

Základy Toxikologie

KBB/ZTOX



doc. Ing. Radim Vrzał, Ph.D.



Absorpce, Distribuce a Eliminace toxických činitelů AD(M)E



Toxikokinetika





Cíle:

- ✘ způsoby absorpce toxických látek
- ✘ procesy eliminace škodlivin
- ✘ časová závislost koncentrace toxických látek v těle a jejím matematickým zpracováním



Klíčové pojmy:

Aktivní transport, difuze, Distribuční objem, renální eliminace, enterohepatální oběh, AUC



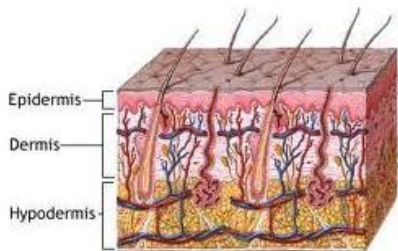


ABSORPCE

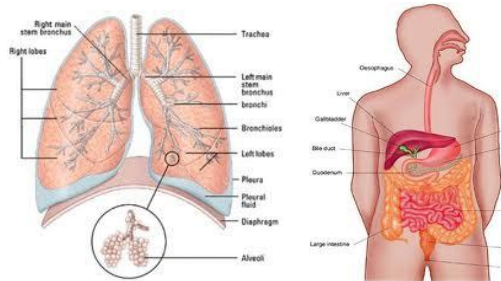
Expozice škodlivině (toxikantu) $\neq$ toxická odpověď (Hg – PerOs vs. Inhalace)
Lidské tělo = obranné mechanismy a membránové bariéry



Kůže – největší orgán
těla = fyzická bariéra
pro absorpci



Plíce, GIT – méně odporu
vůči absorpci než kůže



Plíce >> GIT >> Kůže

- důvod – tloušťka membrán a prokrvení
- vstup závisí na množství škodliviny a saturaci transportních procesů.



Co určuje rozsah **ABSORPCE** ?



Fyzikálně-chemické parametry sloučeniny:

- **molekulová hmotnost (Mw)**
- **ionizace (pKa)** - pH gradient přes membránu
- **rozdělovací koeficient** (voda/oktanol; log P)

Po absorpci - **2 způsoby** pohybu škodliviny :

- **cirkulací** krve na dlouhé vzdálenosti
- **difuzí** na krátké vzdálenosti

Dispozice = současné účinky distribuce a eliminace následující po absorpci

Škodliviny se mezi sebou liší – difúzními charakteristiky (schopností přestupu přes buněčnou membránu) → mechanismy přestupu !!!

Pohyb xenobiotik lze kvantifikovat → Farmako-/ **Toxikokinetika** – časová závislost škodliviny v organismu během procesů absorpce, distribuce a eliminace = **JAK se tělo vypořádá se škodlivinou** v rozdílných časových bodech (**distribuční objem, clearance, poločas eliminace**)

Určení mechanismu účinku (vazba na proteiny, aktivace receptorů, inhibice enzymů) → Farmako- / **Toxikodynamika** = **JAK sloučenina působí na tělo**





Buněčné Membrány

Lipidové dvojvrstvy – šířka 75 Å, složené z fosfolipidů a cholesterolu

Poměr lipidy proteiny se liší

- 5:1 pro myelin
- 1:5 mitochondrie

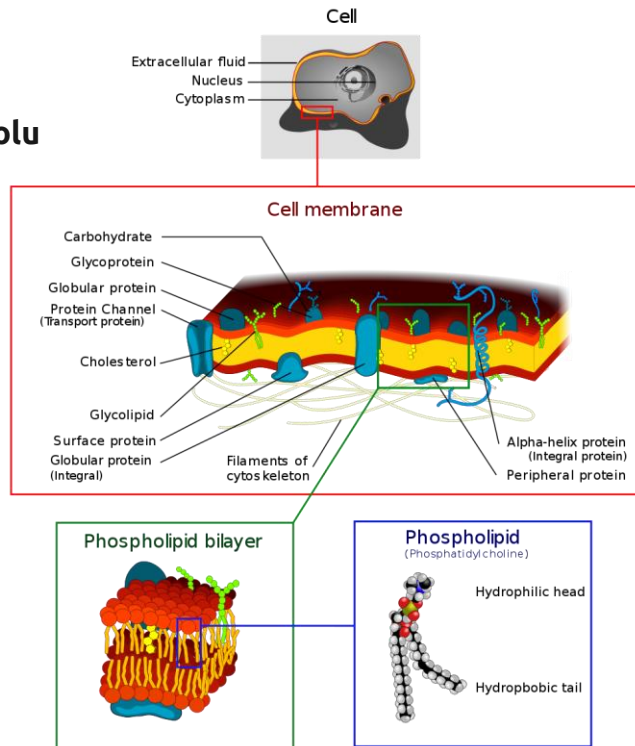
Nenasycené FA – tekutost membrány

Proteiny – receptory, kanály

Amfipatická podstata = bariéra pro ionizovatelné sloučeniny

Prostup xenobiotik

- pasivní difúze
- filtrace
- transport
- endocytóza





Pasivní difuze

Přestup se děje dle koncentračního gradientu (rozdíl koncentrací)= hnací síla

- Rozpustnost v membráně (P_c), pH
- Ionty obaleny hydratačním obalem → příliš velké, speciální transport

