



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

# Toxikokinetika

Luděk Bláha, PŘF MU

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Co by si student(ka) měl(a) odnést ?

Jaké **procesy** chemická látka prodělává **uvnitř ORGANISMU** ?

Co je to TOXIKOKINETIKA a jaké popisuje procesy.

- Znát vstupy
- Přeměny
- Vylučování toxických látek v organismech



# TOXIKOKINETIKA

## -Osud látek v organismu – (vstupy / přeměny / vylučování)

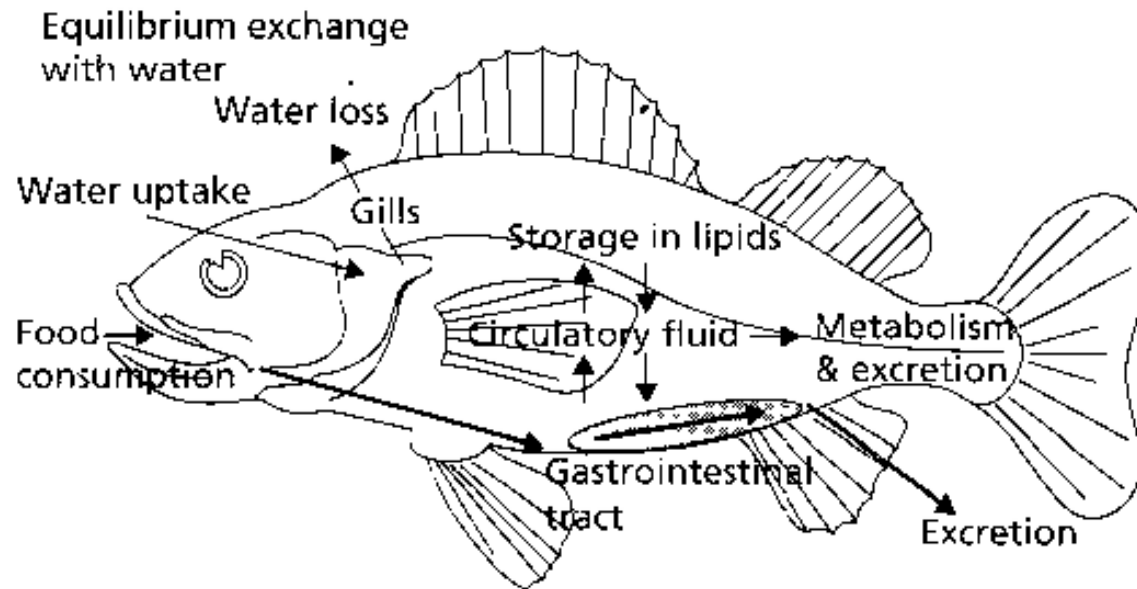


Fig. 3.5 Uptake, accumulation and loss processes for a toxicant in the ambient water with fish.



# Toxicita = nerovnováha mezi VSTUPEM a VYLOUČENÍM

## PŘÍJEM ~ ELIMINACE (*rovnováha, homeostáza*)

- udržování látky v organismu pod úrovní škodlivého efektu
- organismus však vynakládá energii na udržení rovnováhy  
(*procesy eliminace, metabolismus ...*)

## PŘÍJEM > ELIMINACE

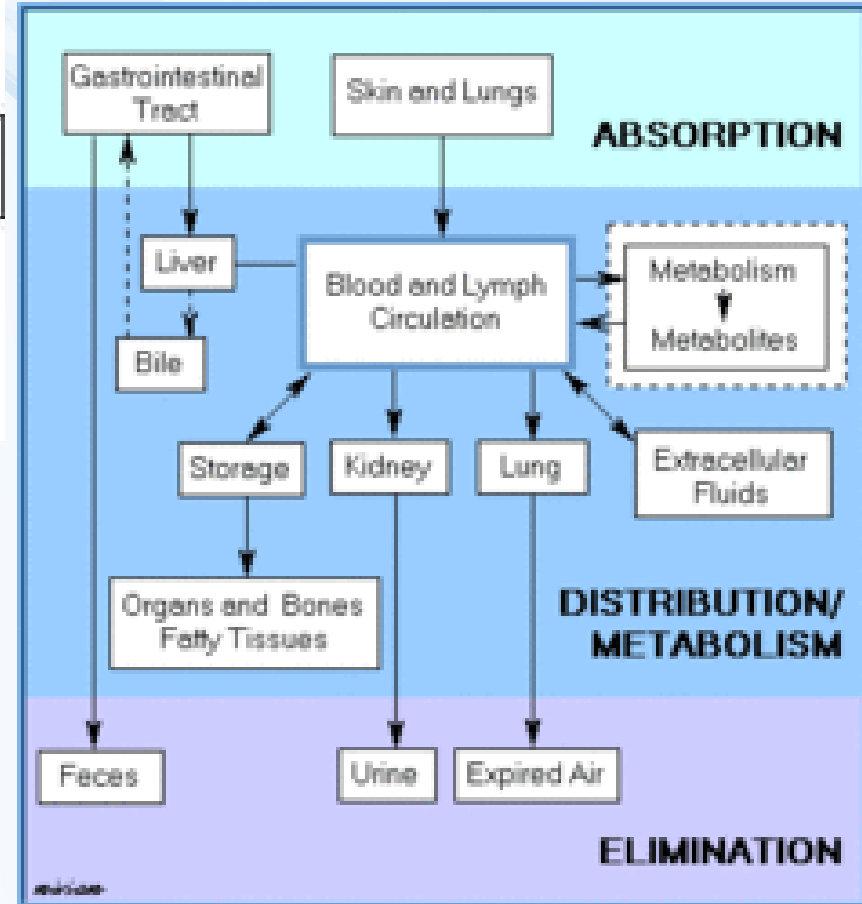
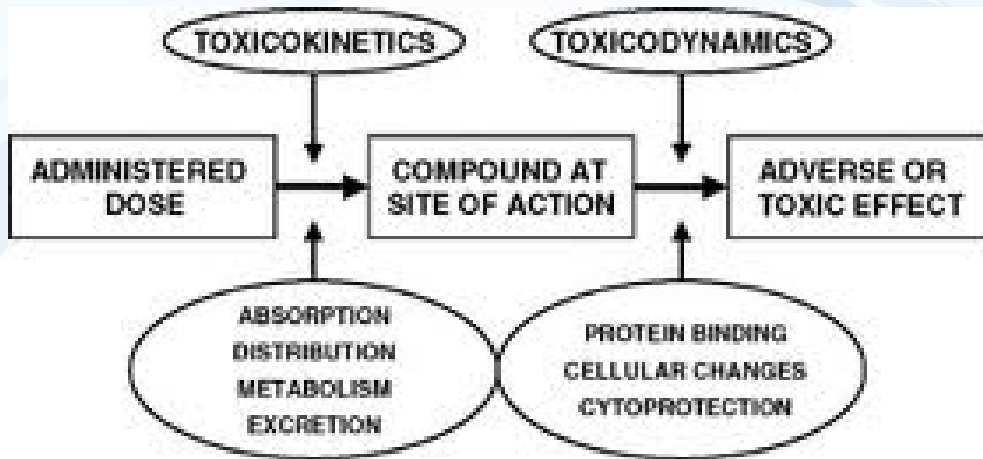
- nárůst koncentrací látky v organismu
- časem překročení úrovně efektu (*threshold level*)

## Překročení limitů homeostatických procesů

- > přechod ze stadia **rezistence (resp. adaptace)**  
do stadia pozorovatelných negativních efektů u jedince
- > škodlivé efekty na vyšších úrovních organizace



# Jaké procesy zahrnuje toxikokinetika? ADME!



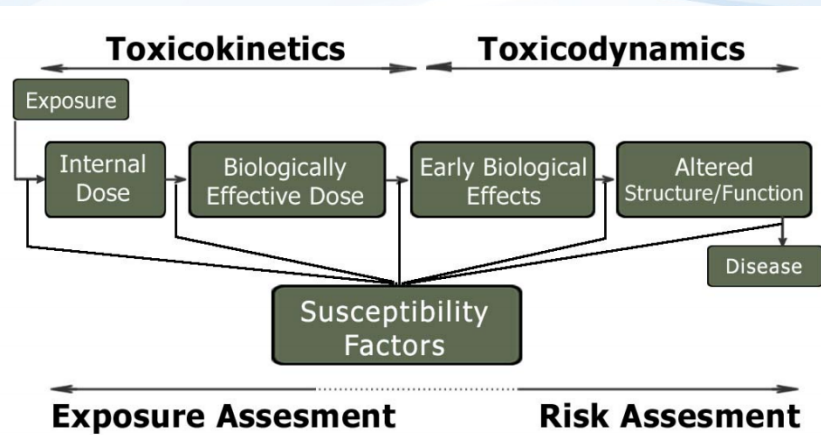
**ADME**

Absorption  
Distribution  
Metabolism  
Elimination

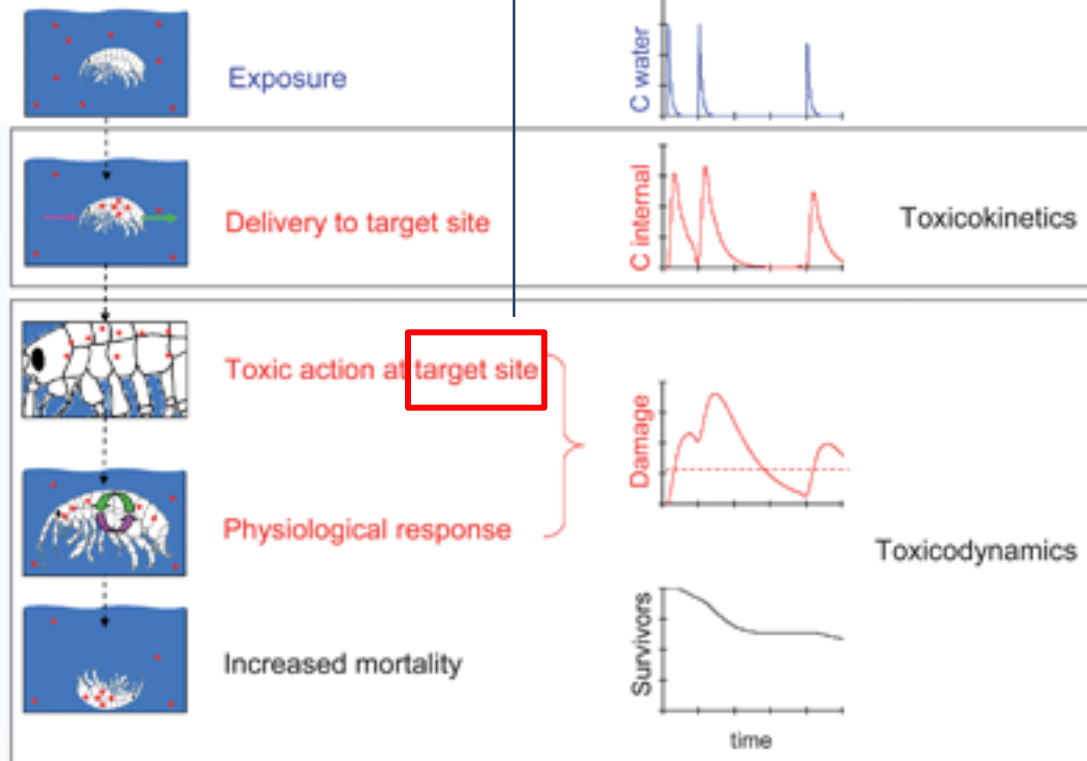
*Toxicokinetics ...*

*... EXPOSURE phase → Determines the final dose*

# Toxico-DYNAMIKA ... viz dále



**TARGETS = macromolecules**  
(DNA/RNA, proteins, membrane lipids)



**Mechanismus účinku**  
(Mode of Action)



... a měřitelné  
**ÚČINKY (efekty)**



# TOXIKOKINETIKA 1: příjem látek do organismu

## Příjem látek u různých organismů

### 1) jednobuněčné organismy

- pasivní difuze přes **membránu**
- „selektivní“ vstup přes existující transportní systémy

### 2) vícebuněčné organismy / řasy

- difuze toxikantu přes **membránu** a mezi buňkami

### 3) terestrické rostliny

- rozpuštěné ve vodě/půdě - vstup kořeny/listy
- plyné toxikanty - vstup přes stomata na listech
- lipofilní látky (*některé herbicidy*) - penetrace voskové kutikuly
- vstup do buňky → **přes membránu**



# TOXIKOKINETIKA 1: příjem látek do organismu

## 4) živočichové - 3 hlavní cesty vstupu do organismu

### - potrava/pitná voda

- průchod trávicím traktem, změny/transformace dle pH, mikroflory střeva, *př. cykasin: netoxický - ve střevě konverze->silný mutagen*

### - respirační cesta

- trachee u hmyzu, žábry u akvatických organismů, plíce

- velká plocha pro výměnu/vstup látky (*často 25x > povrch těla*)

### - povrchem těla

- větší význam u menších organismů (*relativně větší plocha*) a akvatických organismů

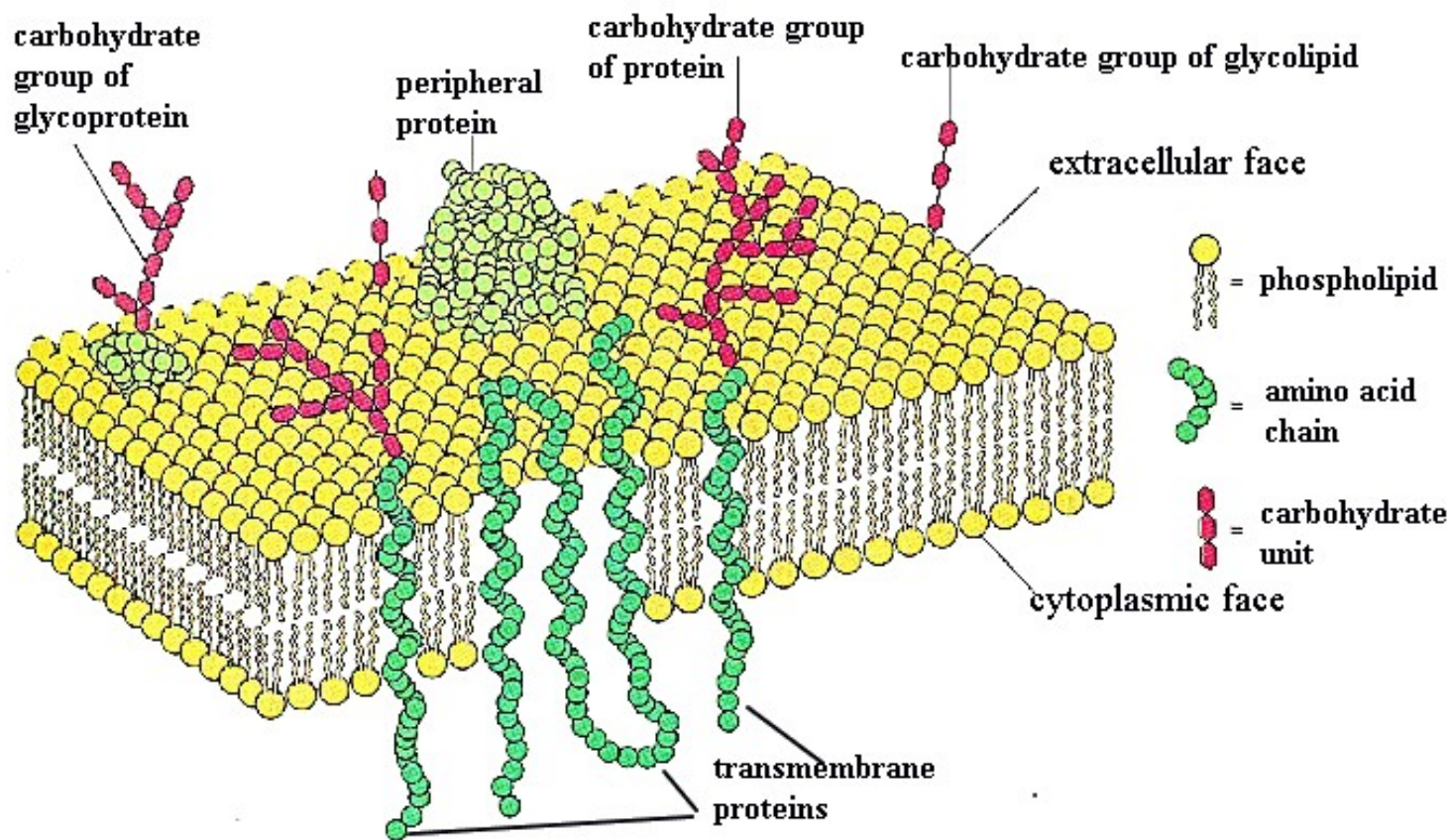
**>> vždy je prvním krokem přestup přes buněčnou membránu**





