

# **Biotransformace xenobiotik**

© Biochemický ústav LF MU (J.D.) 2006

# Řecké slovo ξένος [xenos] znamená cizí

- Xenobiotika jsou látky, které se v organismu normálně nevyskytují
- Do těla se dostávají hlavně s potravinami nebo jako léky
- **Chemický průmysl** – produkuje syntetické sloučeniny, které se nevyskytují v přírodě (plasty, pesticidy, barviva, aditiva ...)
- **Farmaceutický průmysl** – produkuje sloučeniny syntetické a izolované z přírodních zdrojů (rostliny) – nevyskytují se v lidském organismu

# Vstup xenobiotik do těla

- Vnější bariéry: střevo, plíce, kůže
- Bariéry mezi krví a tkáněmi jsou tvořeny epiteley
  - ty obsahují fosfolipidovou dvojvrstvu
- Průnik xenobiotika závisí na jeho fyz.-chem. vlastnostech
- **Lipofilita usnadňuje průnik fosfolipidovou dvojvrstvou**

# Vstup xenobiotik do buněk

- **Volná difuze** – významné pro lipofilní látky, rychlost závisí na konc. gradientu (játra – volně prostupná, velké póry v buněčné membráně, jsou nejvíce zasažena při otravách)
- **Usnadněná difuze** – přenašeče, strukturní podobnost s endogenními substráty  $\Rightarrow$  využití existujících transportních systémů
- **Aktivní transport** – primární, sekundární
- **Endocytóza**

# Biotransformace xenobiotik v buňce

- Probíhá převážně v játrech, dvě fáze:
- **I. Fáze** - převážně hydroxylace, produkt často výrazně biologicky aktivní
- **II. Fáze** – konjugace, produkt většinou neaktivní
- Výsledkem jsou polárnější deriváty, které se mohou vyloučit močí (žlučí) ven z těla

# Exkrece xenobiotik z buňky

- primární aktivní transport – vyžaduje energii, štěpení ATP  
(viz Biochemie I – Semináře, str. 35)
- speciální ATP-asy zvané **ABC** (ATP binding cassette)
- lokalizované v plazmatických membránách, exportují xenobiotika z buňky do ECT
- **MRP** (multidrug resistance protein) – při zvýšené expresi jsou zodpovědné za rezistenci vůči lékům

# Exkrece xenobiotik z těla

- chemicky modifikovaná xenobiotika se vylučují z těla močí, potem, stolicí
- těkavé látky - plícemi
- někdy dochází ve střevě k dekonjugaci a zpětné resorpci (enterohepatální oběh – past)
- exkrece do mateřského mléka

# Příklady reakcí I. fáze biotransformace

Reakce	Příklad xenobiotika
Hydroxylace	aromatické uhlovodíky
Sulfooxidace	disulfidy (R-S-R)
Dehydrogenace	alkoholy, aldehydy
Redukce	nitrosloučeniny (R-NO <sub>2</sub> )
Hydrolýza	estery

Reakce probíhají hlavně v ER, některé v cytosolu



# Enzymy I. fáze biotransformace

- Poměrně nespecifické  $\Rightarrow$  zásadní výhoda!
- **Monooxygenasy (systém cytochromu P-450)**
- Flavinové monooxygenasy
- Peroxidasy
- Hydrolasy
- Alkoholdehydrogenasy a další ...

