procjena spolnog dozrijevanja muških i ženskih jedinki okota; naročito važno kod endokrinih disruptora). Ispitivanje razvojne toksičnosti (i teratogenosti) se može provesti i odvojeno uz tretiranje ženki od implantacije oplođene jajne stanice do parturicije.

Dodatne studije

Ovisno o značajkama ispitivane tvari (npr. kemijska građa, mehanizam toksičnog djelovanja, namjena (za nove kemikalije), i dr.), mogu se provesti i dodatne studije poput ispitivanja toksičnosti za probavni trakt, bubrege, jetru, kožu, živčani sustav, kardiovaskularni sustav, imuni sustav, itd.

PROCJENA IZLOŽENOSTI

Izloženost je apsorpcija toksikanta prilikom kontakta s okolišnim medijima poput zraka, zemlje, vode ili hrane. Važni činioci u procjeni su trajanje izloženosti, put izloženosti (npr. preko probavnog trakta), bioraspoloživost toksikanta iz medija, koncentracija u mediju, i dr. **Bioraspoloživost se odnosi na dio doze koja dospijeva u krv. Npr. toksikant se može dobro apsorbirati, ali i najveći dio razgraditi već u enterocitima, poput histamina.** Osim poznavanja koncentracije toksikanta u namirnicama, bioraspoloživosti, mora se poznavati i količina unesene hrane (ili vode) i tu svrhu se koriste metode poput upitnika učestalosti namirnica (food frequency questionnaire), metode bilježenja (npr. 7-day weighed dietary record), metode prisjećanja (npr. ponavljani 24-hr recall), i sl., ili se prosječni unos neke namirnice može izračunati dijeleći godišnju proizvodnju u zemlji, te uvezene količine, s brojem stanovnika.

U posljednje vrijeme je povećano korištenje tzv. biomarkera (biološki markeri) u procjeni izloženosti. Biomarkeri su promjene na molekularnoj i/ili staničnoj razini uslijed izloženosti toksikantu. **Primjerice, količina aromatskih amina vezanih za hemoglobin (tzv. adukti) može poslužiti kao mjera izloženosti ovim spojevima.** Korištenje ovih pouzdanih indikatora izloženosti je moguće nakon utvrđivanja veze doze i odgovora između toksikanta i korištenog biološkog parametra. **Sukladno gornjem primjeru: koliko adukata aromatskih amina nastaje na hemoglobinu kod određene oralno unesene koncentracije.**

KARAKTERIZACIJA I UPRAVLJANJE RIZIKOM

Na temelju podataka dobivenih identifikacijom opasnosti, utvrđivanjem veze doze i odgovora i podataka o izloženosti toksikantu, može se izvršiti karakterizacija rizika tj. procijeniti vjerojatnost štetnog učinka tijekom izloženosti.

Za karcinogene se tradicionalno pretpostavljalo da nemaju prag djelovanja (tj. tako niske koncentracije kod koje neće uzrokovati štetu) (vidi **VEZA DOZE I ODGOVORA**) te nema razine koja se smatra sigurnom. Obično se nastoji zakonski spriječiti izloženost ljudi takvim tvarima (npr. zabrana nekih pesticida ili aditiva) ili se, u slučaju prirodnih kontaminanata ili sastojaka koji nastaju obradom hrane poput aflatoksina ili akrilamida, preporuča prisutnost u hrani smanjiti na najnižu, tehnološki ostvarivu mjeru. Nulta tolerancija je ionako nemoguća, a postoje i brojni dokazi da genotoksični karcinogeni imaju prag djelovanja. U posljednje vrijeme se evaluacija negenotoksičnih karcinogena provodi uz pretpostavku praga djelovanja. Posebnim statističkim metodama se krivulja doze i odgovora ekstrapolira u područje vrlo niskih koncentracija (za koje nema eksperimentalnih podataka) i određuje doza povezana s *de minimis* rizikom (10^{-4} do 10^{-6}). Ovo konkretno znači da će, npr., izloženošću takvoj dozi tijekom čitavog života rizik raka biti manji od 1 na milijun izloženih osoba.