1. Fickův zákon:

$$\text{Rate of diffusion} = \frac{D \times S_a \times P_c}{d} (C_H - C_L)$$

D – difuzní koeficient (závisí na M_w , konformaci)

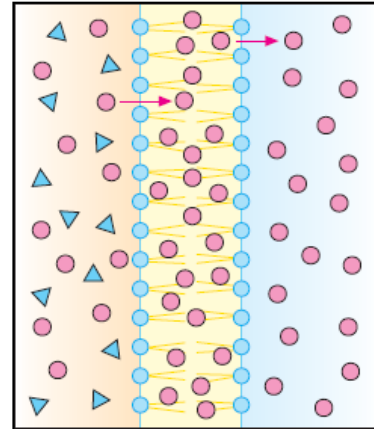
S_a – plocha oblasti membrány

P_c – rozdělovací koeficient (relativní rozpustnost ve vodě a tuku)

d – tloušťka membrány

C_H, C_L – koncentrace na obou stranách (větší, menší)

$D \times P_c/d$ – koeficient propustnosti (jednotka rychlosti)



Pasivní difuze

Hnací síla = rozdíl koncentrací –
kinetika **1.řádu** – závisí na rychlostní
konstantě a gradientu koncentrace –
nejdůležitější faktor určující rychlost
přestupu

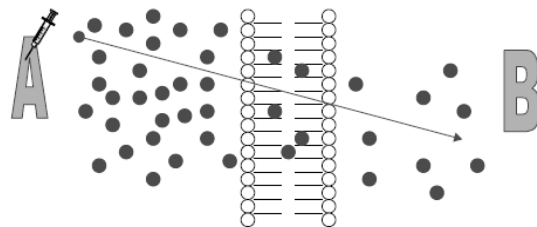
Rychlost pohybu škodliviny A =
změna množství (koncentrace)
(dA) za jednotku času (dt)

$$\frac{dA}{dt} = KA^n \rightarrow \frac{dA}{dt} = KA^1 = KA$$

$$\frac{dA}{dt} = \frac{D \cdot S_a \cdot P_c (A_1 - A_2)}{d} \rightarrow \frac{dA}{dt} = \left(\frac{D \cdot S_a \cdot P_c}{d} \right) A$$

K – rychlostní konstanta – představuje frakci, která je
přenesena za jednotku času – nezávislá na dávce

$$K = \frac{0.693}{t_{0.5}}$$



Místo rychlé
eliminace,
např. krev





Fyzikálně-chemické vlastnosti relevantní pro difuzi

Stupeň ionizace - mnohá xenobiotika jsou slabé kyseliny či zásady → směs ionizované/neionizované formy

Stupeň ionizace udává $pK_a = pH$, při kterém je 50% látky ionizováno (fyzikálně-chemická charakteristika)

For weak acids : $pK_a - pH = \log(\text{Nonionized form} / \text{Ionized form})$

For weak bases : $pK_a - pH = \log(\text{Ionized form} / \text{Nonionized form})$

Henderson-Hasselbachova rovnice

$RCOOH = RCOO^- + H^+$ - neionizovaná forma (žaludek) / ionizovaná forma (**střevo**)

$RNH_2 + H^+ = RNH_3^+$ - neionizovaná forma (**střevo**) / ionizovaná forma (žaludek)



Fyzikálně-chemické vlastnosti relevantní pro difuzi

Rozdělovací koeficient – míra schopnosti sloučeniny se rozdělit mezi dvě nemísitelné fáze – vodu a oktanol (organická fáze nejlépe napodobující fosfolipidy).

$$P = \frac{V_w}{V_o} \left[\frac{(C_{wo} - C_w)}{C_w} \right]$$

V_w, V_o – objemy vodné/organické fáze
 C_{wo}, C_w – koncentrace látky ve vodné fázi před a po třepání

Čím **nižší P** → tím **vyšší rozpustnost ve vodě** →
horší přestup membránou a nižší dostupnost



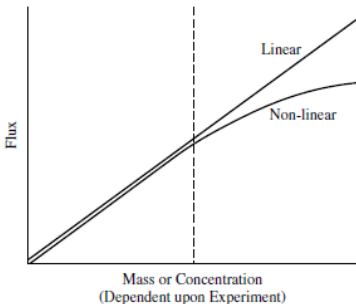
Transport pomocí přenašečů (pasivně usnadněná difúze)

Pro sloučeniny s nedostatkem rozpustnosti v lipidech
Pohyb dle **koncentračního gradientu bez vstupu energie**
(Glukosa do Erytrocytů)