# Cytochromy P-450 (CYP)

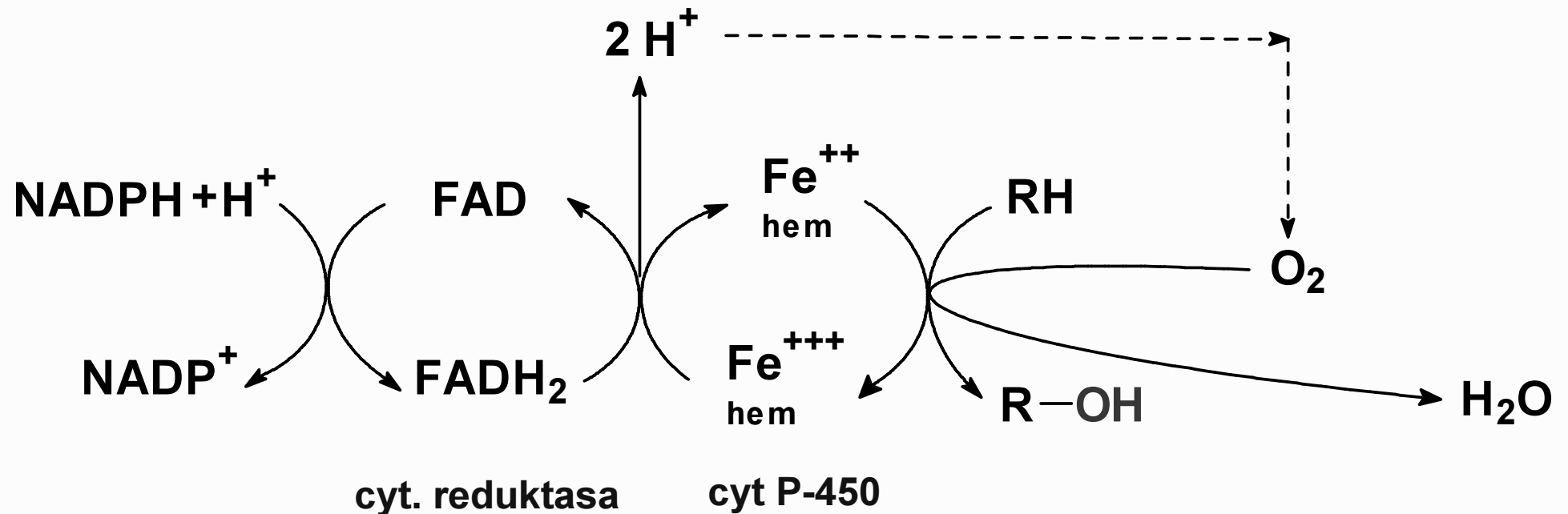
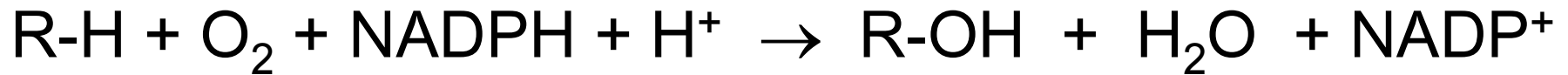
- Skupina **hemových** enzymů (cca 150 izoformem)
- Mnoho z nich je indukovatelných
- Obsaženy ve všech tkáních (kromě svalů a erytrocytů)
- Nejvíce zastoupené v játrech – tam probíhá nejvíce biotransformačních pochodů
- V buňce - hlavně v endoplazmatickém retikulu

Vysvětlení zkratky: P = pigment, 450 = vlnová délka (nm), při které enzym výrazně absorbuje po navázání oxidu uhelnatého CO

# Mechanismus působení CYP

- Katalyzují hydroxylační reakce = vznik hydroxylové skupiny ( $R-H \rightarrow R-OH$ )
- Jsou to monooxygenasy, z molekuly  $O_2$  se inkorporuje jeden atom O do substrátu
- Druhý atom O vytváří vodu, donorem 2H je  $NADPH + H^+$
- Dochází k redukci dikyslíku na -OH skupinu a vodu