# Membrány – klíčová překážka pro toxické látky

Bez ohledu na typ organismu a cestu vstupu (do vyšších organismů) musí toxikant překonat bariéru plazmatické membrány (*nebo i buněčné stěny*)



## Cesta látky tělem:

Střevo

→ Krev

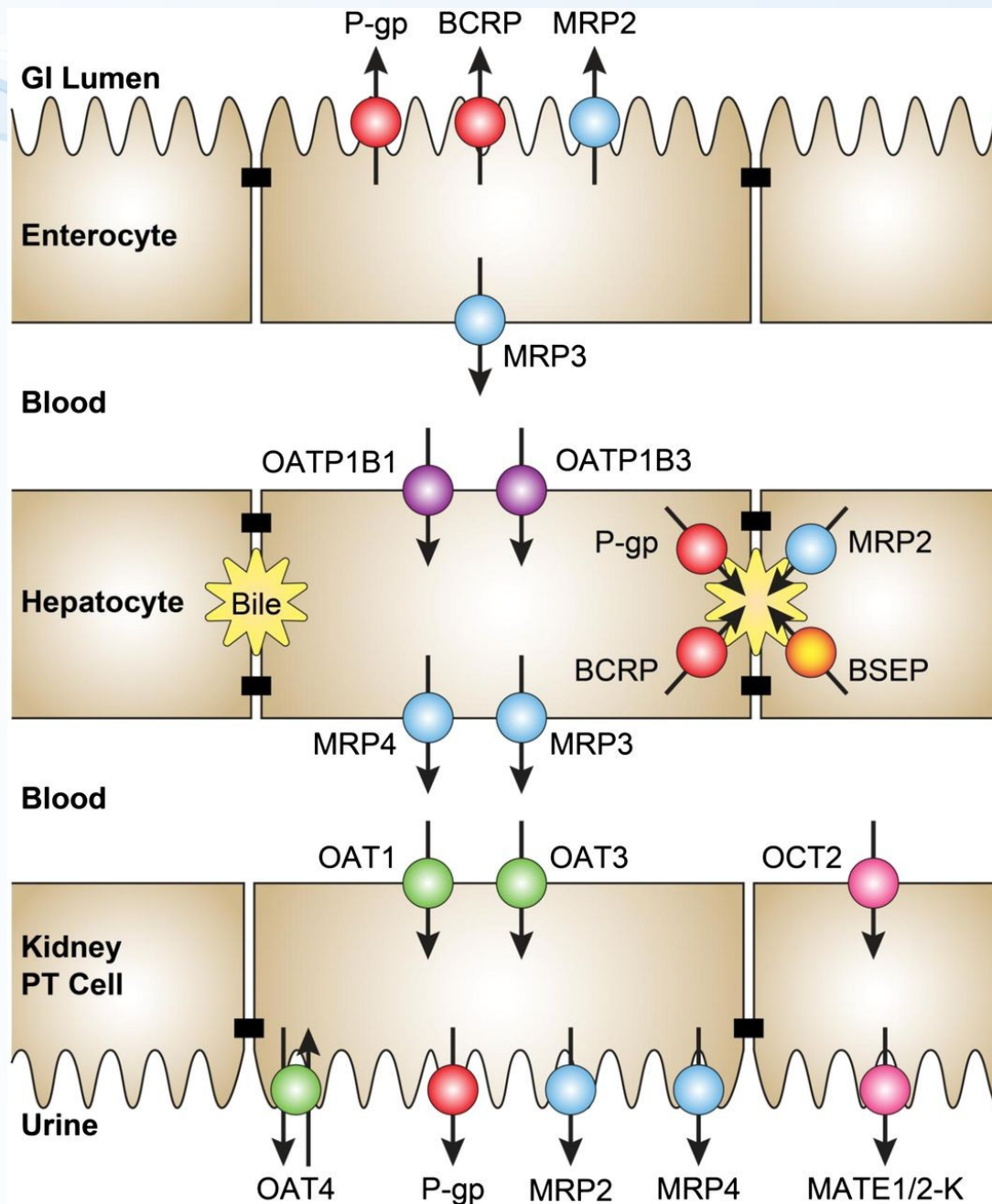
→ Játra

→ Krev

→ Ledviny

→ Vyloučení žluč

**Obrázek:** vyznačeny jen „aktivní“ transportéry (pro živiny a jim podobné látky).  
Cizorodé látky - nejčastěji pasivní difúze

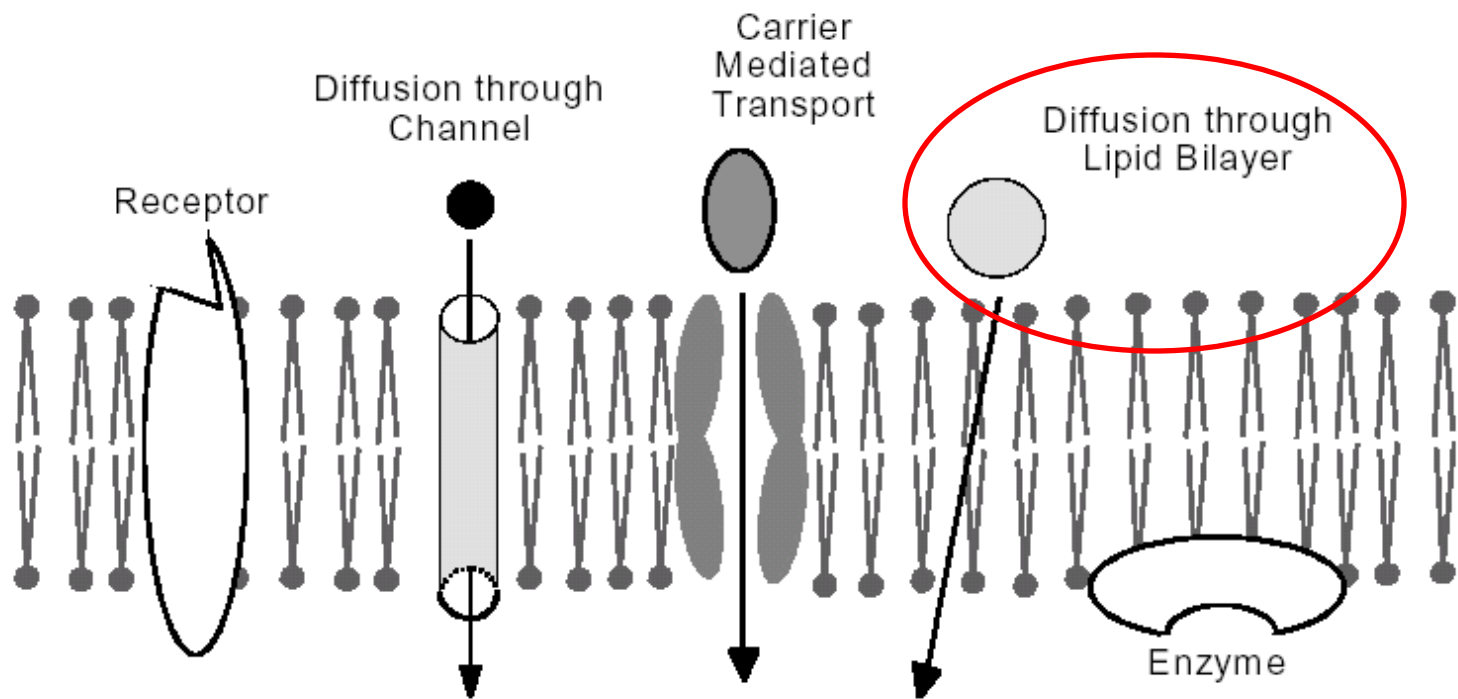


## Přestup toxikantů přes membrány

Nejčastější (všechny látky) - pasivní **difuze**

Podskupina látek **určitých** vlastností (např. podobné živinám nebo dalším tělu přirozeným látkám) → **usnadněný transport / aktivní transport**

Velké molekuly + částice - **pinocytoza**



# TOXIKOKINETIKA 1

## - příjem látek do organismu -

### Přestup toxikantů přes membrány

#### PASIVNÍ DIFUZE

- náhodný pohyb molekul podle koncentračního gradientu
- proces charakterizovatelný kinetikou prvního řádu

#### - závisí na:

- koncentračním gradientu
- ploše a tloušťce membrány/buněčné stěny
- rozpustnosti látky v tucích a ionizaci toxikantu
  - *lipofilní látky - dobrá difuze*
  - *kationické - lepší navázání na povrch membrány (negativně nabitě fosfolipidy)*
- molekulové hmotnosti
  - *malé molekuly (<0.4 nm) rozpustné ve vodě (CO, HCN, N<sub>2</sub>O, NO) dobrá pasivní difuze*
  - *příliš velké molekuly – špatný (nebo minimální) přestup*





# TOXIKOKINETIKA 1

## - příjem látek do organismu -

### Přestup toxikantů přes membrány

#### USNADNĚNÝ TRANSPORT

- transmembránové proteiny vyvazují extracelulární látky a usnadňují přenos přes membránu : toxická látka - interference  
( $Ca^{2+}$  / *calmodulin*,  $Fe^{2/3+}$  / *transferin*)

#### AKTIVNÍ TRANSPORT

- „pumpy“ po/proti koncentračnímu gradientu
- navázání látky na receptor / přenos přes membránu za spotřeby ATP  
*spřažené transporty  $Na^+/K^+$  ATPáz - toxické látky / interference*

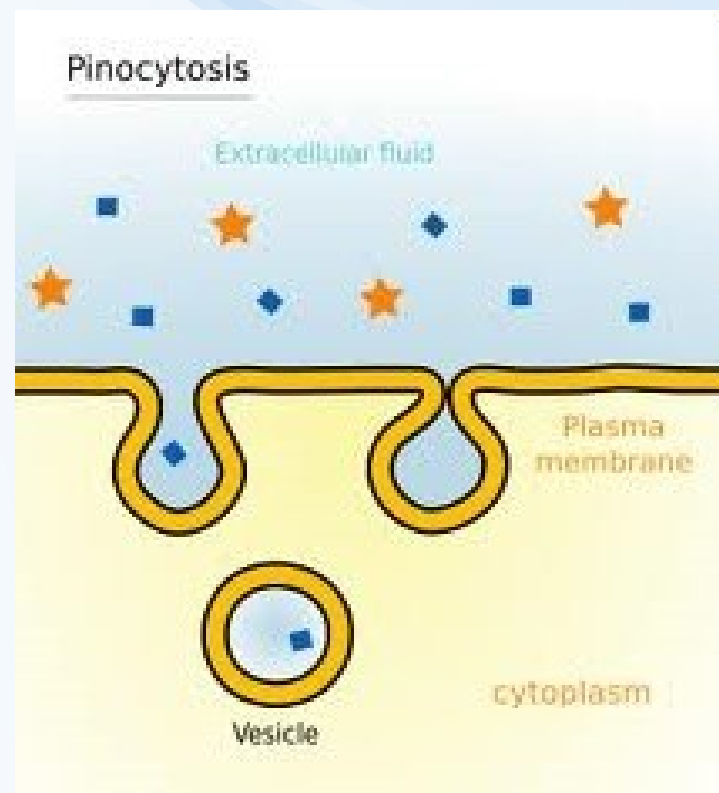
*Tyto speciální biologické procesy se však u „cizorodých“ látek uplatňují vzácně – ojedinele u látek, které jsou podobné živinám apod. (např. toxiny sinic: peptidy)*

# TOXIKOKINETIKA 1

## - příjem látek do organismu -

### PINOCYTOZA

- transport větších molekul endocytozou
- př. vstup vzdušných toxikantů na prachových částicích ( $< 1 \mu\text{m}$ ) do alveolárních buněk, vstup vláken azbestu do fagocytujících buněk



# TOXIKOKINETIKA 2

## - transport látek v organismu -

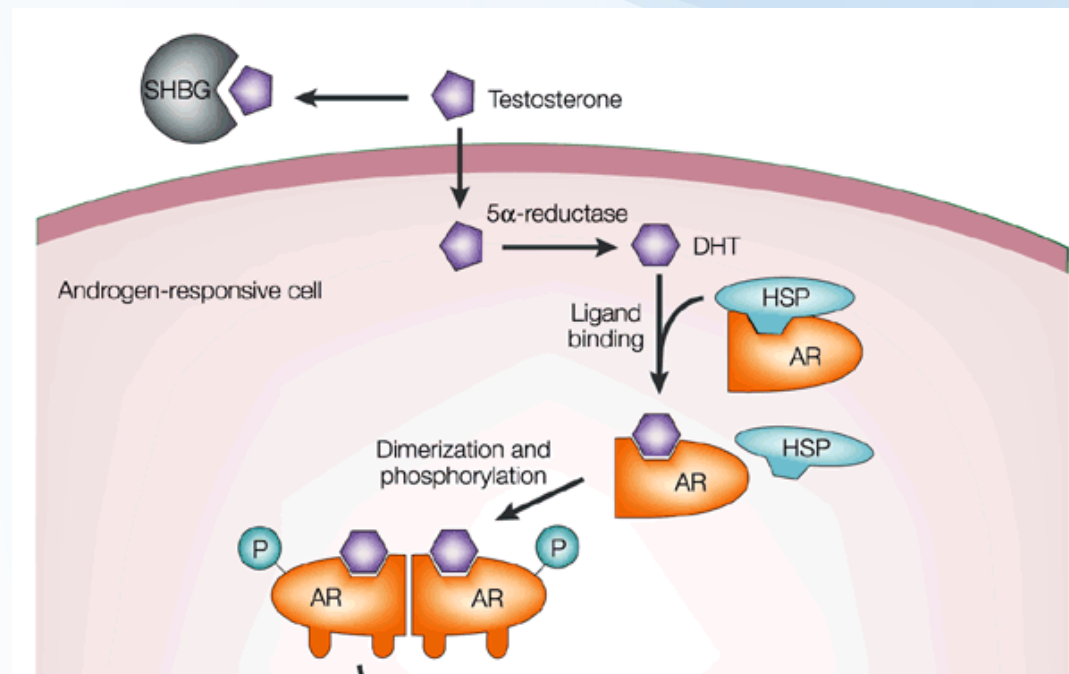
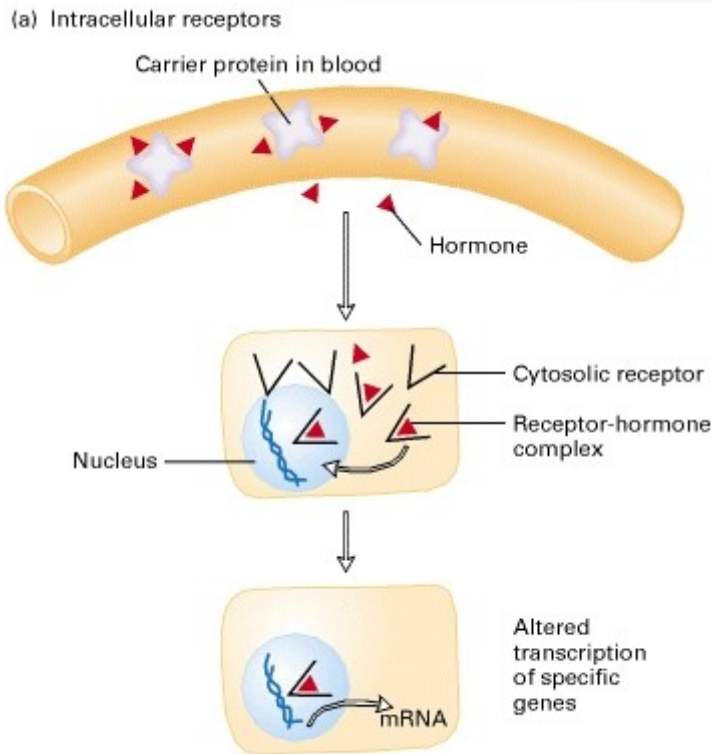
### Transport u živočichů