Ostalim toksikantima se određuju vrijednosti unosa koje se povezuju s minimalnim ili nikakvim rizikom štetnih učinaka, poput prihvatljivog dnevnog unosa (acceptable daily intake, **ADI**), koji se izražava u mg po kg tjelesne težine, i predstavlja dnevni unos koji tijekom životnog vijeka ne bi trebao imati nikakve štetne posljedice. **TDI** je tolerirani dnevni unos (tolerable daily intake) koji se analogno određuje i izražava, samo što se uglavnom odnosi na kontaminante, za razliku od ADI-ja koji se uglavnom koristi za aditive. **Unos kontaminanata nikako ne može biti prihvatljiv, jedino toleriran** ukoliko je razina unosa ispod one koja može uzrokovati štetu zdravlju. Neki od adekvatnih, često korištenih parametara su **PMTDI** (provisional maximum tolerable daily intake kao privremeni TDI dok se ne prikupi dovoljno kvalitetnih znanstvenih dokaza), **PTWI** i **PTMI** (provisional tolerable weekly/monthly intake za toksikante kumulativnih svojstava), **RfD** (reference dose), **MRL** (minimal risk level), i dr. Svi se oni osnivaju na NOAEL-u ili LOAEL-u dobivenim testovima na životinjama, pri čemu se ovi dijele s faktorom nesigurnosti (uncertainty factor, UF) koji se procijenjuje kao mjera nesigurnosti u ekstrapolaciji rezultata dobivenih sa životinjama na ljude. Za ekstrapolaciju je potrebno znati niz parametara, poput metabolizma, toksikokinetike, mehanizma djelovanja toksikanta, itd., kako u ispitivanoj vrsti, tako i kod ljudi. Zbog nepoznanica oko razlika u toksičnosti između vrsta (životinje prema ljudima), ali i unutar vrste (ljudi prema ljudima, zbog varijabilnosti unutar populacije), dobiveni NOAEL ili LOAEL se dijele s UF, koji je obično 10 za svaku od navedenih nepoznanica. Dodatni UF se mogu koristiti ukoliko postoje manjkavosti u samom eksperimentu kojim su određeni NOAEL ili LOAEL (npr. kratko trajanje izlaganja, nedovoljan broj životinja, itd.). Stoga, ako je NOAEL za neki pesticid kod štakora 1 mg/kg tjelesne težine, a UF = 100, onda će ADI za ljude biti 0,01 mg/kg.

Alternativa NOAEL-u je izračun tzv. referentne doze (benchmark dose, **BMD**). Na krivulji veze doze i odgovora se odabere referentni odgovor (1, 5 ili 10%) za određenu dozu. **Ⓢ** Primjerice, doza koja dovodi do 10% odgovora u populaciji je BMD_{10} i određuje se niža granica intervala pouzdanosti uz 95%-tnu sigurnost, tj. $BMDL_{10}$. Na temelju ovih vrijednosti se nadalje mogu računati ADI, TDI, RfD i slični parametri.

Procjena rizika često uključuje i računanje tzv. granice izloženosti tj. **MOE** (margin of exposure). Računa se kao omjer NOAEL-a (mg/kg/dan) i razina kojima su ljudi obično izloženi. **Npr., ljudi su izloženi kemikaliji isključivo putem vode za piće i ukupan dnevni unos je 0,04 mg/kg/dan. Ako je NOAEL za neurotoksične učinke 100 mg/kg/dan, MOE je 2500.** Ovako visoka granica izloženosti ohrabruje u smislu malog rizika za ljude. Niska MOE (manja od 100) ukazuje na potrebu dodatne evaluacije tvari.

Na osnovi ADI-ja ili TDI-ja, unosa hrane i unosa dotičnog toksikanta iz drugih izvora, određuju se i dozvoljene količine toksikanata u namirnicama. Npr., za ostatke pesticida i veterinarskih lijekova se definira tzv. **MRL** (maximum residue level ili maksimalna razina ostataka) te maksimalne količine ostataka aditiva i kontaminanata koje se mogu nalaziti u pojedinim namirnicama. Teži se harmonizaciji normativa za ostatke pesticida, ili vrste i količine aditiva u hrani, između ostalog zbog pojednostavljivanja međunarodne trgovine prehrambenim proizvodima (OECD, WHO, UN Food and Agriculture Organization, FAO, i dr.). WHO i FAO su osnovale zajedničko vijeće, tzv. Codex Alimentarius koji donosi odgovarajuće preporuke i standarde na temelju preporuka savjetodavnih tijela: JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives, Združeno stručno vijeće o prehrambenim aditivima) i JMPR (Joint Meeting on Pesticide Residues, Združeno vijeće o ostacima pesticida). SAD ima nekoliko agencija koje se bave karakterizacijom rizika: EPA (Environmental Protection Agency, Agencija za zaštitu okoliša), US FDA/CFSAN (Food and Drug Administration / Center for Food Safety and Applied Nutrition,

Agencija za hranu i lijekove / Centar za sigurnost hrane i primjenjenu prehranu), US HHS ATSDR (Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi, Agencija za toksične tvari i registar bolesti), itd. U EU je slično tijelo EFSA (European Food Safety Authority, Europska agencija za sigurnost hrane) koja savjetuje zakonodavnu Europsku komisiju. RH usklađuje svoje zakone i pravilnike s važećim u EU.