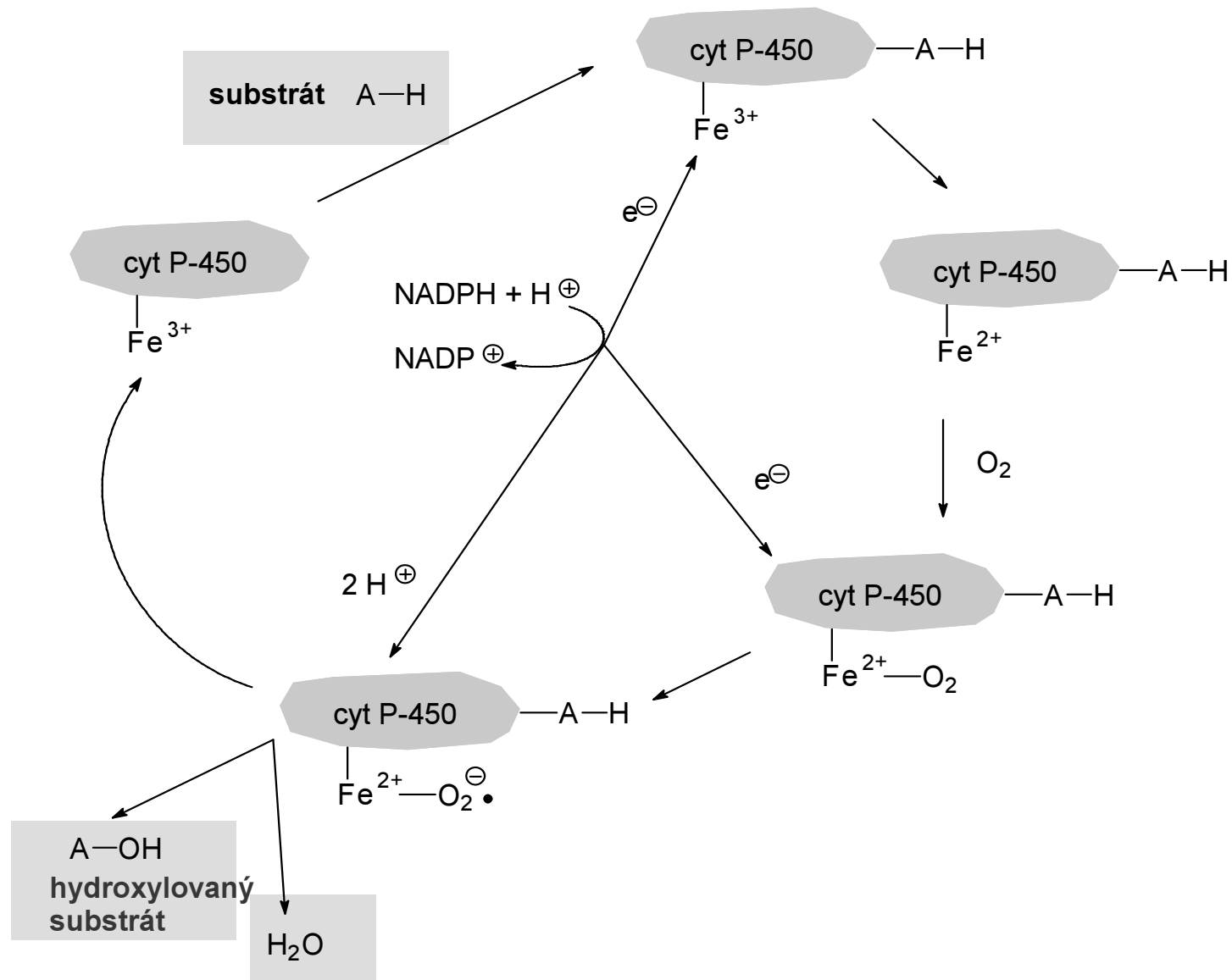
# Obecné schéma hydroxylace



Systém cytochromu P-450 je složen ze:

- dvou enzymů (cytochrom reductasa, cytochrom P-450)
- tří kofaktorů (NADPH, FAD, hem)

# Podrobnější schéma hydroxylace ukazuje aktivaci a redukci O<sub>2</sub> (Harper, str. 123)



# Hydroxylace účinkem CYP nastává u endogenních i exogenních substrátů

- Endoplazmatické retikulum:

skvalen, cholesterol, žluč. kyseliny, kalciol, desaturace MK, prostaglandiny, xenobiotika

- Mitochondrie:

steroidní hormony

# Srovnání různých hydroxylačných reakcí

Substrát	Produkt	Původ O	Koreduktant	Další složky
Fenylalanin	tyrosin	O <sub>2</sub>	BH <sub>4</sub>	-
Xenobiotika	xen-OH	O <sub>2</sub>	NADPH+H <sup>+</sup>	FAD, hem
Prolin	4-OH-Pro	O <sub>2</sub>	2-oxoglutarát	Fe <sup>2+</sup> , askorbát
Dopamin	noradrenalin	O <sub>2</sub>	askorbát	Cu <sup>2+</sup>

# Hlavní izoformy cytochromu P-450

Různé subtypy enzymu preferují různé substráty, mají různé induktory a inhibitory

CYP	Substrát <sup>a</sup>	Induktor <sup>a</sup>	Inhibitor <sup>a</sup>
CYP1A2	theofylin	<b>cig. kouř</b>	erythromycin
CYP2A6	methoxyfluran	fenobarbital	methoxsalem
CYP2C9	ibuprofen	fenobarbital	sulfafenazol
CYP2C19	omeprazol	fenobarbital	teniposid
CYP2D6	kodein	rifampicin	chinidin
CYP2E1	halothan	<b>alkohol<sup>b</sup></b>	disulfiram
<b>CYP3A4</b>	diazepam	fenobarbital	<b>grapefruit</b>

<sup>a</sup> Pouze vybrané příklady z mnoha existujících.    <sup>b</sup> viz dále.