- krev, lymfa, hemolymfa

- transport **rozpuštěných** látek

- transport **po navázání** na proteiny (*albumin, specifické proteiny*)

*! Mnoho organických (nepolárních) látek je vázáno*



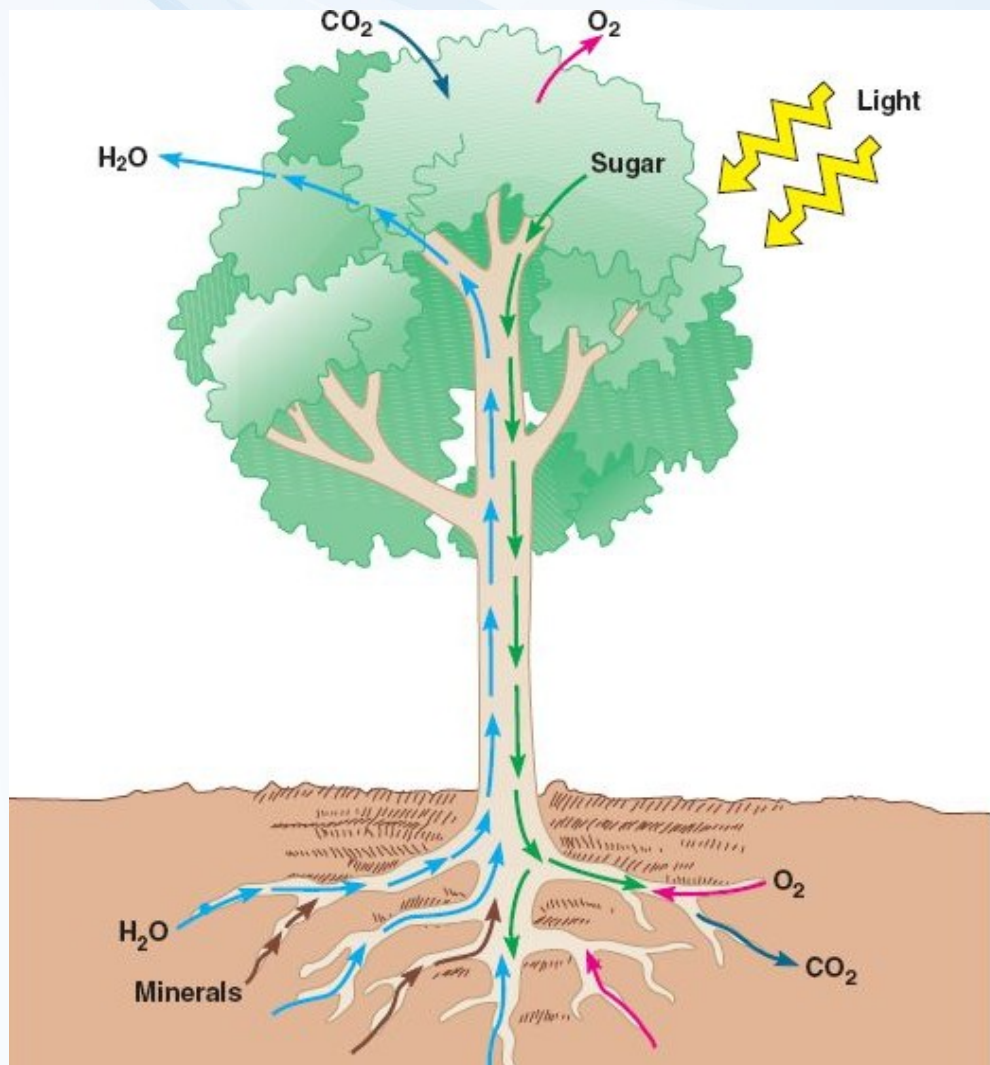
# TOXIKOKINETIKA 2

## - transport látek v organismu -

### Transport u rostlin

- vodní proud v xylemu
- plasmadesmy ve floemu

*-procesy závislé  
na podmínkách prostředí  
(T, vlhkost, světlo ...)*





# TOXIKOKINETIKA 2

## - Distribuce látek v organismu -

### Afinita k různým tkáním/pletivům

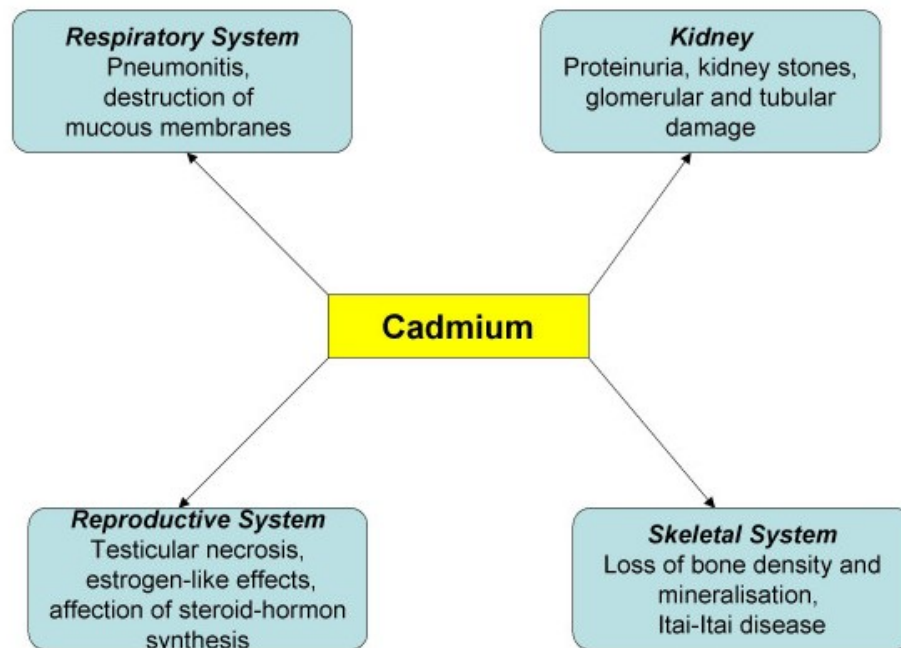
- chemické vlastnosti určují afinitu -> **cílové tkáně - biokoncentrace**

mušle - Cd/Pb - gonády

savci Cd - mozek/kosti, Pb - ledviny/kosti

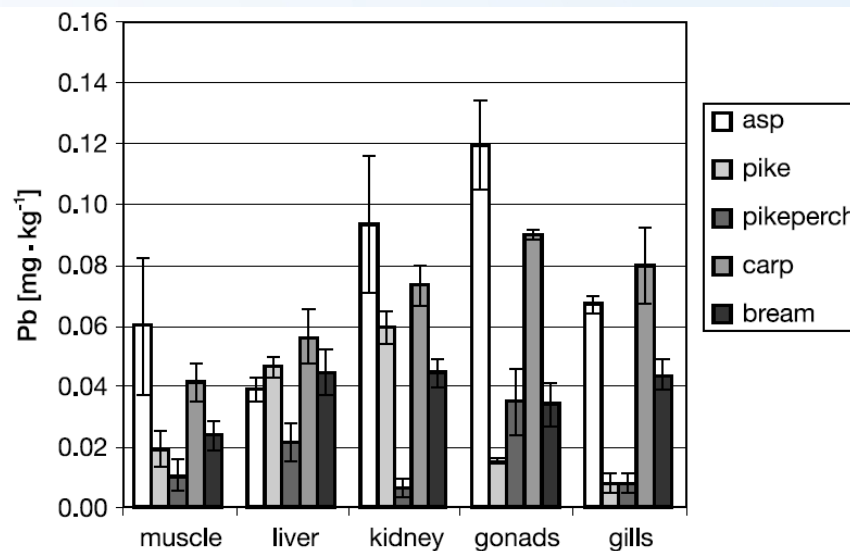
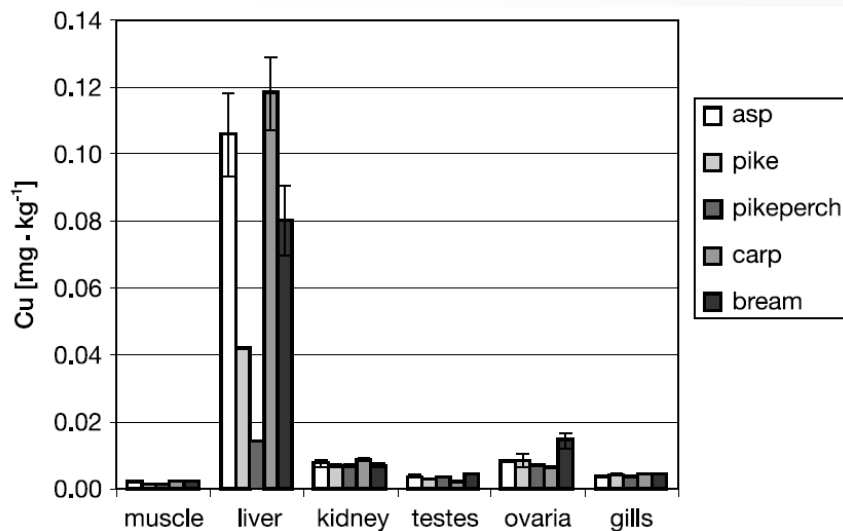
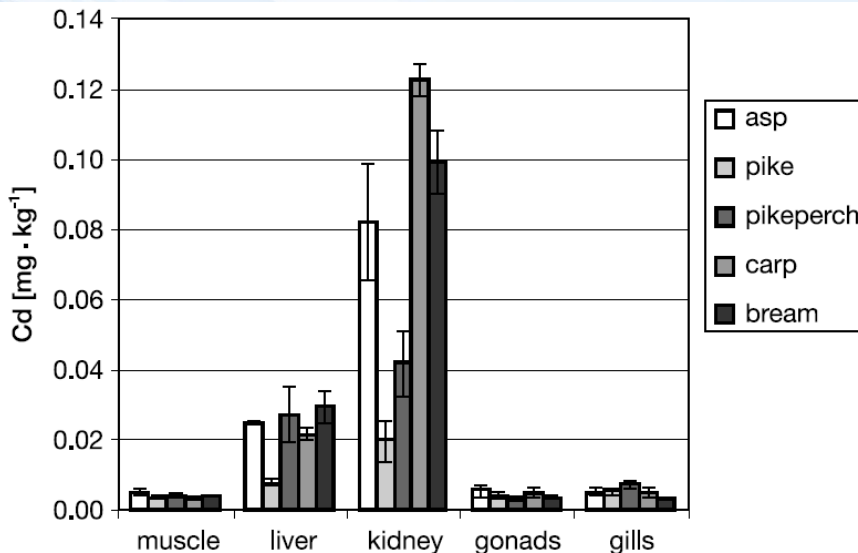
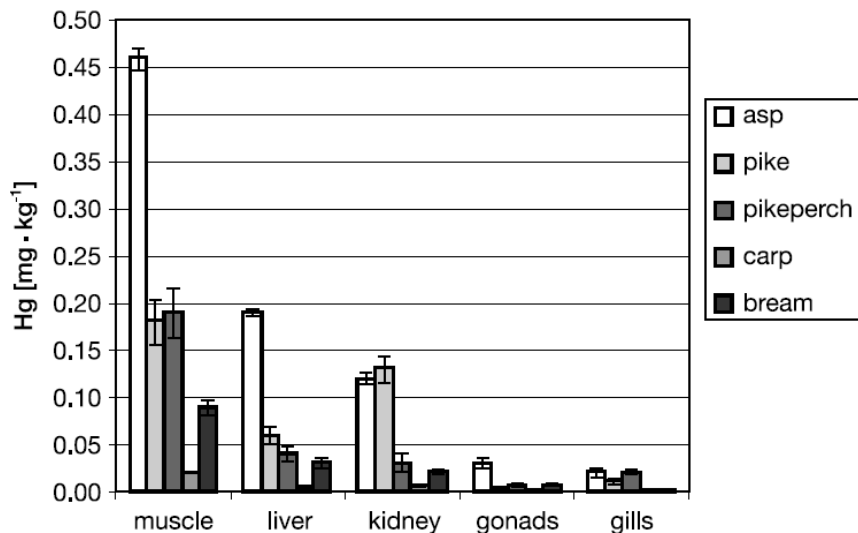
Hg - u savců: ledviny > játra > slezina > střevo > srdce ...

lipofilní látky -> tukové tkáně (*játra, mozek*)



# Příklad – kovy v tkáních ryb: Nové Mlýny

(Kenšová et al. ACTA VET. BRNO 2010, 79: 335-345)



# TOXIKOKINETIKA 3

## - transformace látek v organismu -

### Transformace xenobiotik v organismech

- **geneticky fixované staré konzervativní systémy** pro transformaci xenobiotik jsou u všech organismů:
  - v minulosti
    - transformace biotoxinů (plísní, rostlin, bakterií ...)
    - produkty hoření (PAHs)