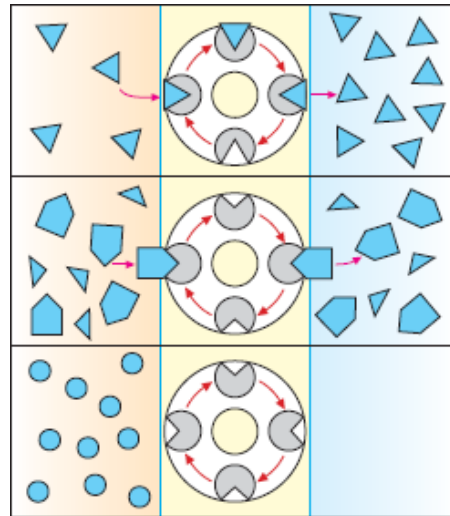
Transport nezávisí na množství látky ale na
kapacitě přenašeče → rychlost bude konstantní

Kinetika nultého řádu:

$$\frac{dX}{dt} = KX^0 = K_0 \quad K - \text{jednotka hmoty/čas}$$



Při saturaci je
rychlost konstantní.
Při subsaturaci –
kinetika 1.řádu



Membránový protein (Transportér)

- specifita
- kompetitivní inhibice
- satureovatelný proces
- kinetika dle modelu Michaelis-Mentenové

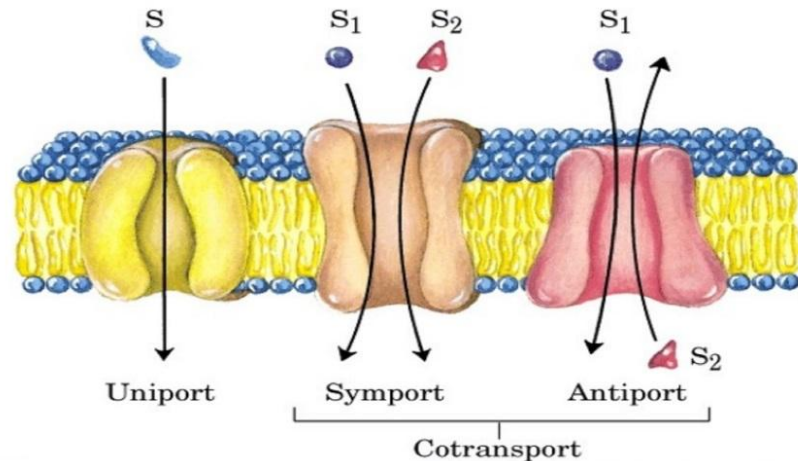
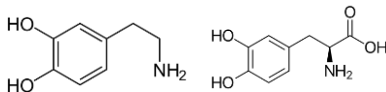


Aktivní transport (Aktivně usnadněná difuze)

- transport proti koncentračnímu gradientu
- často spojen s energií produkujícím enzymem (ATPasa) či transportem jiných molekul (Na^+ , Cl^-) (symport, antiport) (např. nervové buňky, ledvinné tubuly, hepatocyty)

Podobnosti ve struktuře
a následek pro transport :

- Pyrimidiny vs. Fluorouracil (cytotoxické léčivo)
- Phe vs. Levodopa (Parkinson)



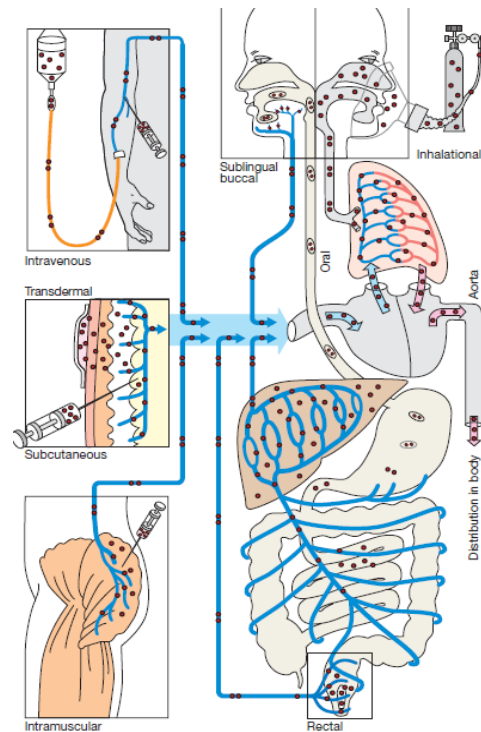


Cesty vstupu xenobiotika do organismu

Primární cesty vstupu – GIT, kožní, respirační

**Další možnosti – intraperitoneální,
intramuskulární, subkutánní**

**Potřeba obejít absorpční fázi –
intravenosní (IV), intraarteriální**





Rozsah absorpce - jak moc škodliviny penetruje membránami a dostane se do krve - určováno pro orální a kožní cestu vstupu

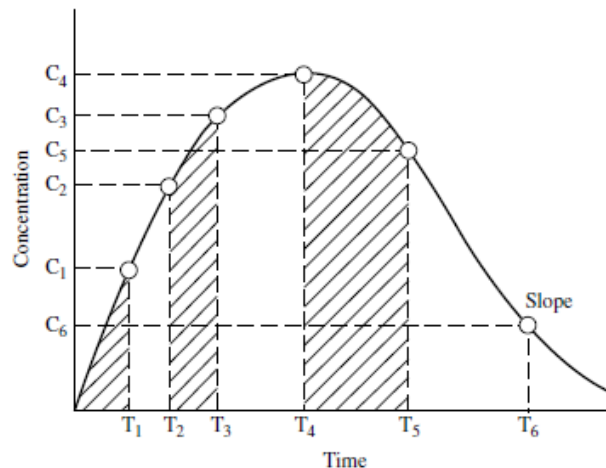
AUC – koncentračně časový profil (orální / kožní cesta vstupu) je porovnávána s intravenosní (IV) cestou vstupu

$$F = \frac{AUC_{\text{route}} \times \text{Dose}_{\text{IV}}}{AUC_{\text{IV}} \times \text{Dose}_{\text{route}}}$$