# Indukce a inhibice CYP 450

- Některá xenobiotika vyvolávají **indukci syntézy CYP**, metabolická kapacita CYP se tím zvýší
  - Je-li současně s induktorem podán lék metabolizovaný stejným CYP  $\Rightarrow$  léčivo je odbouráno rychleji  $\Rightarrow$  **léčivo je méně účinné**
- 

- Některá xenobiotika působí jako **inhibitory CYP**
- Nejrozšířenější izoformou je CYP3A4, metabolizuje více jak 120 různých léčiv
- Inhibitory CYP3A4 jsou makrolidová ATB (Rulid, Klacid), grapefruit (furanokumariny), ketokonazol
- Současné podání inhibitorů s léčivem  $\Rightarrow$  zvýšená koncentrace léčiva  $\Rightarrow$  **předávkování**  $\Rightarrow$  nežádoucí účinky

# Genetický polymorfismus CYP 450

- geneticky dané rozdíly v aktivitě hydroxylujícího systému, rozlišují se tři typy osob:

EM (extensive metabolizer) – normální metabolizátor

PM (poor metabolizer) – špatný metabolizátor

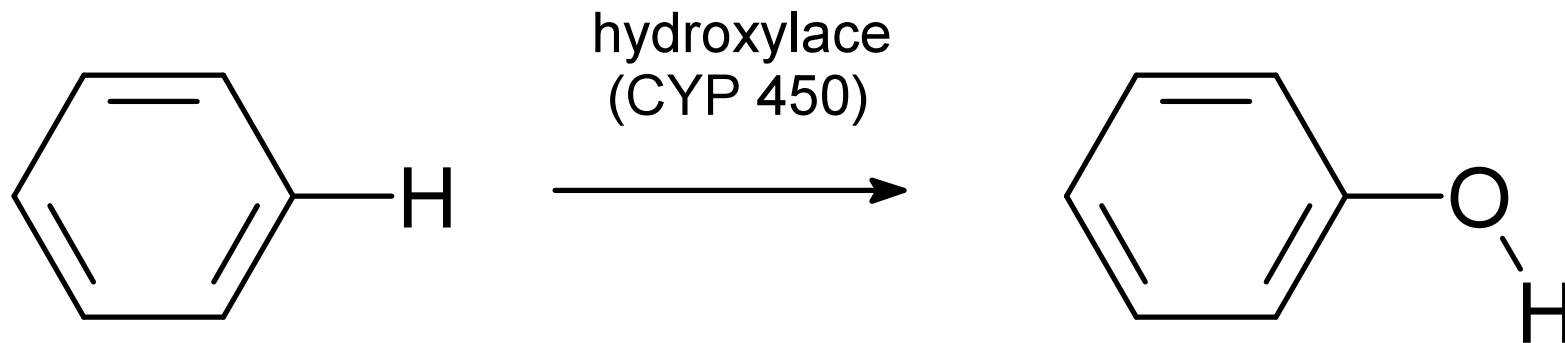
RM (rapid metabolizer) – rychlý metabolizátor

- důsledky u PM: vyšší hladiny léčiv, zvýšené nežád. účinky, extrémní příklad:

podání warfarinu u PM  $\Rightarrow$  život ohrožující krvácivost

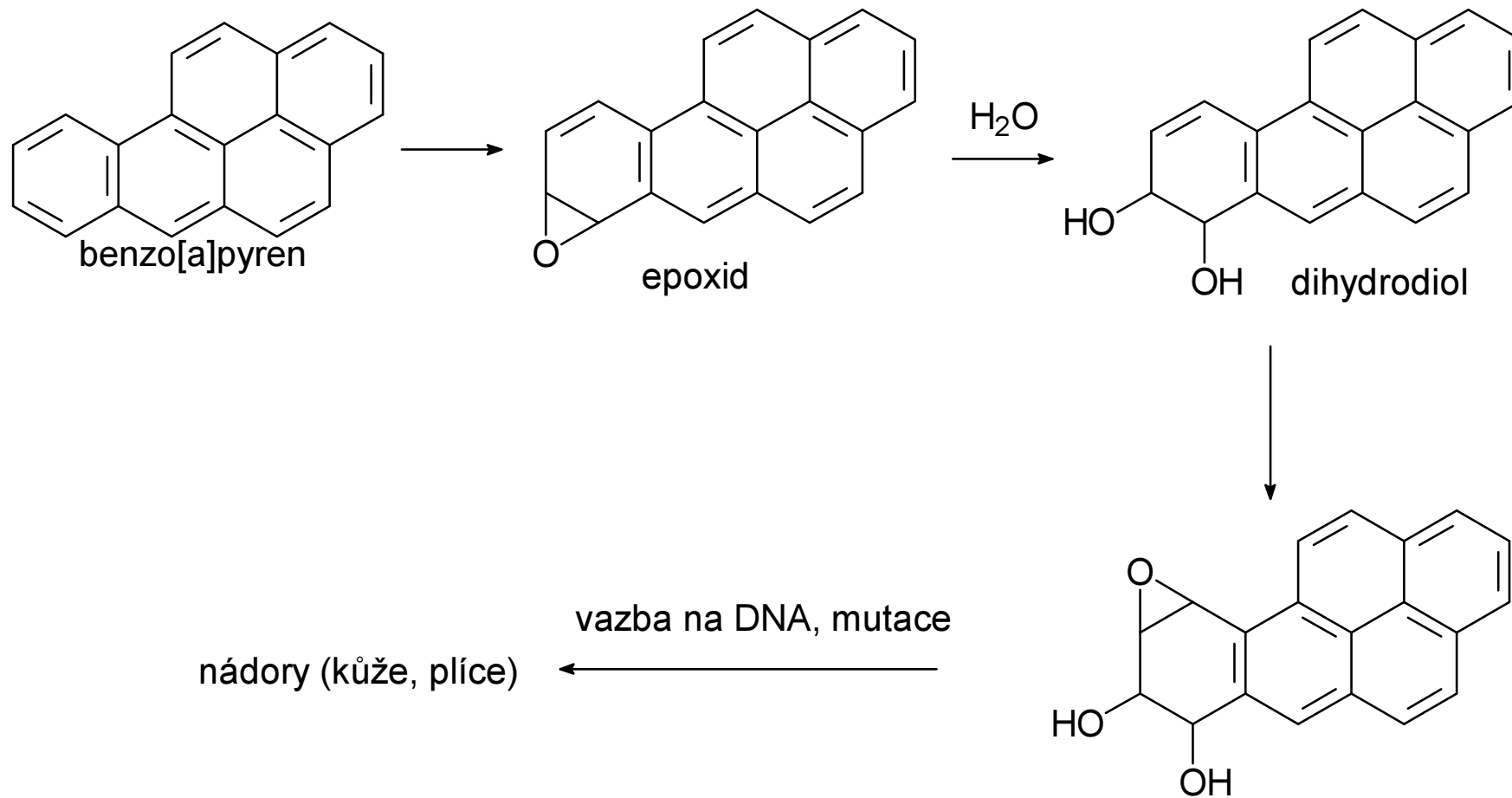
- důsledky u RM: snížená hladina léčiv, neúčinná léčba (např. v psychiatrii je nutno udržet stálou hladinu farmaka)

# Biotransformace benzenu



Důkazem chronické expozice benzenu je zvýšené vylučování fenolu močí (pracující v chem. průmyslu, čičači, sniffers)

# Biotransformace polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU)



# Polycyklické aromatické uhlovodíky v životním prostředí

- **Průmyslové zdroje**: spalování uhlí, benzínu, nafty; výroba koksu, asfaltu; havárie tankerů; zapalování ropných vrtů; popílek v ovzduší ...
- **Neprůmyslové zdroje**: požáry lesů, spalování odpadů, domácí topeniště, cigaretový kouř ...
- **Potraviny**: smažené, uzené, grilované potraviny, přepálený tuk, připálené maso a pečivo ...