# TOXIKOKINETIKA

## - transformace látek v organismu -

### Základní strategie detoxifikace

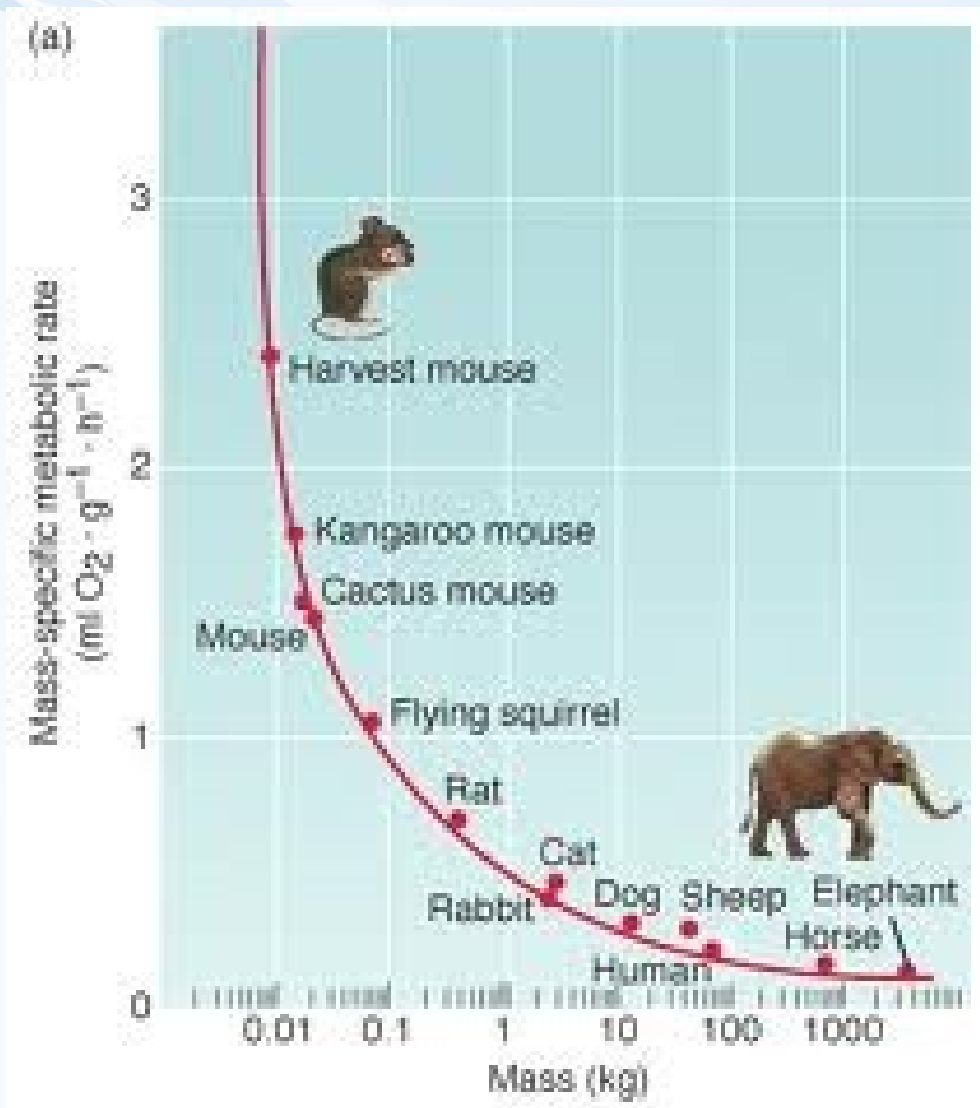
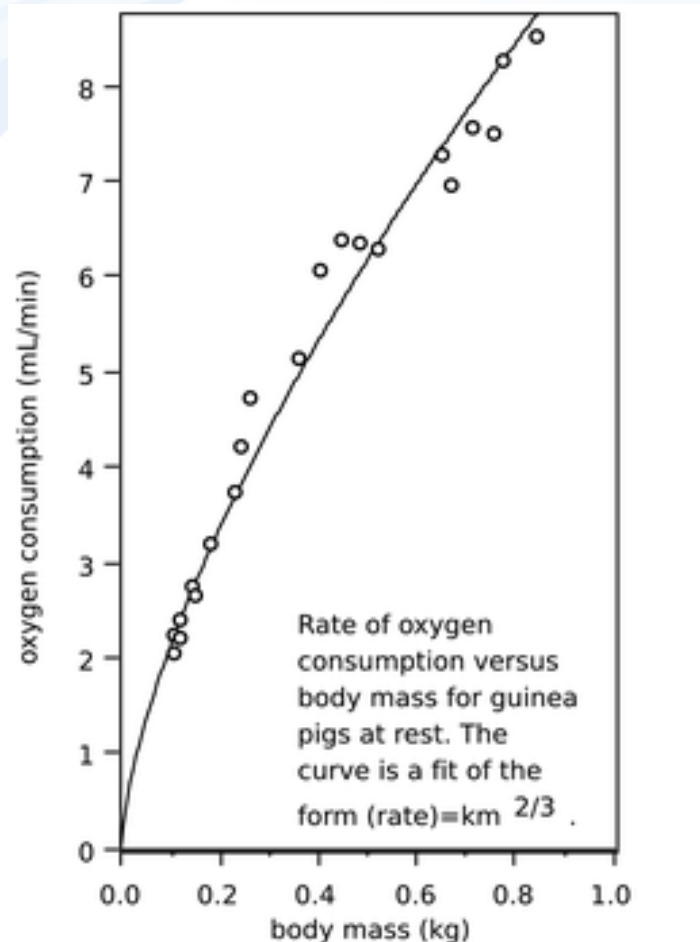
- **eliminace látky z organismu = omezení expozice**
- většina vylučovacích orgánů: vodné tekutiny
  - => transformace = lepší rozpustnost ve vodě
  - tvorba polárnějších, méně hydrofobních / více hydrofilních produktů
- zpravidla rozlišovány **2 hlavní fáze detoxifikace** (příp. i 3. fáze, exkrece)
- dobře prostudováno u zvířat (savců)

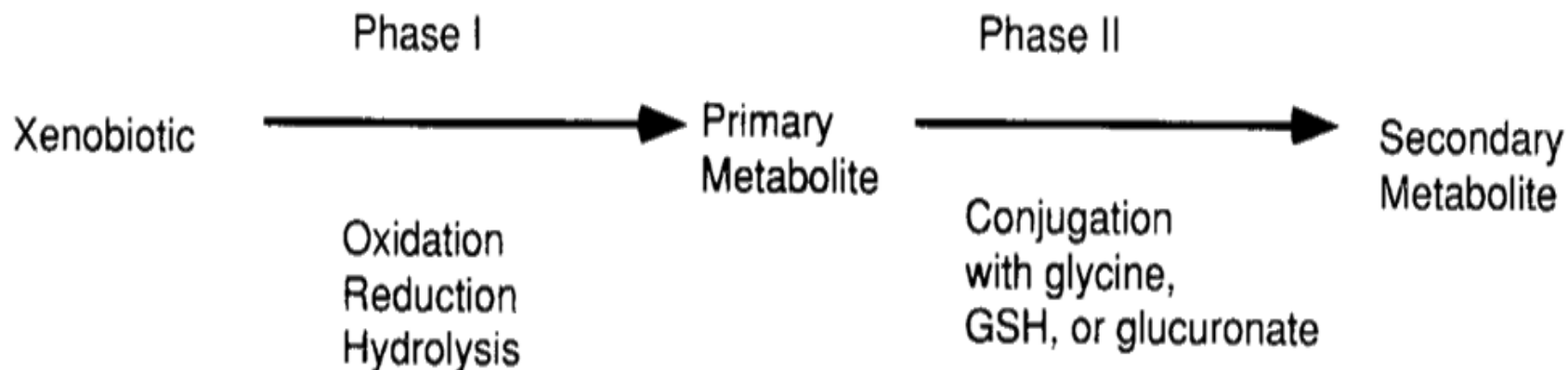
Poznámka: u obratlovců (zvl. savců – teplokrevní = vyšší rychlost chemických reakcí >> aktivnější detoxikace než u ryb nebo bezobratlých  
(→ mlži akumulují PAHs, savci méně – efektivní metabolismus/oxidace/exkrece)

- *u rostlin podobné procesy - transformace oxidujícími enzymy*
  - *cytochrom oxidáza, fenol oxidáza, peroxidáza, askorbát oxidáza*

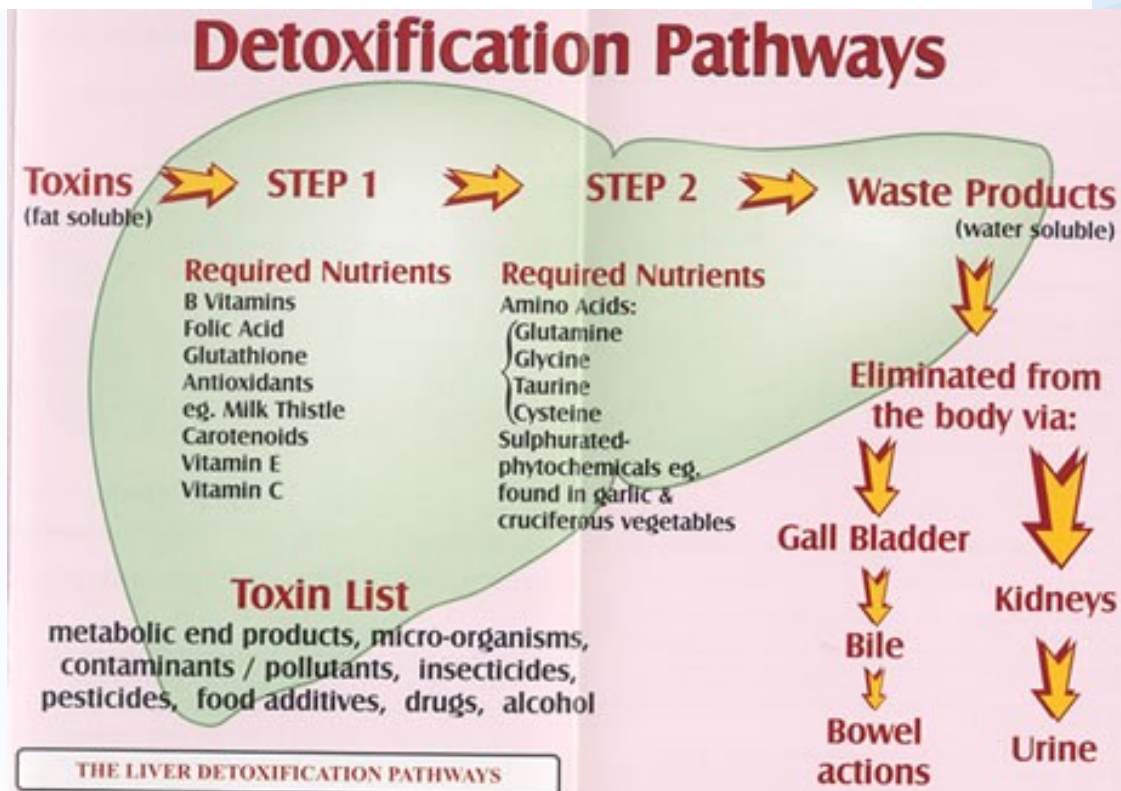


# Velikost těla → rychlost metabolismu (transformací)





**Figure 8.1** The two phases of xenobiotic metabolism.



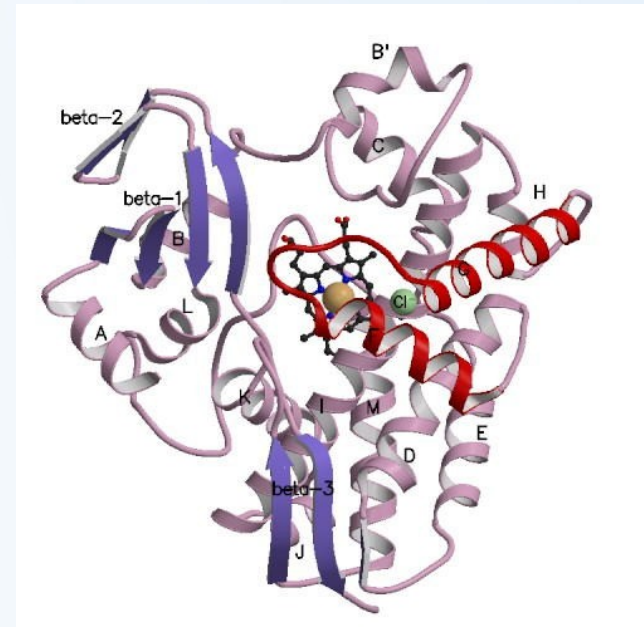


# TOXIKOKINETIKA

## - transformace -

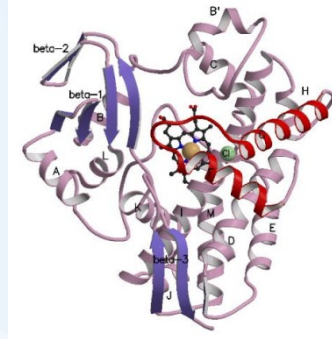
### Fáze I transformace

- enzymy MFO (mixed function oxidase, mixed function **oxygenase**)
- membránové enzymy vázané na endoplasmatické retikulum
- Jsou extrahovatelné v podobě membránových vesikulů (= mikrozomy = S-9 frakce = mikrosomální oxidáza)
  - S9 využití při testování „promutagenů“ – bioaktivace – viz dále
- Geneticky konzervované
  - u všech rostlin i živočichů
  - podobné geny/proteiny i u bakterií



# TOXIKOKINETIKA

## - transformace -

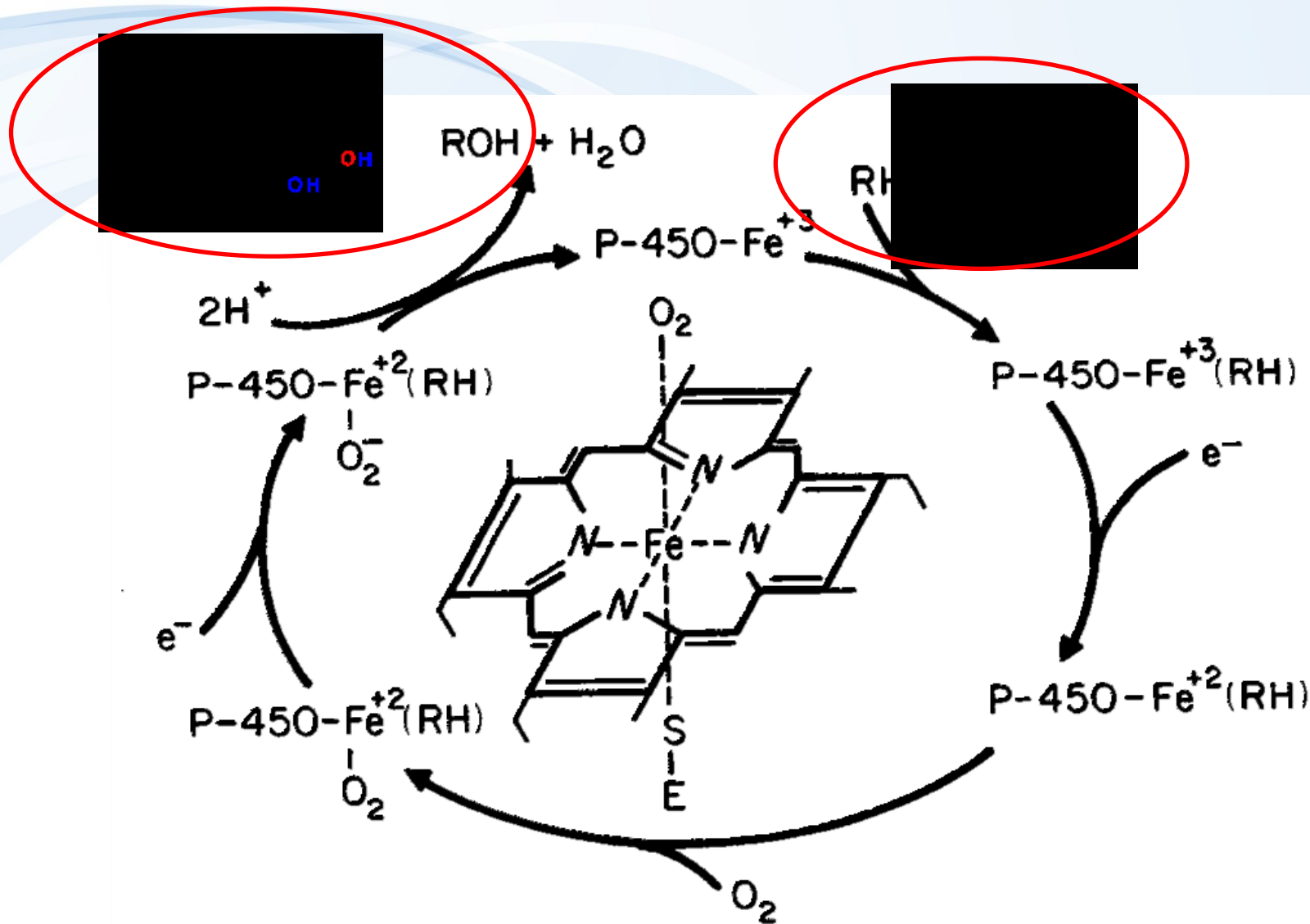


### Fáze I transformace – CYP450

- základní složkou MFO jsou enzymy obsahující jako koenzym hem = cytochromy P450 (CYP) = superrodina s více než 150 geny
- u obratlovců nejčastější v parenchymu jater = hlavní orgán detoxifikace (*ale i jinde - epitely střeva, žábry ...*)
- u bezobratlých v hepatopankreasu a trávicích žlázách
- **hlavní reakce – reakce s kyslíkem**
  - + další reakce (**hydrolyza** / epoxidace / dehalogenace / **hydroxylace** / deaminace / dealkylace)