F – biodostupnost -
rozdílné dávky

$$F = \frac{(AUC)_{\text{route}}}{(AUC)_{\text{IV}}}$$

F – **biodostupnost** -
stejně dávky





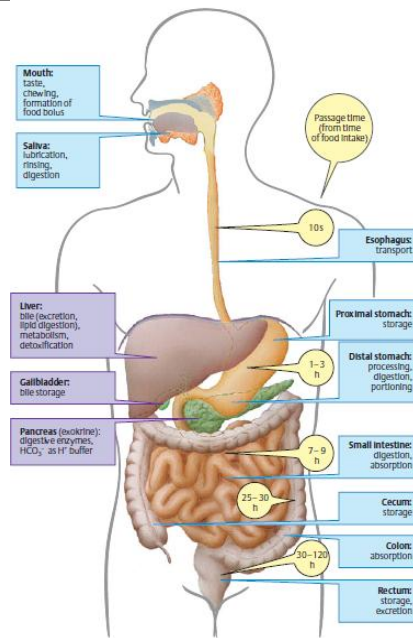
Gastrointestinální absorpce

- Dutá trubice chráněná mukózou = snadný vstup škodlivin

- Sekrece ze slzných, slinných žláz a nosních cest může vstoupit do GIT skrz ústní dutinu

- Strukturně podobné škodliviny = zvýšený vstup (Co vs. Fe; bromouracil vs. pyrimidin)

- Biotransformace ovlivňuje biodostupnost



- **Většina absorpce v střevě (pH 6) a žaludku (pH 1-3) – pasivní difúzí**

- **Nutrienty** (Glu, AA, léky podobající se nutrientům) – aktivní transport

- **Lipidům podobné substance** (žlučové kyseliny) → micely

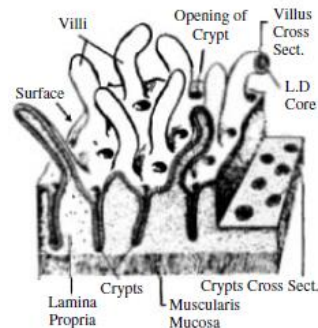
- **Silné base či kyseliny** – nejsou absorbovány střevem (succinylcholin)

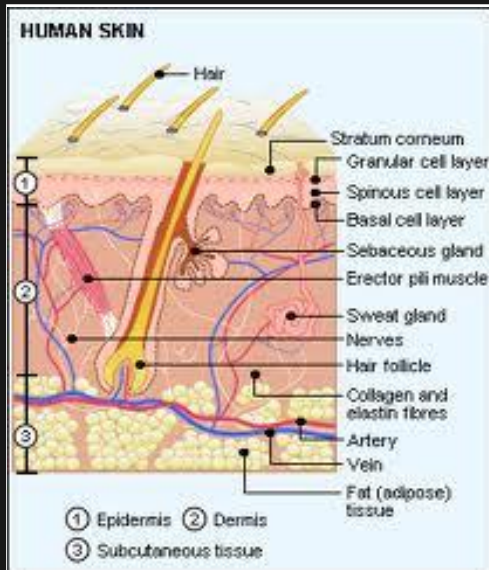
- **Velké částice** (bakteriální částice, azo barviva) - endocytosa

- **Motilita vs. absorpce.**

- **Zvýšený tok krve po jídle vs. hypovolemie** – např. propranol

Enterohepatální cirkulace – reabsorpce škodliviny v tenkém střevě





Dermální absorpce

Kůže – 3 mm (3 vrstvy)

Epidermis – 0.1 – 0.8 mm – maximum resistance;

Dermis

Hypodermis (Podkožní vrstva tuku)

Vnější vrstva – **stratum corneum** (SC) – 80%

odporu k absorpci vodných roztoků

Proliferace a diferenciacie od vnitrku k vnějšku
Keratinizované buňky – hydrofilní

Koží biotransformace – epidermis (2-6 % jater), SC

Metabolismus ovlivňuje absorpci:

- proléčiva (lipidové estery)
- additiva podáváná s léčivý či v kombinaci s pesticidy – mohou měnit SC - surfaktanty, organická rozpouštědla → zrychlení absorpce – změna lipofility membrán
(ether/acetone > DMSO > ethanol > water)

Určení absorpce škodliviny:

- extrapolace z hlodavců není přípustná !!! (tloušťka, ochlupení, krevní zásobení) - vhodnější model – prase