Rizik u perspektivi

Javna percepcija rizika je često znatno veća od stvarnog rizika procijenjenog znanstvenim istraživanjima. Također, zabrinutost javnosti je usredotočena na sintetske kemikalije, pesticide i aditive. Ames i suradnici su pokušali ukazati na neutemeljenost zabrinutosti tako što su rangirali kemikalije prema karcinogenom riziku za ljude, računanjem tzv. HERP indeksa (human exposure, rodent potency). Riječ je o postotku karcinogene jakosti za glodavce (TD_{50} u mg/kg/dan ili doza koja izaziva rak kod 50% životinja) koju čovjek primi prosječnom dnevnom izloženošću tijekom životnog vijeka (mg/kg/dan) ([dnevna izloženost ljudi se dijeli s dozom koja izaziva rak kod pokusnih životinja i množi sa 100](#)). Rezultati za neke kemikalije iz hrane su prikazani u tablici:

Tvar	HERP (%)
Etilen dibromid, pesticid	0,0004
Poliklorirani bifenili, industrijski kontaminanti	0,0002
Kloroform, nastaje kloriranjem vodovodne vode	0,001
Aflatoksin iz maslaca od kikirikija	0,03
Safrol iz začina	0,03
Kava kiselina iz kave	0,1
Etanol iz vina	0,5
Etanol iz piva	2,1

Očito, najviše vrijednosti imaju prirodne tvari tj. rizik od sintetskih pesticida i kontaminanata u hrani je znatno manji. Ove rezultate treba ispravno interpretirati. Nije izloženost prirodnim toksikantima pretjerana, nego je izloženost sintetskim tvarima toliko niska da nema gotovo nikakav utjecaj na zdravlje. Ames i suradnici su procijenili da 99,99% izloženosti karcinogenim tvarima putem hrane otpada na tvari prirodnog podrijetla. Također, smatraju da je evolucija metaboličkih sustava rezultirala dobrom prilagodbom ljudi na tvari koje se nalaze u hrani i da, obzirom na fleksibilnost detoksikacije, rizik od sintetskih tvari nije veći u odnosu na tvari prirodnog podrijetla. Osim toga, sama metodologija ispitivanja karcinogenosti RCB testom bi mogla precijenjivati rizik od kemikalija jer se karcinogeno djelovanje često ustanovi upravo kod najviše primjenjivane doze (MTD), koja nije netoksična za stanice i, kronično bi, zbog odumiranja stanica i kompenzacijske proliferacije (tj. ubrzanog dijeljenja da se nadoknade odumrle stanice), mogla povećati rizik nastanka stanice raka. Dakle, rizik je najvećim dijelom funkcija koncentracije i.e. doze, upravo u skladu s Paracelsusovom pronicljivom tvrdnjom iz uvoda.

LITERATURA na raspolaganju kod predmetnog nastavnika

- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Biochemistry*, W.H. Freeman & Co., 2002.
- Boelsterli UA: *Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets*, Informa Healthcare, 2007.
- Fennema OR (Ed.): *Food Chemistry*, Marcel Dekker, 1996.
- Hodgson E (Ed.): *A Textbook of Modern Toxicology*, John Wiley and Sons, 2004.
- Katzung BG (Ed.): *Basic & Clinical Pharmacology*, McGraw Hill, 2004.
- Klaassen CD (Ed.): *Casarett and Doull's Toxicology, A Basic Science of Poisons*, McGraw Hill Professional, 2007.
- Omaye ST: *Food and Nutritional Toxicology*, CRC Press, 2004.
- Shibamoto T, Bjeldanes LF: *Introduction to Food Toxicology*, Academic Press, 1993.
- Wallace Hayes A (Ed.): *Principles and Methods of Toxicology*, Taylor & Francis, 2001.

KORISNI LINKOVI

- Pravilnik o maksimalnim razinama ostataka pesticida u i na hrani i hrani za životinje biljnog i životinjskog podrijetla. Narodne novine 148/08, 2008.
- Pravilnik o aromama. Narodne novine 53/08, 2008.
- Pravilnik o pomoćnim sredstvima u procesu proizvodnje. Narodne novine 38/08, 2008.
- Pravilnik o prehranbenim aditivima. Narodne novine 62/10, 2010.
- Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani. Narodne novine 154/08, 2008.
- Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće. Narodne novine 47/08, 2008.
- Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama rezidua veterinarsko-medicinskih proizvoda u hrani životinjskog podrijetla. Narodne novine 75/08, 2008.
- Pravilnik o najvišim dopuštenim količinama ostataka veterinarskih lijekova u hrani. Narodne novine 29/05, 2005.
- Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom. Narodne novine 48/08, 2008.
- Uredba o razini genetski modificiranih organizama u proizvodima ispod koje proizvodi koji se stavljaju na tržište ne moraju biti označeni kao proizvodi koji sadrže genetski modificirane organizme. Narodne novine 92/08, 2008.
- Zakon o hrani N.N. 46/07
- Hrvatska agencija za hranu
- US FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, i.e. The 'Bad Bug Book'
- European Commission, DG Health and Consumer Protection, Food and Feed Safety
- European Food Safety Authority
- US Environmental Protection Agency
- US EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances
- Codex Alimentarius
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
- Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues
- US HHS Agency for Toxic Substances and Disease Registry
- The International Programme on Chemical Safety, Inchem
- International Conference on Harmonisation
- Organization for Economic Cooperation and Development
- Society of Toxicology
- Teratology Society
- International Agency for Research on Cancer
- International Life Sciences Institute

International Food Information Council
Toxnet, Toxicology Data Network
Exttoxnet, Extension Toxicology Network
Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants
American Council on Science and Health
Biological Effects of Low Level Exposures
New Scientist
The Why Files, Science Behind the News
Sense About Science