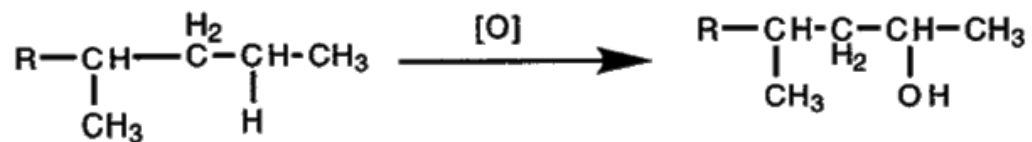


*Scheme 3.1. Outside: suggested sequence of hydroxylation reactions carried out by cytochrome P-450. Inside: schematic presentation of the configuration of the P-450 prosthetic group.*

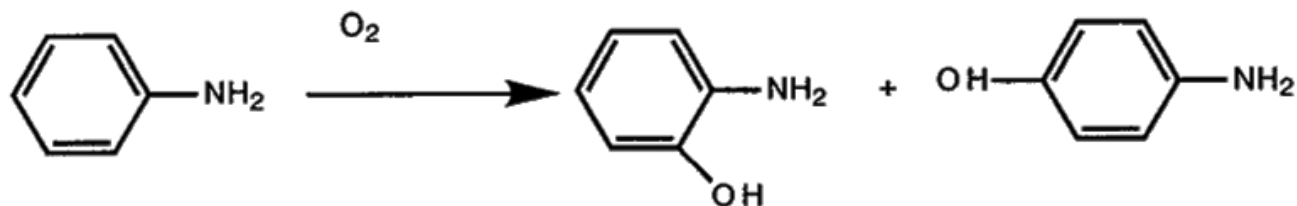


# Fáze I biotransformace – příklady 1

## Oxidation



*Side Chain Oxidation*

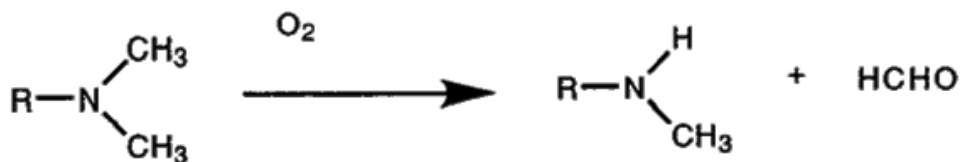


Aniline

*Aromatic hydroxylation*

o-Aminophenol

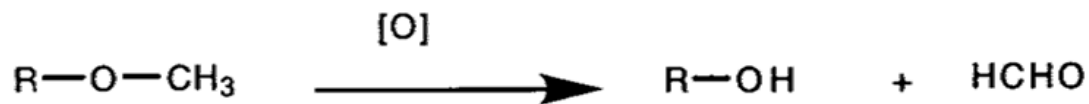
p-Aminophenol



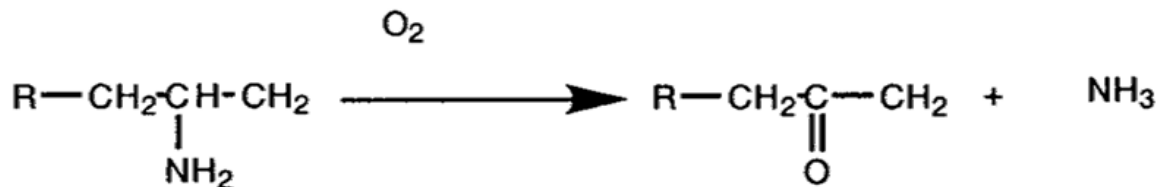
*N-Dealkylation*



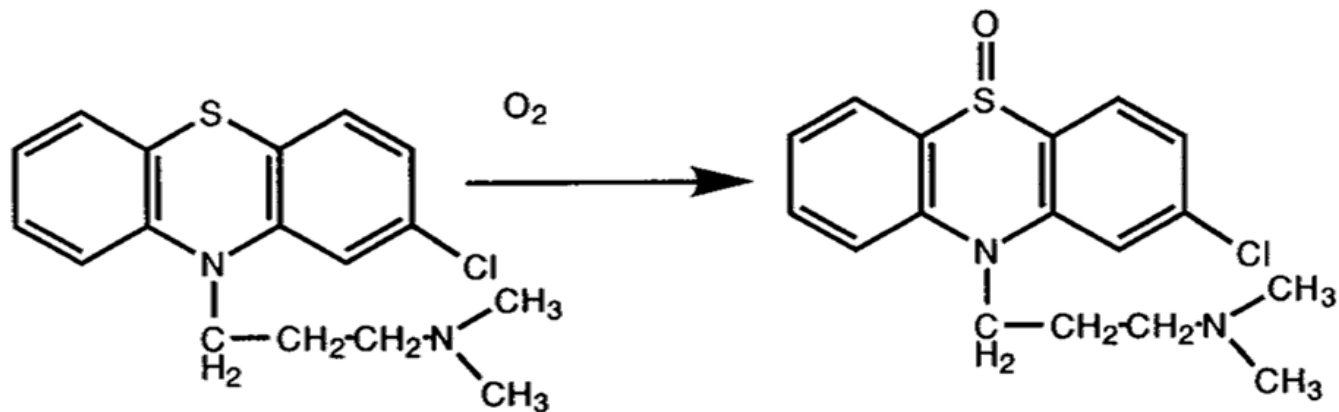
## Fáze I biotransformace – příklady 2



*O-Dealkylation*



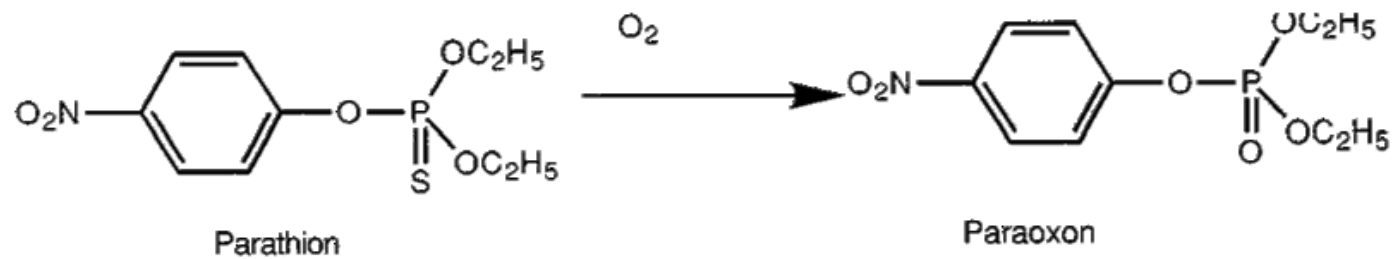
*Deamination*



*Sulfoxide formation*

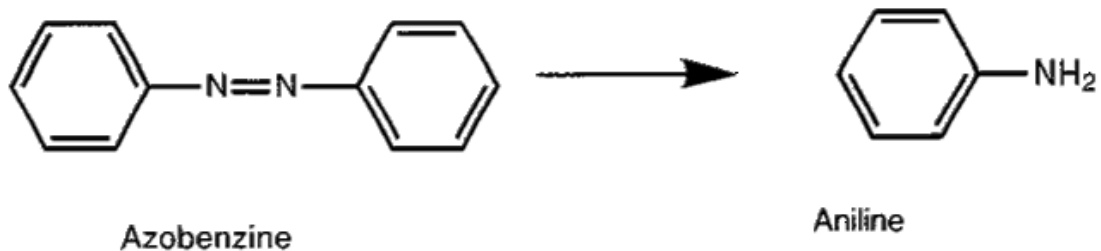


## Fáze I biotransformace – příklady 3

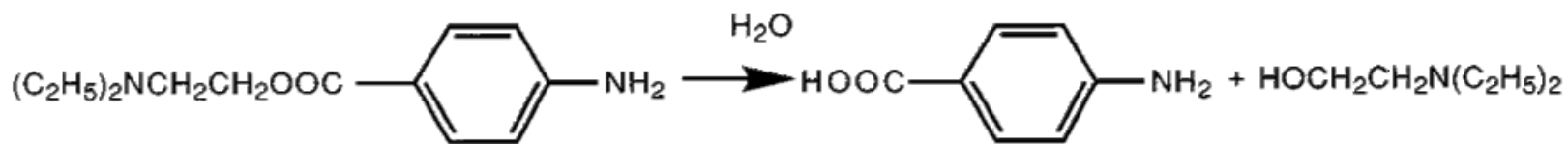


*Desulfuration*

**Reduction**



**Hydrolysis**



# TOXIKOKINETIKA

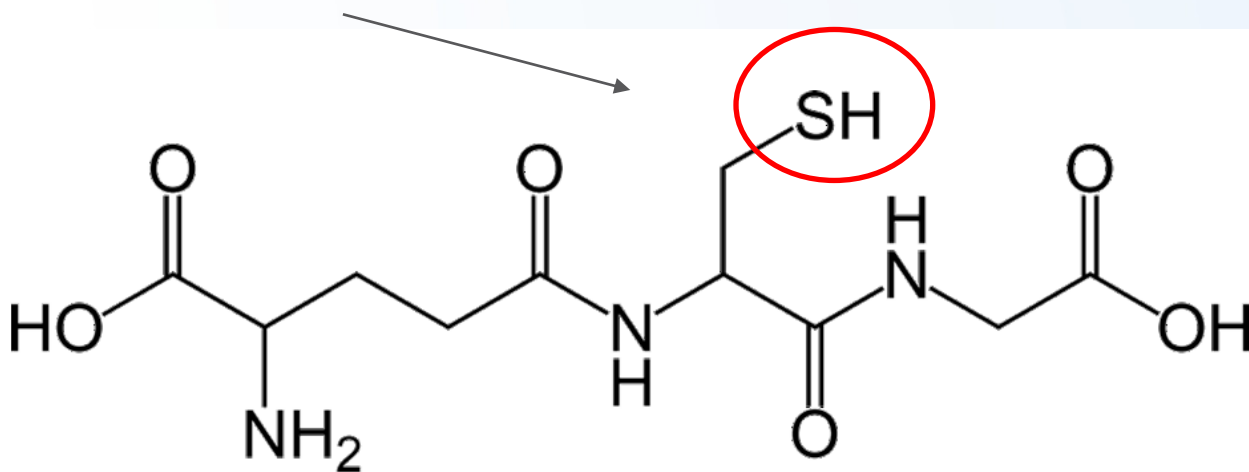
## - transformace -

### Fáze II transformace

- **konjugace** metabolitů z fáze I (*nebo přímo reaktivních toxikantů*) s řadou endogenních metabolitů (→ dále více rozpustné produkty)

Enzymy „**transferázy**“

- Sacharidy a deriváty (**glukuronová kyselina**) aminokyseliny + tripeptid , **glutathion (GSH!)**, fosfáty, sulfáty ...



# TOXIKOKINETIKA

## - transformace -

### Fáze II transformace

- enzymy cytosolové i membránové:

**glutathion S-transferázy (GST)**, epoxid hydroláza (EH),  
**UDP-glucuronosyltransferaza (UDP-GTS)**, sulfotransferáza (ST)

- vyloučení rozpustných produktů v moči / potu / žluči

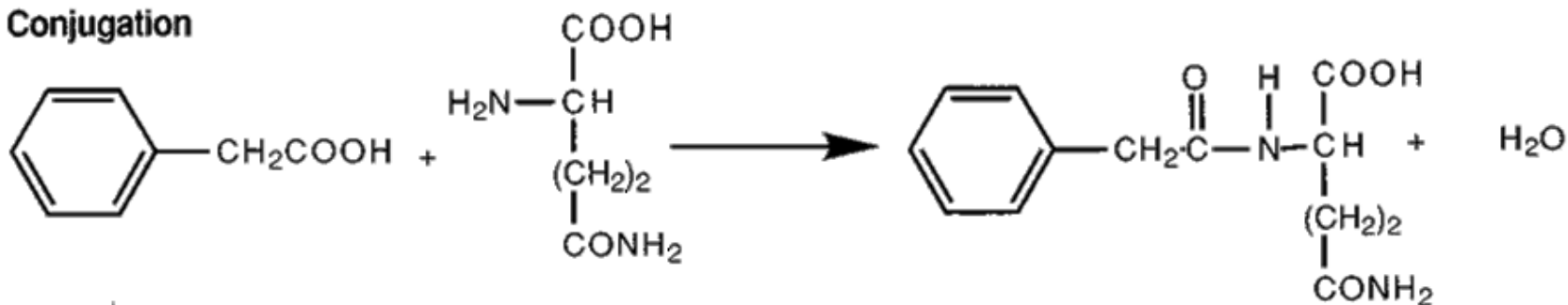
*! Existuje řada látek, které jsou stabilní a podléhají jen pomalé nebo žádné transformaci ! (organochlorové látky ...)*



# Fáze II biotransformace – příklady 1

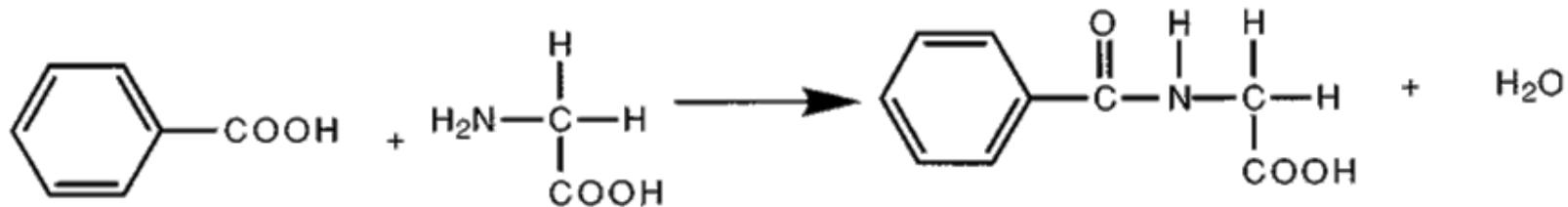
## Phase II reactions

### Conjugation



Phenylacetic acid

Glutamine



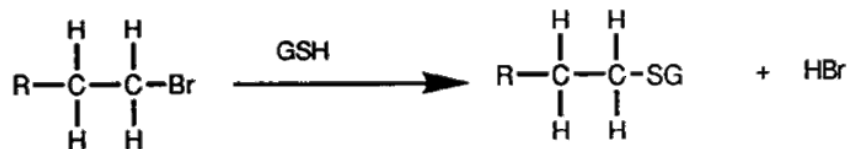
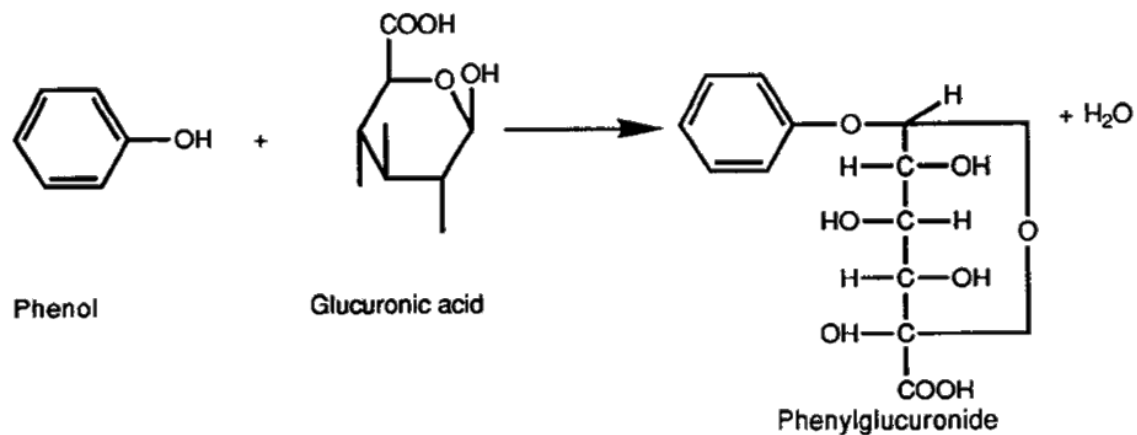
Benzoic acid