- *In vitro* a *Ex vivo* metody

- **In vivo** – „zlatý standard“ - ale....etika, práva zvířat, cena



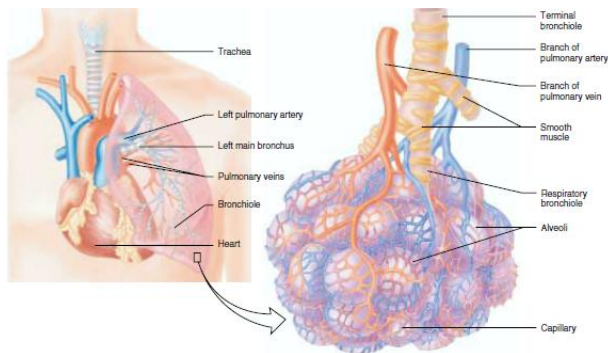
Plíce – chráněny anatomicky – nos, ústa, hrtan, průdušnice, průduška
→ **redukce toxicit** – zejména částic

Místo absorpce = membrána průdušinek

- **tloušťka - 0.4-1.5 mm** – basální membrána kapilárně endoteliálních buněk (100-200 nm kůže, cca 30 nm GIT)
- povrch cca 50-krát větší než kůže

Plyny se musí rozpustit → dávky jsou mírou **parciálního tlaku**

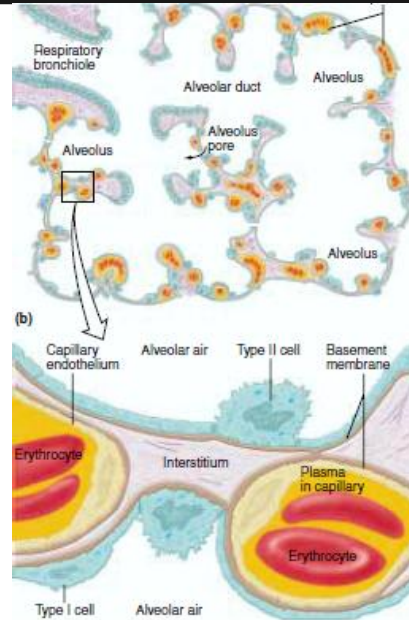
Prostup plicemi



Složení průdušinek

- **pneumocyty typ I** (40%) – výměna plynů
- **pneumocyty typ II** (60%) – sekrece plicního surfaktantu
- **Makrofágy** (90% alveolárního prostoru)

- zbytek vzduchu v plicích i po maximálním výdechu = reziduální objem





„Vzdušné jedy“

- **Plyny** – platí zákony pro plyny, rozpuštnost v krvi – snaha dosáhnout parciálního tlaku
- **Aerosoly** – pevné částice, neplatí zákony pro plyny

Plyny – např. Inhalační anestetika

Agent	Coefficient
Methoxyflurane	13.0–15.0
Halothane	2.3–2.5
Isoflurane	1.4
NO	0.5



Koeficient rozpustnosti plynu v krvi – čím větší, tím větší rozpustnost v krvi

Rozpuštný, vyžaduje delší čas pro dosažení parciálního tlaku;
Detoxifikace zabere delší dobu

Aerosoly

- **filtrovány skrz horní cesty dýchací** – sliznice zachycuje částice a přenáší je do jícnu a následně do GIT
- projdou jen **< 10-20 μm** ; částice < 0.5 μm ~ vlastnosti plynů
- Vysoká účinnost filtrace – 100g v plicích uhelného prachu horníků Vs. 6000g inhalovaných za život
- Místo usazování částic závisí na – velikosti, hustotě, tvaru, stylu dýchání



Principy usazování:

- elektrostatická precipitace
- sedimentace
- difúze
- zachycení



DISTRIBUCE

= Přesun látky z místa absorpce do cílové tkáně/celého organismu = reversibilní pohyb škodliviny mezi krví a tkáněmi

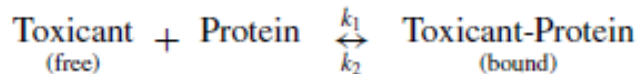
Vlivy na distribuci:

- **promývání tkáně (perfuse)** – mozek, játra vs tuková tkáň
- **vazba na proteiny**
- **exkrece, biotransformace**
- fyz.chemické parametry – **pKa, rozpustnost v tucích, Mw**
- z krve do tkání – **většinou difuzí po gradientu**
- **Akumulace v tkáních**, pro které je vysoká afinita – k dosažení efektu v místě účinku nutná vyšší koncentrace
- „**Výhoda**“ je-li látkou **škodlivina** (Tetracyklinová antibiotika – afinita pro místa s vysokým obsahem Ca^{2+} ; Pb = afinita pro kosti; Antimalarikum quinacrine se akumuluje v játrech; PCB – akumulace v tucích)



Limity distribuce

- **Anatomické bariéry** – mozkomíšní bariéra (BBB)
- **Vazba na protein** – snížení aktivní koncentrace



k_1, k_2 – asociace / disociace

Proteiny vážící xenobiotika:

albumin, α_1 -acid glykoprotein, lipoproteiny (HDL, VLDL, LDL), globuliny

Množství navázané na protein = **afinita, počet vazebných míst, koncentrace škodliviny**

Vazba na protein:

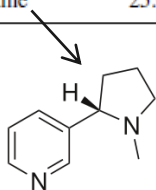
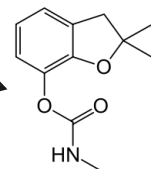
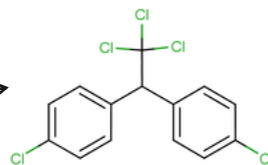
- nebrání dosažení místa účinku, jen snižuje rychlost s jakou je účinku dosaženo.
- Kovalentní – uplatnění v případech karcinogenních metabolitů
- Nekovalentní – snazší disociace



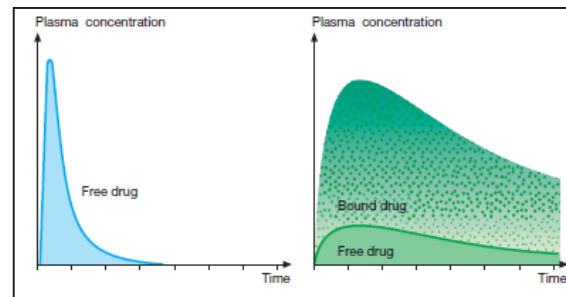
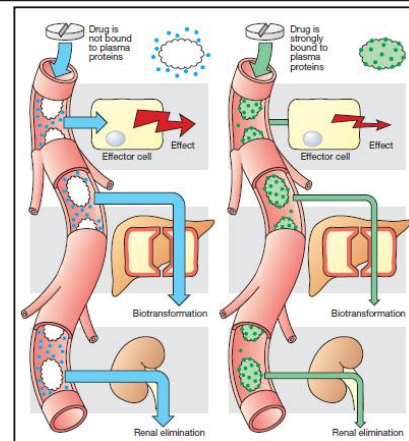
Limity distribuce

Ionizovatelnost a rozpustnost v tucích ovlivňuje vazbu na proteiny.

Insecticide	Percent Bound	Percent Distribution of Bound Insecticide		
		Albumin	LDL	HDL
DDT	99.9	35	35	30
(Dieldrin)	99.9	12	50	38
Lindane	98.0	37	38	25
Parathion	98.7	67	21	12
Diazinon	96.6	55	31	14
Carbaryl	97.4	99	<1	<1
Carbofuran	73.6	97	1	2
Aldicarb	30.0	94	2	4
Nicotine	25.0	94	2	4



Vazba na proteiny = Delší eliminace → delší účinek škodliviny





Matematika distribuce

Distribuční objem (V_d) = objem kapaliny potřebný k tomu, aby bylo dosaženo, při daném množství (A) škodliviny, stejné koncentrace (C_p) ve všech částech těla jako v plasmě

$$V_d = \frac{A}{C_p}$$

Malý V_d = vše v plasmě, difuze membránami je omezena

Velký V_d = větší i než teoretický objem kapalin v těle - **pro látky rozpustné v lipidech**, snadno prostupující membránou (EtOH, DIAzepam), **vazba na tkáňové proteiny**



$$\begin{aligned} \text{Amount in body} &= \text{Amount in plasma} + \text{Amount outside plasma} \\ V_d \times C &= V_p \times C + V_{TW} \times C_{TW} \end{aligned}$$

$$V_d = V_p + V_{TW} \times \frac{C_{TW}}{C}$$

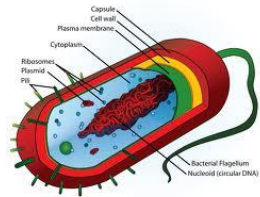
Frakce vázaná
do tkáně

V_d – distribuční objem

V_p – objem plasmy

V_{TW} – domnělý objem tkáně

C_{TW} – koncentrace v tkáni

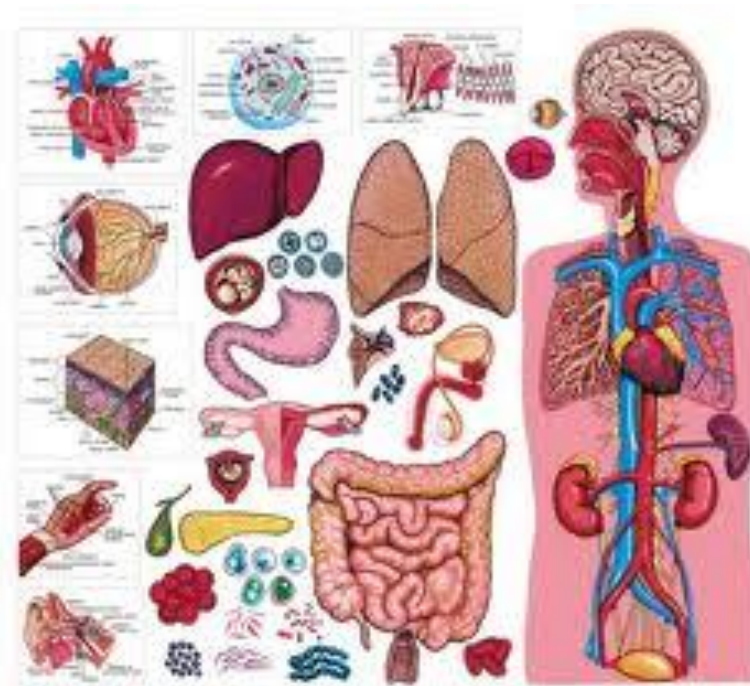


Eliminace

- **kritická pro přežití** -
Jednobuněčné
organismy – difúze

Mnohobuněčné organismy – zvýšená
komplexnost → účinnost difúze byla
kompromitována několika následky evoluce