Glycine

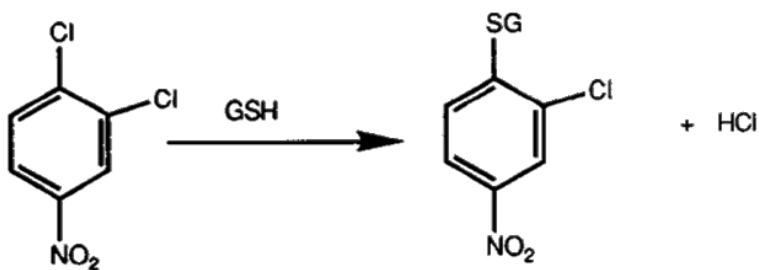
Hippuric acid



## Fáze II biotransformace – příklady 2



*Displacement of aromatic halogens by glutathione*



3,4-Dichloronitrobenzene





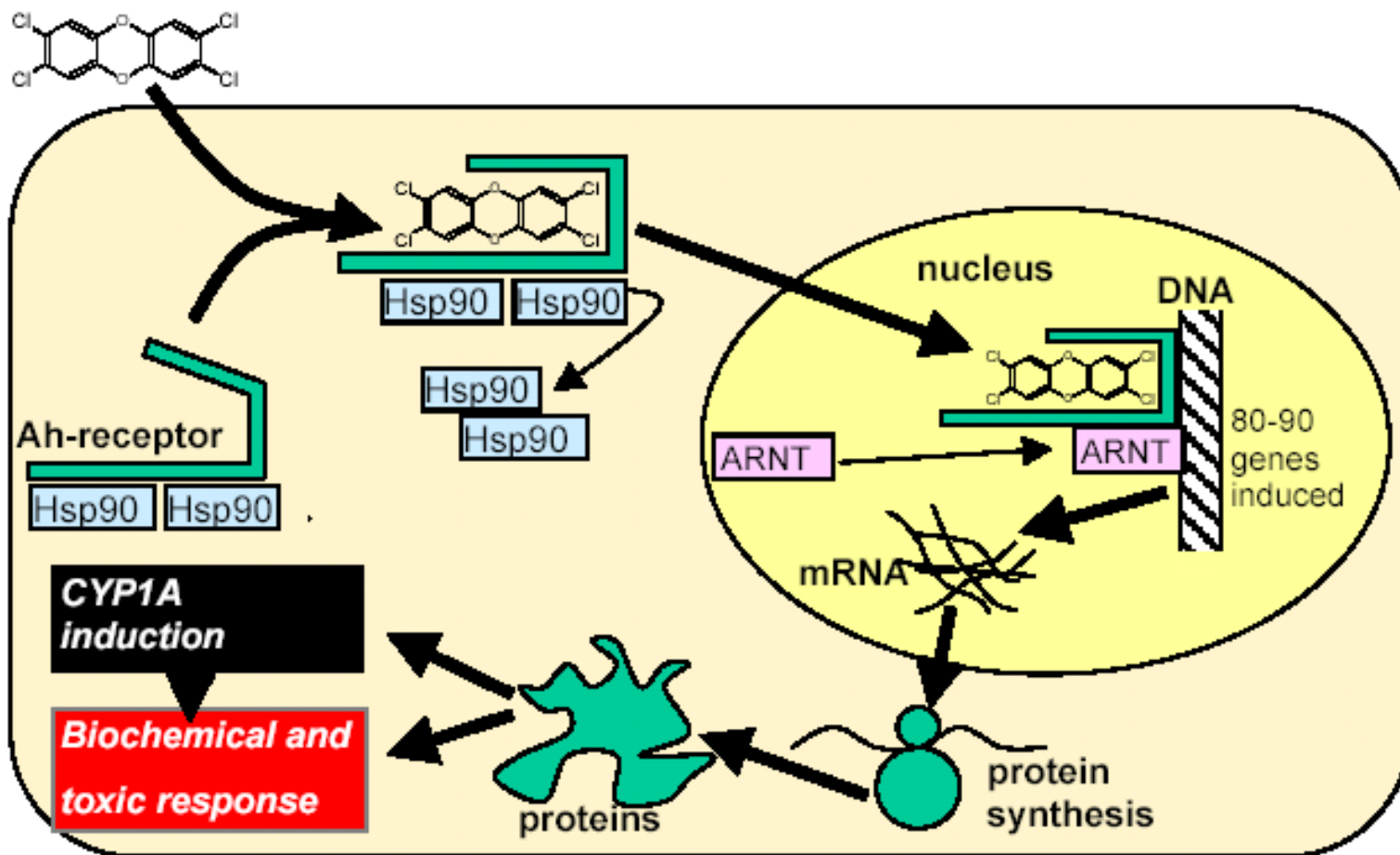
# TOXIKOKINETIKA

## - transformace -

### Indukce systému MFO a Fáze II:

- enzymy MFO **jsou indukovatelné** řadou (lipofilních/toxických) látek
  - organochlorové látky, PCDDs/Fs, PAHs, PCBs ...
- enzymy Fáze II **jsou indukovatelné**
  - zvýšeným výskytem substrátů (z I. Fáze detoxifikace)
  - reaktivních toxikantů v buňkách
- Dlouhodobé expozice subletálními dávkám
  - indukce detoxikačních enzymů
  - **tolerance** organismu k toxikantu (**fyziologická adaptace**)
    - => příliš dlouhé působení: energetické vyčerpání





**Figure 5.** The mechanism of CYP1A induction mediated through the aryl hydrocarbon receptor (AhR). (Figure by M. Engwall).



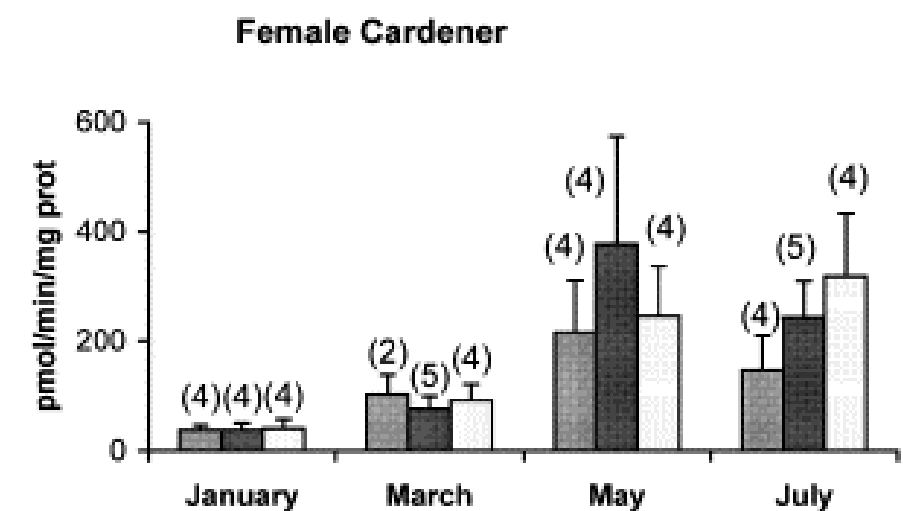
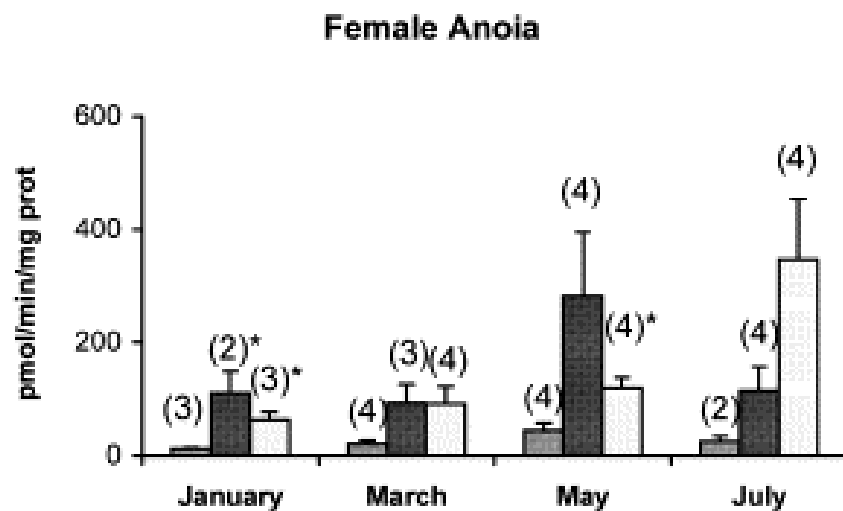
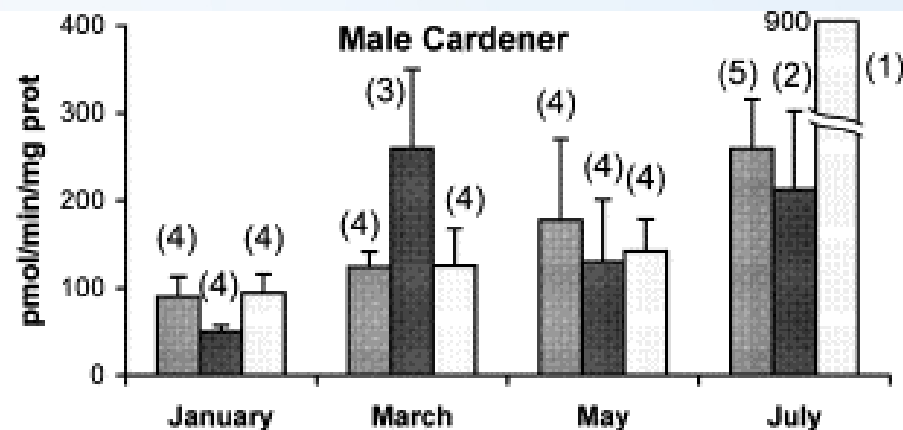
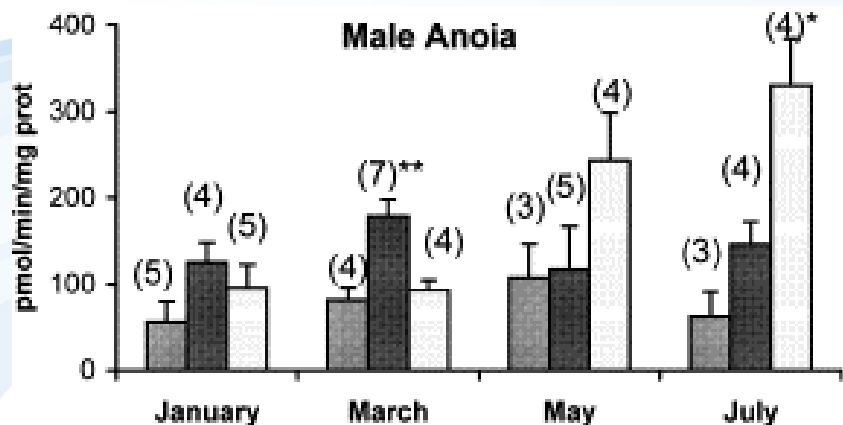
# TOXIKOKINETIKA

## - transformace -

### Indukce detoxikačních enzymů = biomarker expozice

- z aktivity detoxikačních enzymů lze usuzovat na předchozí expozici cizorodými látkami = biomarkery
  - Často nárůst oproti základním aktivitám až 100+ krát
- Velký význam **indukce CYP1A (cytochromy P450 1A1)**
  - Vazba toxikantů a aktivace **AhR (aryl hydrocarbon receptor)**
  - spuštění transkripce a translace nových detoxikačních enzymů CYP450
- měření aktivních CYP450 – tzv. metoda EROD
  - *ethoxyresorufin-O-deethylaza*
  - zvýšené aktivity - korelace s organickým (+chlor) znečištěním
- indukce dalších enzymů CYPs
  - stanovení MROD, BROD (různé substráty v enzymové reakci „methoxy-“, „butoxy“ )





■ (A1) 5 km upstr. ■ (A2) 23 km downstr. □ (A3) 27 km downstr.

■ (C1) 1,5 km upstr. ■ (C2) 4 km downstr. □ (C3) 8 km downstr.

## Změny v EROD aktivitě kaprů (samců vs. samic) u dvou řek (Anioia, Cardener)



# TOXIKOKINETIKA

## - transformace -

### Indukce detoxikačních enzymů u rostlin:

- oxidace : peroxidáza, 4-hydroxyláza
- ochrana před oxidací (**superoxiddismutáza, kataláza ...**)
- indukce - zejména herbicidy

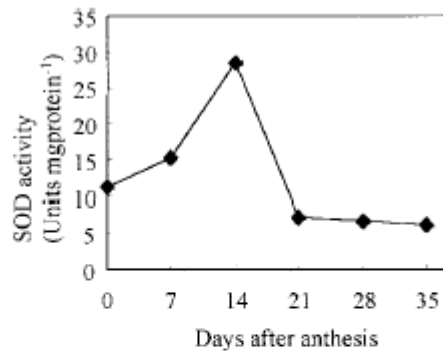


FIG. 1. Effect of monocarpic senescence on the total SOD activity expressed as units mg protein<sup>-1</sup> in the wheat cv. Kundan. Vertical bars indicate SE ( $n = 3$ ). In some cases error bars are smaller than the symbols.

bated for 20 min. at 25°C in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, containing either 3 mM KCN or 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cu/Zn SODs are inhibited by KCN and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe-SODs are resistant to CN<sup>-</sup> but inactivated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and Mn-SODs are resistant to both inhibitors (18). The gels were scanned using a gel documentation system (Bio

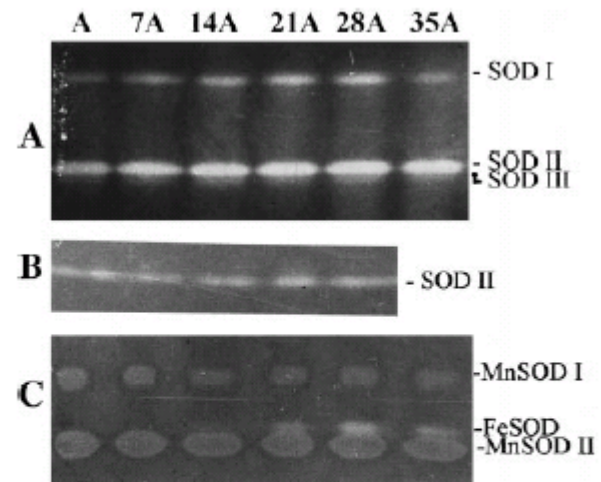


FIG. 2. Separation on nondenaturing activity gels of SOD forms from the leaves of wheat cv. Kundan during monocarpic senescence. In each case 50  $\mu$ g of protein per lane was loaded. Extracts are from crude samples (A), chloroplasts (B), and mitochondria (C).