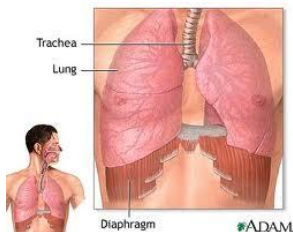
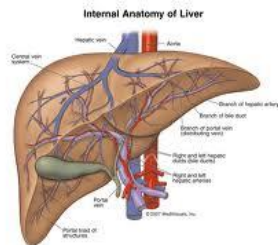
1. nárůst velikosti
2. zmenšení povrchu těla vůči hmotnosti
3. kompartmentalizace těl
4. nárůst v obsahu tuků
5. anatomické bariéry jako ochrana před
vnějším prostředím



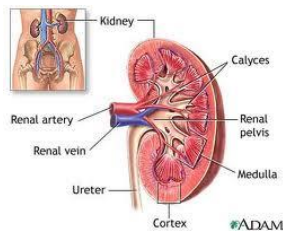


3 majoritní cesty eliminace

Játra – biotransformace lipofilních sloučenin na hydrofilní a eliminace do žluči



Ledviny – sběr škodlivin filtrací a eliminace močí



Plíce – odstranění těkavých sloučenin výdechem

Minoritní cesty

Kůže – těkavé sloučeniny



Vlasy – Hg, kokain – analýza vlasů jako marker expozice



Pot – ztráta cca 0.7 l vody denně, ve vodě rozpustné sloučeniny



Mléko – bohaté na lipidy a lipoproteiny, eliminace v tukách i vodě rozpustných sloučenin (DDE, PCBs) – výhoda pro matku, ne však pro dítě





Toxikokinetika - matematický popis ADME

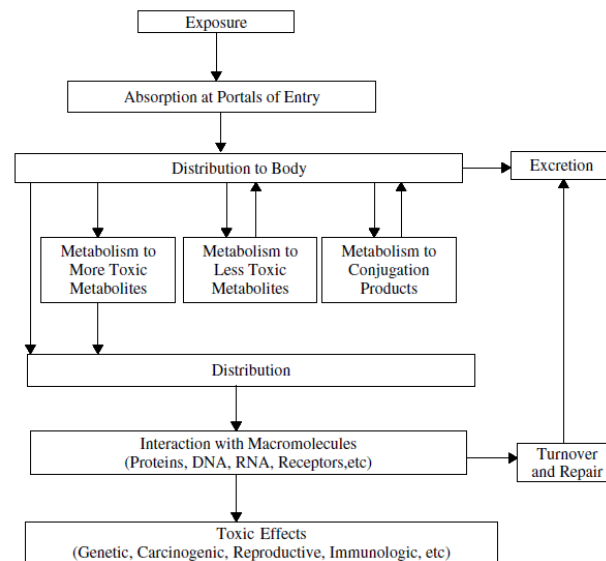
- rozšíření farmakokinetiky za použití vyšších koncentrací
- snaha odhadnout tkáňovou koncentraci v místě spojeném s toxickým účinkem
- = vliv těla na škodlivinu

Po vstupu do těla:

- změna lokalizace, koncentrace, chemické identity
- transport různými systémy, aktivace, eliminace, akumulace

Každý proces (absorpce, distribuce, eliminace) lze popsat jako rychlost, tedy rychlostní konstantou kinetiky 1.řádu !!!

Situace není statická !!!





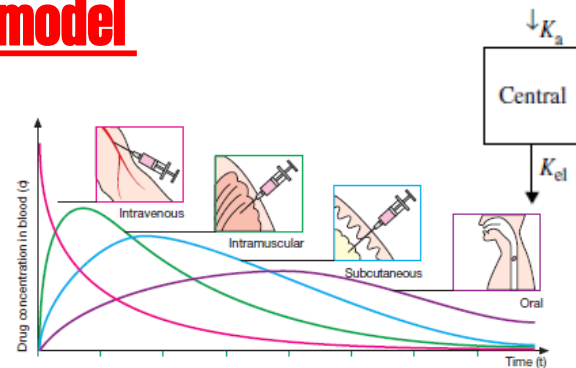
Clearance – kvantitativní
zhodnocení eliminace =
rychlost vyloučené
škodliviny vzhledem k
plazmatické koncentraci

$$Cl = \frac{\text{Rate of toxicant excretion}}{C_p}$$

- za fyziologických
podmínek = **objem krve**
vyčištěné od sloučeniny za
jednotku času (sběr krve a
moči)

Jednokompartmentový model

- Nejjednodušší
- Kinetika prvního řádu
- IV cesta
- Jen pokles, žádná absorpce



$$\frac{dC}{dt} = -KC \rightarrow \frac{-dC}{C} = k dt \rightarrow C = C^0 e^{-kt}$$

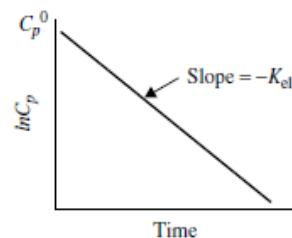
Obecně
transportní
proces

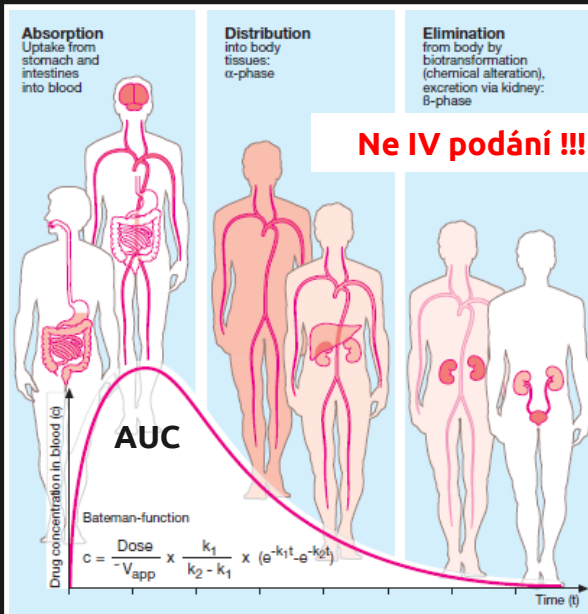
Rychlost eliminace

$$\ln C^t = \ln C^0 - kt$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{el}}$$

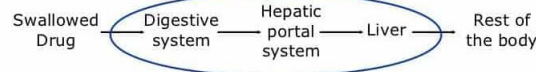
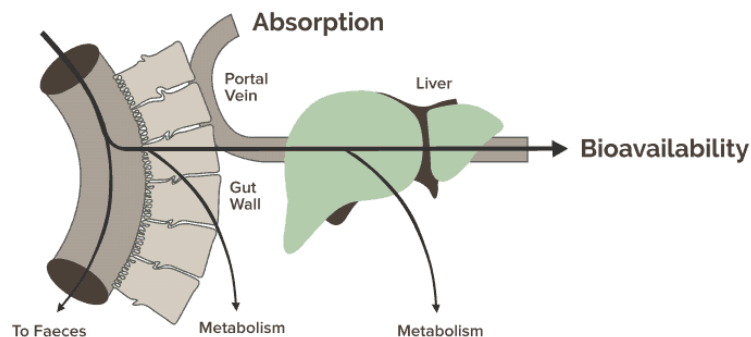
$$V_d = \frac{\text{Dose}}{C^0}$$





Biodostupnost = frakce látky, která dosáhne systémové cirkulace

- 100% pro IV podání
- závisí na místě podání, **first-pass efektu**, atd.



$$AUC = \frac{c_0}{k_{el}} = \frac{DOSE(m_0)}{k_{el} V_D} = \frac{DOSE(m_0)}{Cl}$$



Příklad

Králíkovi o hmotnosti 3 kg byla intravenosně aplikována látka v množství 10 mg/kg . V tabulce jsou uvedeny koncentrace látky v krvi v závislosti na čase. Určete eliminační konstantu (k_{el}), poločas vylučování ($t_{1/2}$), počáteční koncentraci (C_0), distribuční objem (V_D), plochu pod křivkou (AUC) a clearanci (C_l).

Čas/min	5	15	45	90	120
Koncentrace/ mg/ml	3,86	3,03	1,45	0,47	0,22

Řešení:

$$\left. \begin{array}{l} C_{120} = C_0 \times e^{-k_{el} \times t_{120}} \\ C_5 = C_0 \times e^{-k_{el} \times t_5} \end{array} \right\} C_0 = \frac{C_5}{e^{-k_{el} \times t_5}} \left\{ \frac{C_{120}}{C_5} = e^{k_{el} \times (t_5 - t_{120})} \right\} k_{el} = \frac{\ln \frac{C_{120}}{C_5}}{t_5 - t_{120}} = \frac{\ln \frac{0,22}{3,86}}{-115} = 0,0249 \text{ min}^{-1}$$



$$t_{1/2} = 27,8 \text{ min}$$

$$C_0 = 4,37 \mu\text{g} / \text{ml}$$

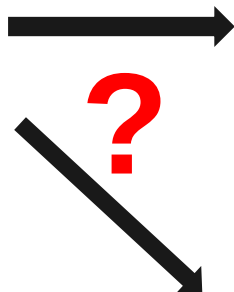
$$V_D = 6862,2 \text{ ml}$$

$$\text{AUC} = 175 \mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{ml}^{-1}$$

$$C_l = 170,87 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$$

Slovo závěrem....

Absorpce.... →distribuce.... →eliminace.



**Každá nenulová
doba expozice
vede k určitému
stupni
kontaminace !!!**





THANKS!

Do you have any questions?

youremail@freepik.com

+34 654 321 432

yourwebsite.com



CREDITS: This presentation template was created by [Slidesgo](#), and includes icons by [Flaticon](#), and infographics & images by [Freepik](#)

Please keep this slide for attribution