# TOXIKOKINETIKA

## - transformace -

### Detoxikace → Aktivace

- po metabolizaci řady látek detoxikačními enzymy vznikají více toxické metabolity
- Obecně se užívá pojem „aktivace“ (nebo bioaktivace)
- pro určité látky poje „aktivace prokarcinogen → karcinogen“

### Například – **POLYCYKlickÉ AROMATICKÉ UHLOVODÍKY**

*Hydroxylace a epoxidace benzo[a]pyrenu (BaP)*

*→ reakce s guanosinovými zbytky v DNA*

*- mutace / aktivace onkogenů*

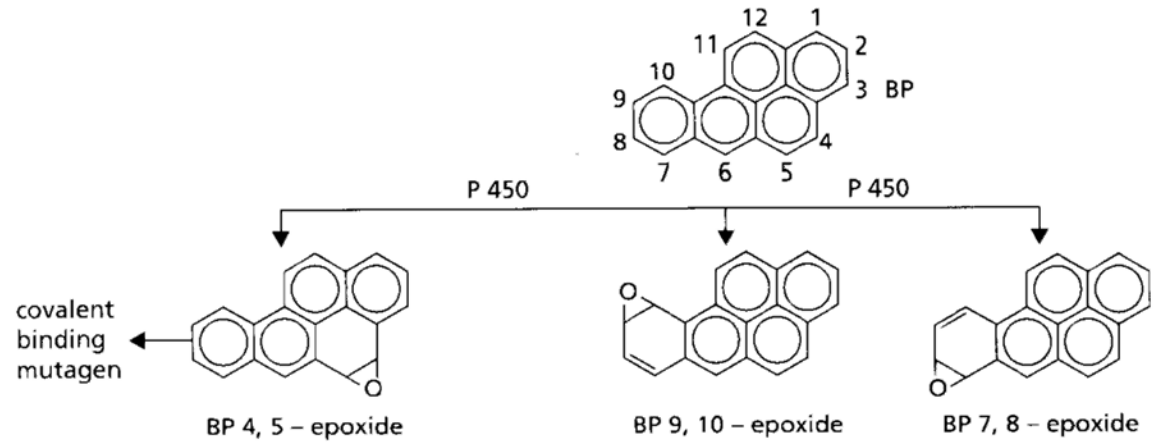
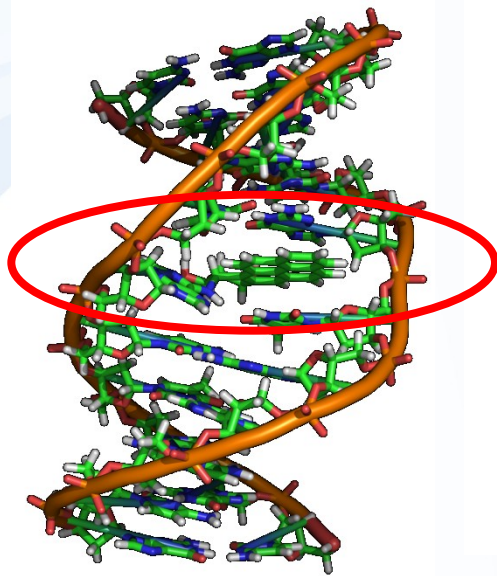
ALE BaP bez aktivace -> akutně netoxická látka

*(!) samotná indukce detoxikačních enzymů po expozici xenobiotiky může mít i další přímé i nepřímé škodlivé efekty, m.j. tzv. toxicita dioxinového typu (viz dále)*



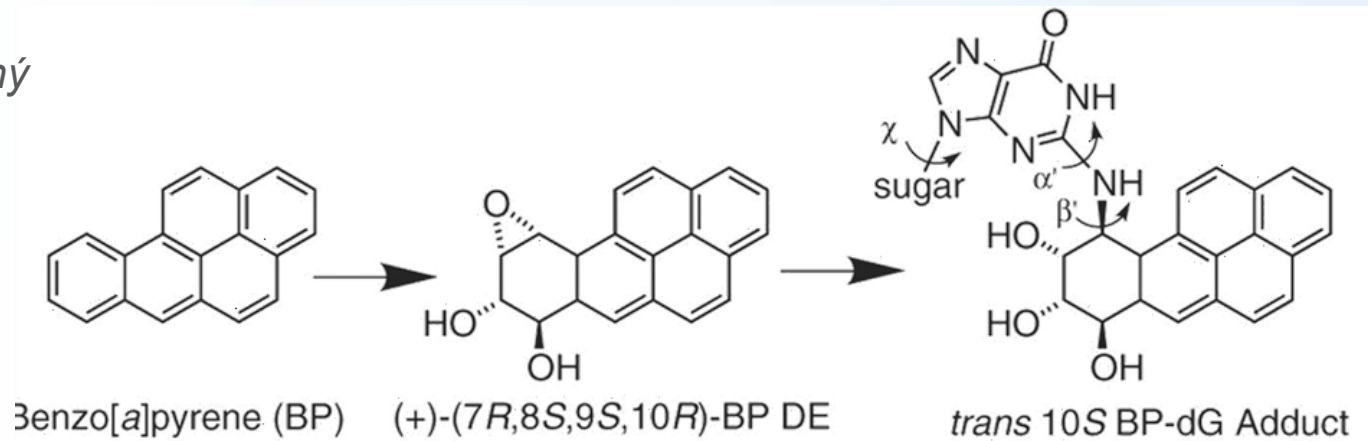


# TOXIKOKINETIKA – Bioaktivace Prokarcinogenu



**Fig. 4.2** The conversion by mixed function oxidase (MPO) action of the noncarcinogen polyaromatic hydrocarbon, benzo[a]pyrene, into benzo[a]pyrene diol epoxide which is a strong carcinogen.

*BaP interkalovaný  
v DNA*



# TOXIKOKINETIKA- ELIMINACE

## ULOŽENÍ (sequestration)

### Uložení xenobiotik v inertních tkáních

=> omezení cirkulace a snížení expozice

Živočichové - tuk (*organochlorové látky*), zuby, vlasy, rohy (*kovy*)  
- u bezobratlých popsáno ukládání nerozpustných zinkových granulí ve střevě pijavek

Rostliny - vakuoly, listy, kůra (-> opadání)

### Uvolnění ze zásob

PCBs a další organochlorové látky -> tuk: ALE: rychlá potřeba energie (*strádání, tvorba mléka ...*) uvolnění ze zásob

-> náhlá větší expozice a/nebo uvolňování v mléce



# TOXIKOKINETIKA- ELIMINACE

## ULOŽENÍ (sequestration)

### Metalothioneiny (MTs, MT-like proteins)

- cytoplasmatické nízkomolekulární proteiny (6-10 kD) bohaté na Cys
- známy u velké řady eukaryot
- vazba kovů : Zn, Cd, Hg ... => snížení expozice / toxicity
- dlouhý poločas života proteinů (~ 25 dní)
  
- původní biologická funkce -  
? snad regulace dostupnosti esenciálních kovů (*např. Zn*) ?

### INDUKCE MTs

expozice kovy

jiný méně specifický stres - hypoxie, změny teploty ...

- *Indukce MTs - další příklad BIOMARKER EXPOZICE*



## Indukce MTs (příklad – expozice ryb arsenem)

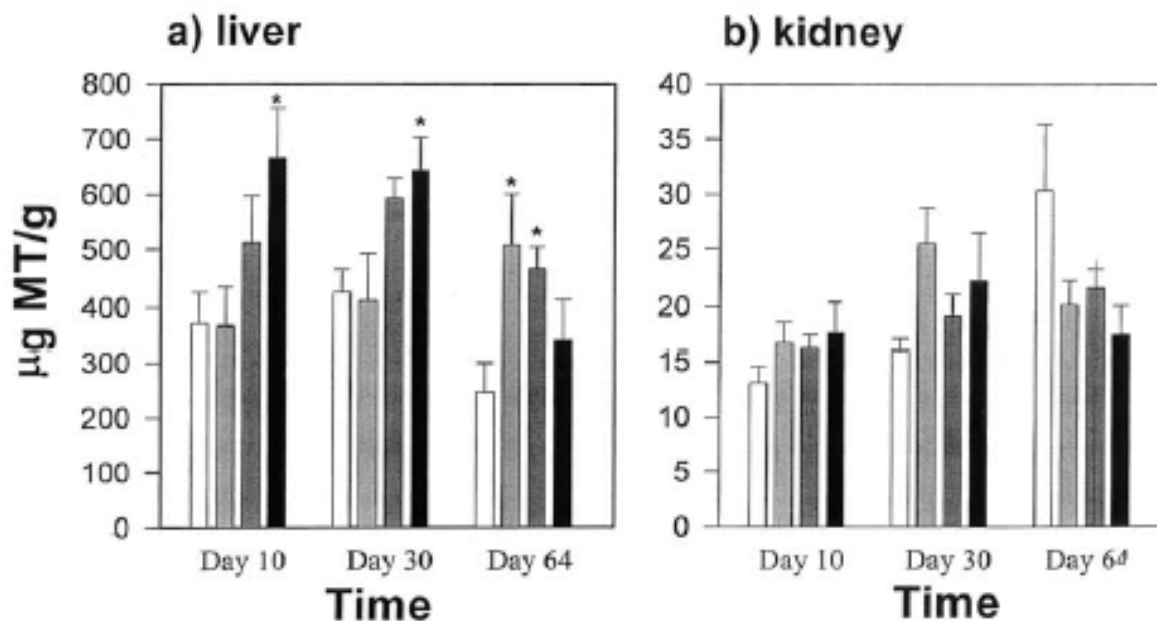
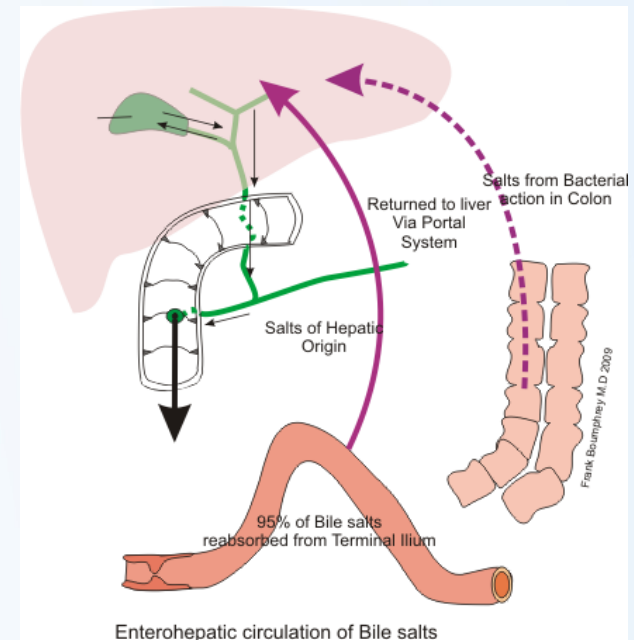


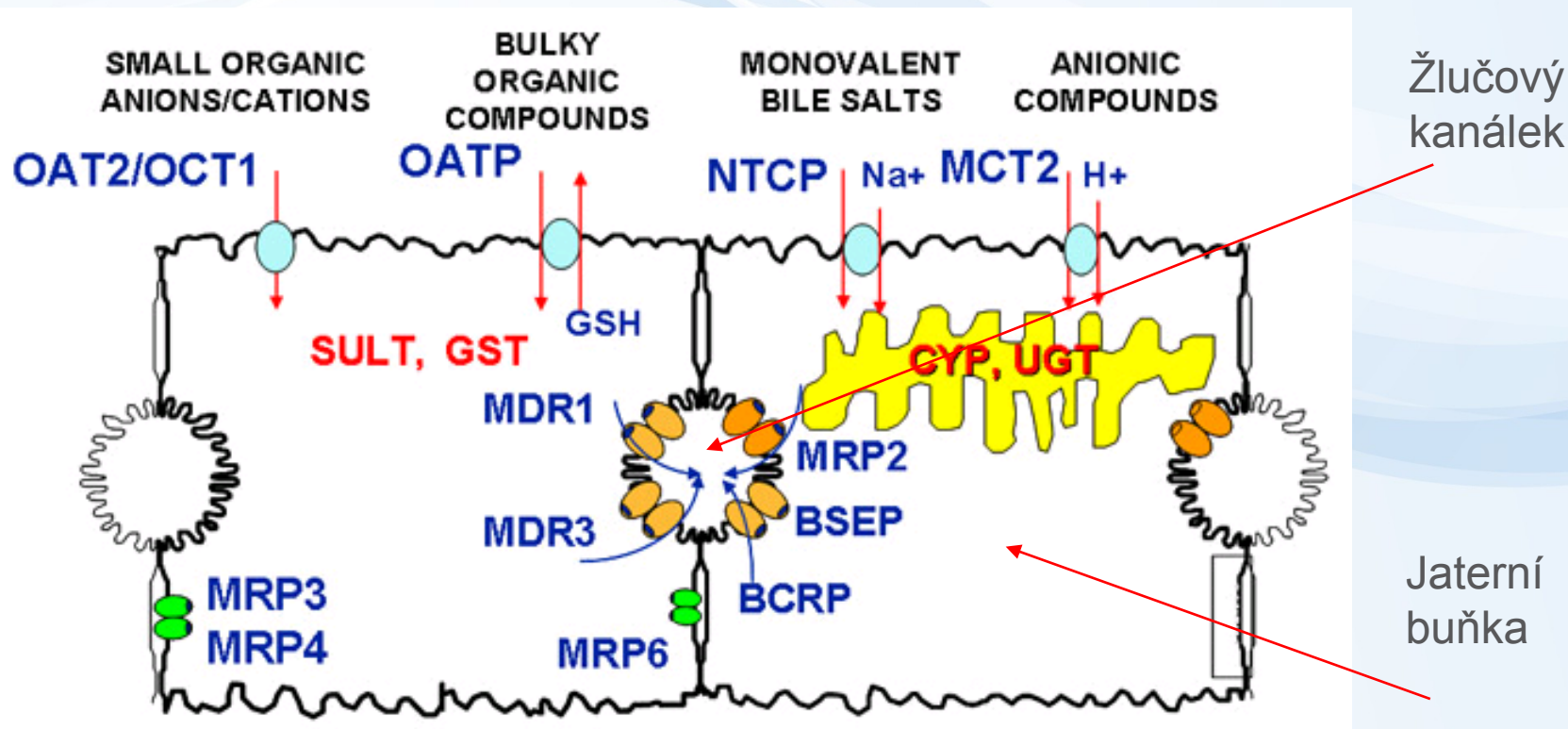
Fig. 2. Metallothionein (MT) concentrations in the (a) livers and (b) kidneys of lake whitefish fed a control diet and three As contaminated diets for 10, 30, and 64 days. Data are expressed as mean ( $\pm$  S.E.). Asterisk denotes mean is significantly different from the control at that duration ( $P < 0.05$ ). See Fig. 1 for an explanation of histogram shading.

# Eliminace – transport metabolitů přes membrány („Fáze III detoxikace“)

- Membránové transportéry Fáze III
  - **ATP-Binding Cassette transporters** (ABC transporters)
  - Velká superrodina (or prokaryot po lidi)
  - Transmembránové proteiny – exkrece různých látek z buňky
    - **Metabolity po detoxifikaci (GS-, UDG-konjugáty apod)**  
→ žluč a vyloučení stolicí
    - Léčiva, lipidy, steroly



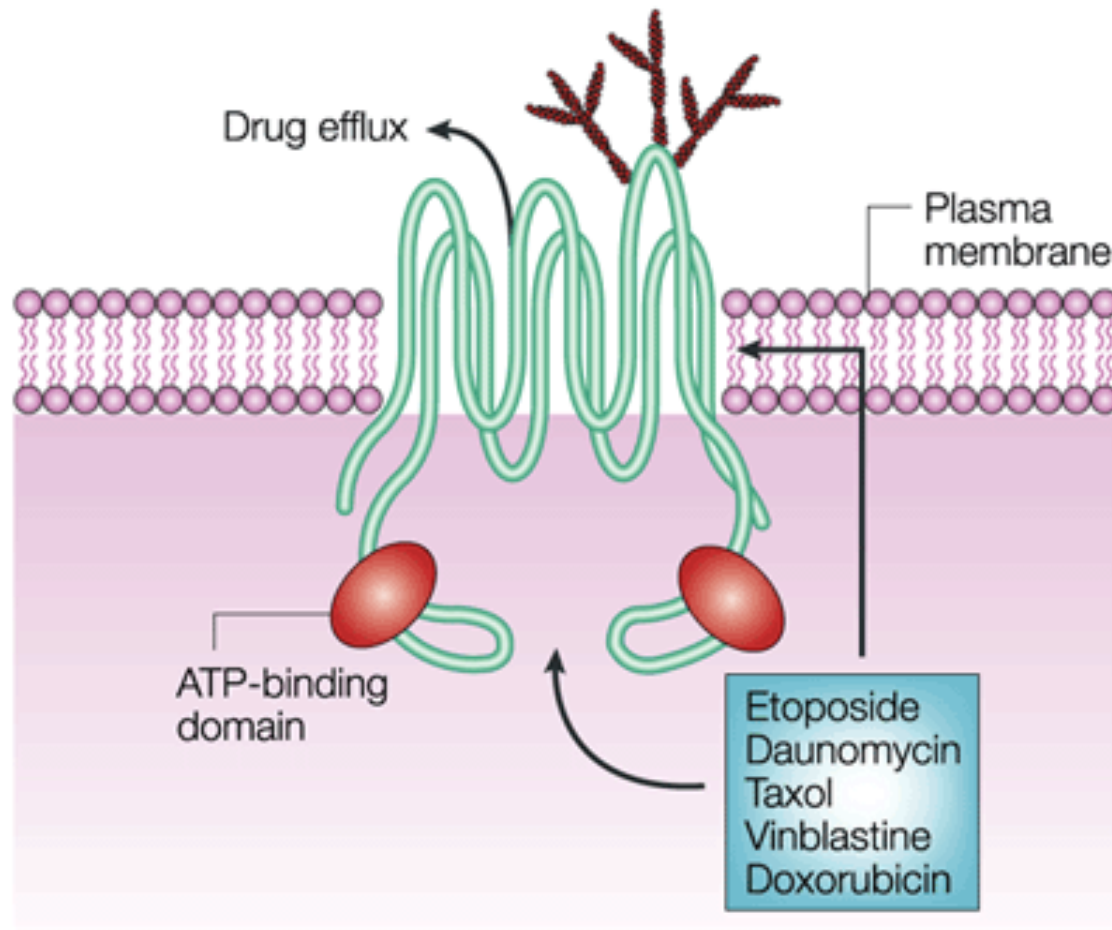
# ABC transportery - příklady



- **MRP (MDR)** - multidrug resistance-associated protein family
- **OATP** - Organic Anion Transporting Polypeptide
- **P-glycoprotein**

# ABC

- jeden z mechanismů rezistence nádorů na cytostatika -



# ABC

- jeden z mechanismů rezistence bakterií na antibiotika -

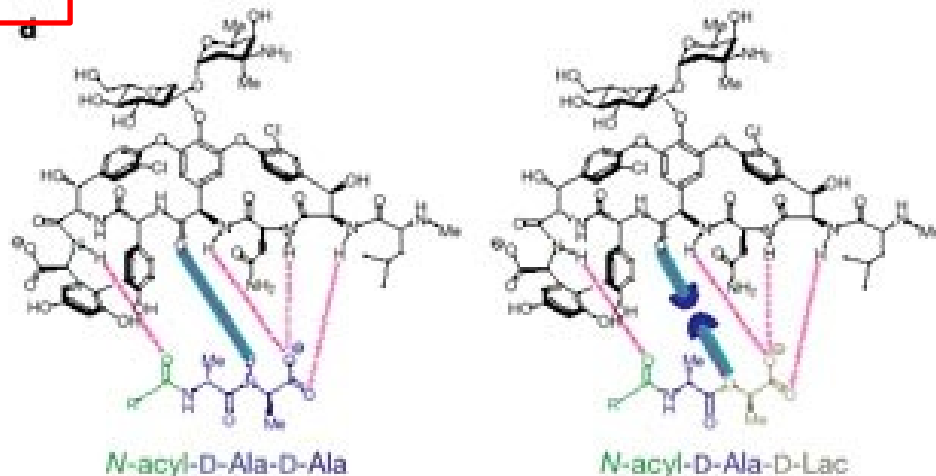
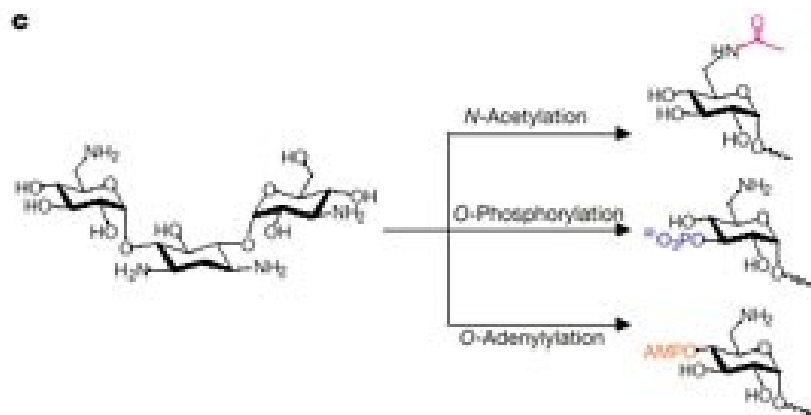
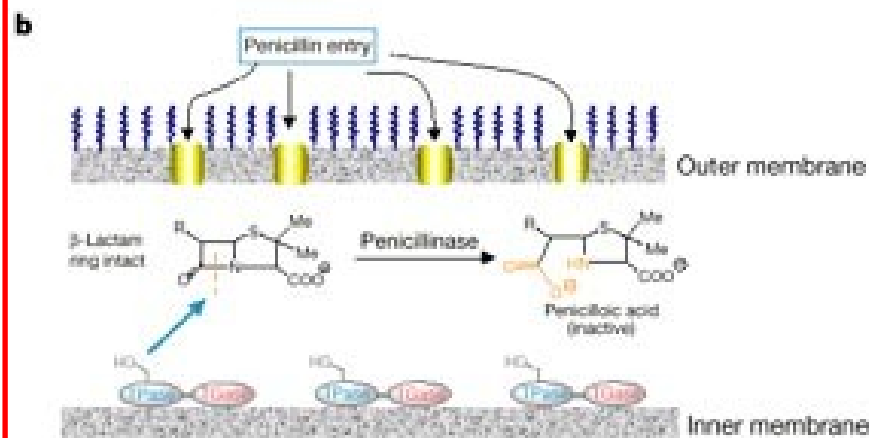
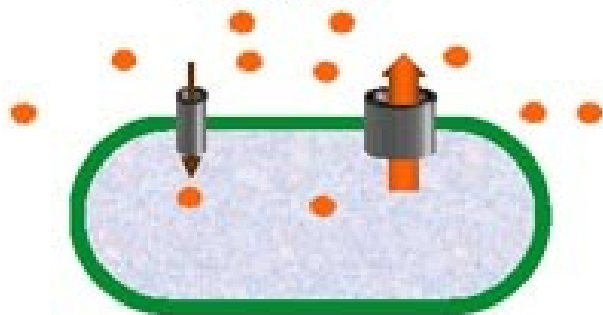
**a**

**Antibiotic**

- Erythromycins
- Tetracyclines

**Resistance mechanism**

Bacteria manufacture protein pumps that pump the antibiotic out so that it does not accumulate to a high enough internal concentration to block protein synthesis





# EXKRECE - VYLUČOVÁNÍ

Míra eliminace xenobiotika - míra možné toxicity  
delší expozice / větší nebezpečí efektů

## SUCHOZEMŠTÍ ŽIVOČICHOVÉ (obratlovci)

- většina rozpustných neplynných a nevolatilních látek - moč  
*glomerulus - kličky: filtrace / aktivní transcelulární exkrece /  
transcelulární difuze / i resorpce (!)*
- významné vylučování také - žluč  
*aktivní transport konjugátů při vylučování / ve střevě další  
transformace mikroflorou / event. resorpce*
- plynné látky (NH<sub>3</sub>) a volatilní látky (alkoholy) - plíce/dýchání



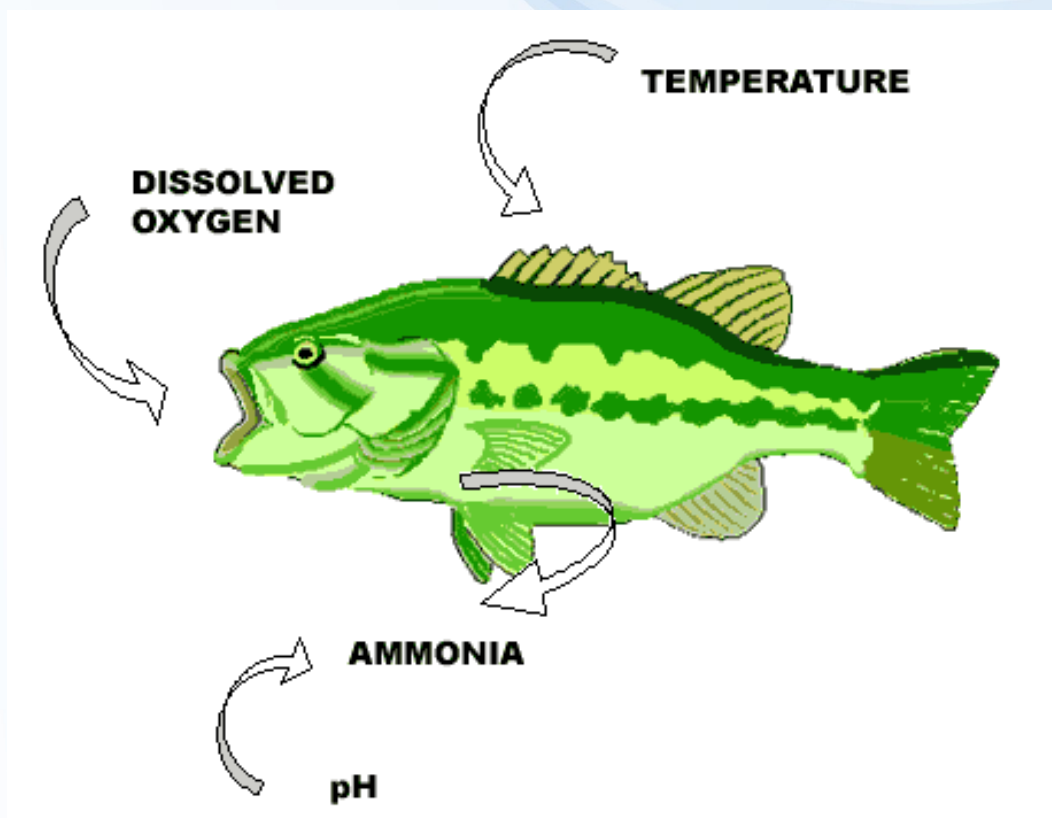
# EXKRECE - VYLUČOVÁNÍ

## VODNÍ ŽIVOČICHOVÉ

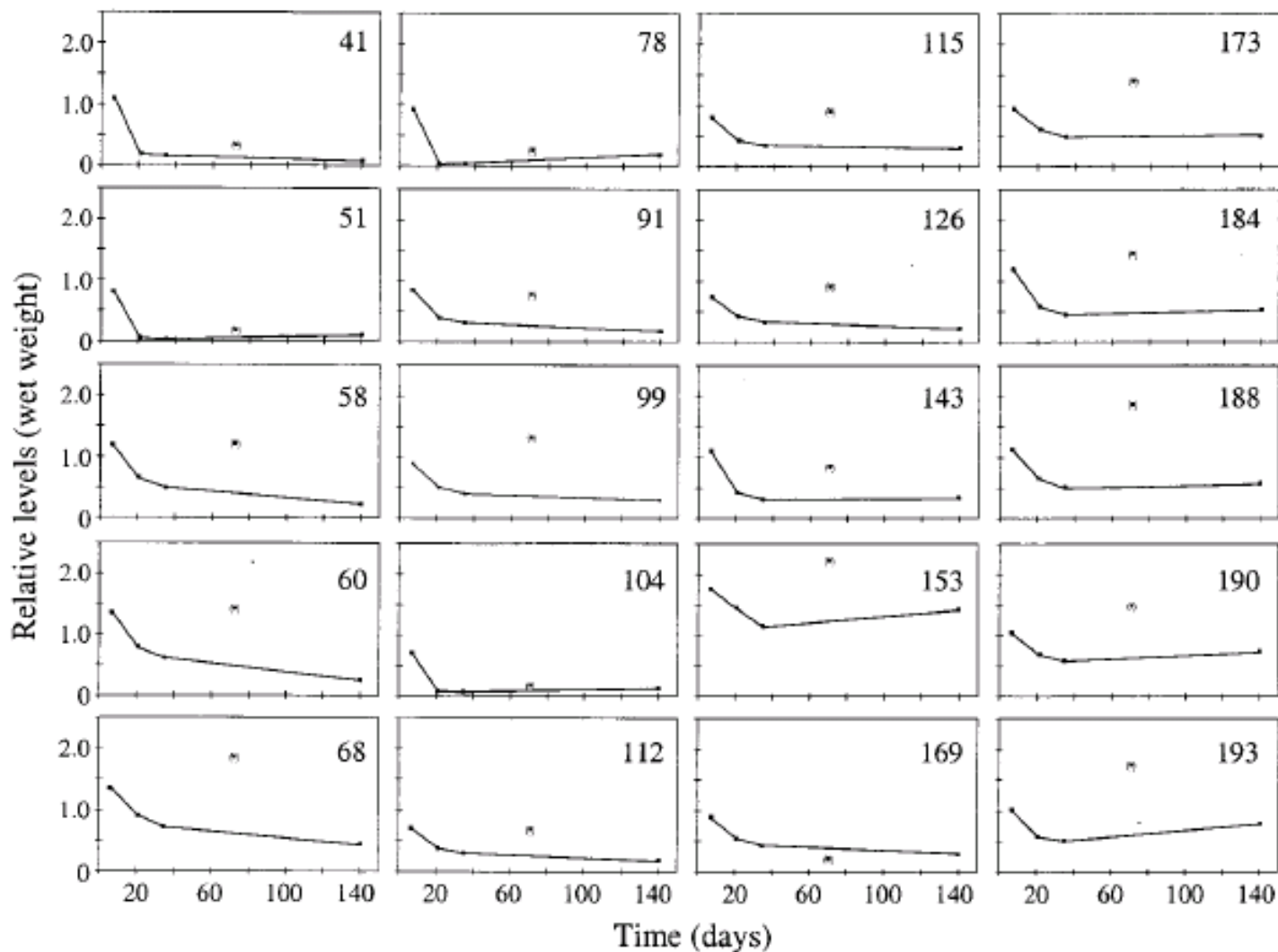
- hlavním vylučovacím orgánem žábry ( $\text{NH}_3$ ) + žluč (ledviny méně)

## ROSTLINY

- ukládání ve vakuolách, vylučování plyných toxikantů



# Př: EXKRECE různých kongenerů PCBs po injekci



**Fig. 4.** Relative levels of the 20 PCBs retained in zebrafish after IP injection. Fish were sampled after 7, 21, 35, 70, and 140 days. The level of each congener was calculated on a wet-weight basis relative to the level in the injected peanut oil mixture, respectively, and multiplied by 1,000

## Shrnutí - otázky

U kterého z organismů bude rychleji probíhat biotransformace (detoxifikace) látek? U ryby nebo u člověka? Vysvětlete proč.

Jaké jsou hlavní procesy, které látka prodělává v organismu?

Jaké jsou hlavní metabolismy v organismu?

Které enzymy se podílí na biotransformacích látek?

Které jsou nejčastější chemické reakce při biotransformacích?

Jaké transformační produkty s největší pravděpodobností vzniknou v organismu, který bude exponován látkou benzen?

Co je to glutathion?

Co je to první a druhá fáze detoxifikace?

Znáte příklad látky, která je „bioaktivována“ v organismu?

V jaké podobě a jakým orgánem se vylučují toxické látky z ryb? z rostlin? z živočichů – obratlovců?