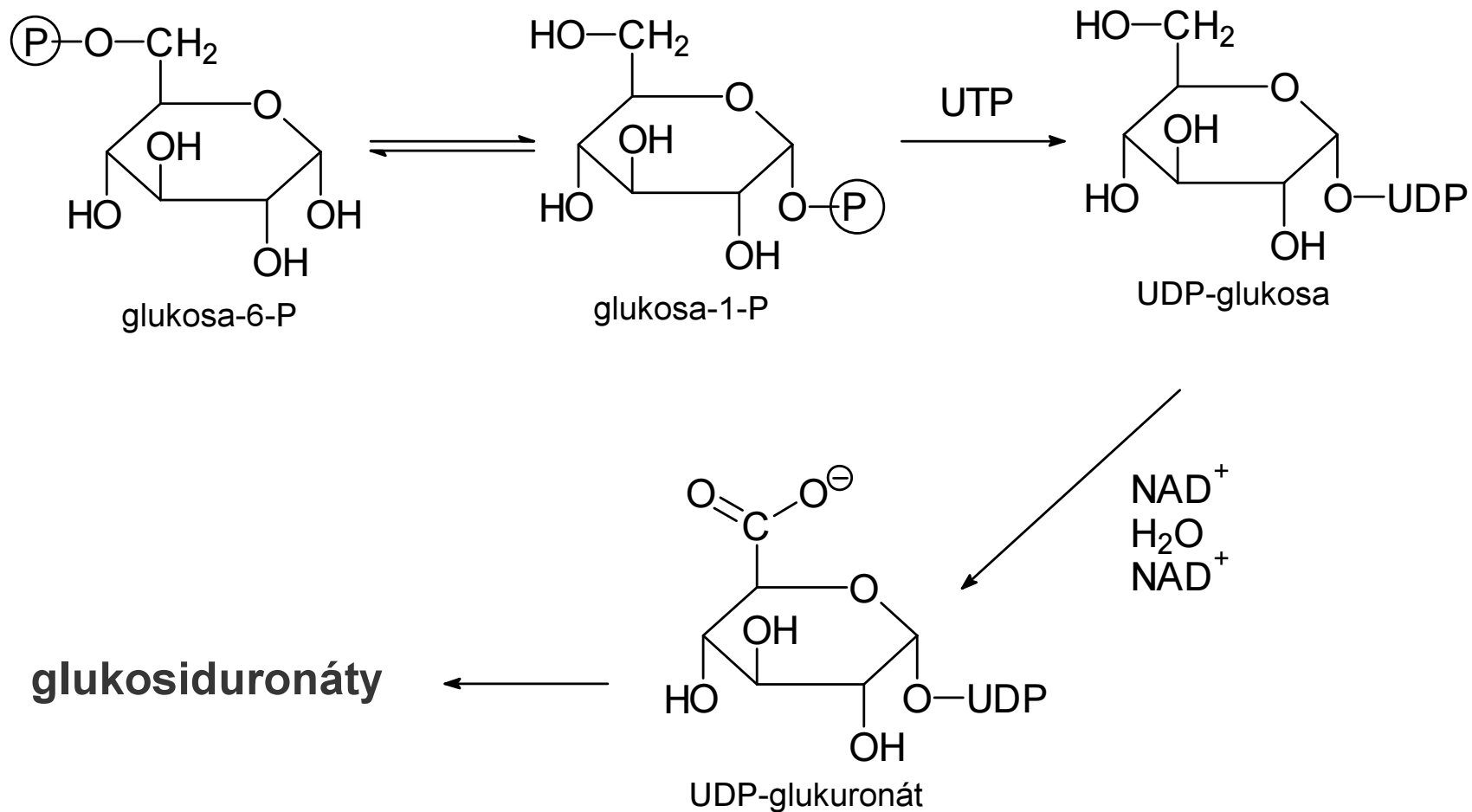
## II. Fáze biotransformace

- Konjugace - syntetický charakter
- Xenobiotikum po I. fázi biotransformace reaguje s endogenní konjugační složkou
- Vzniká konjugát, polárnější – snadno se vylučuje močí
- Endergonní charakter - nutná energie (reaguje aktivovaná konjugační složka)
- Enzymy - transferasy

# Přehled konjugačních činidel

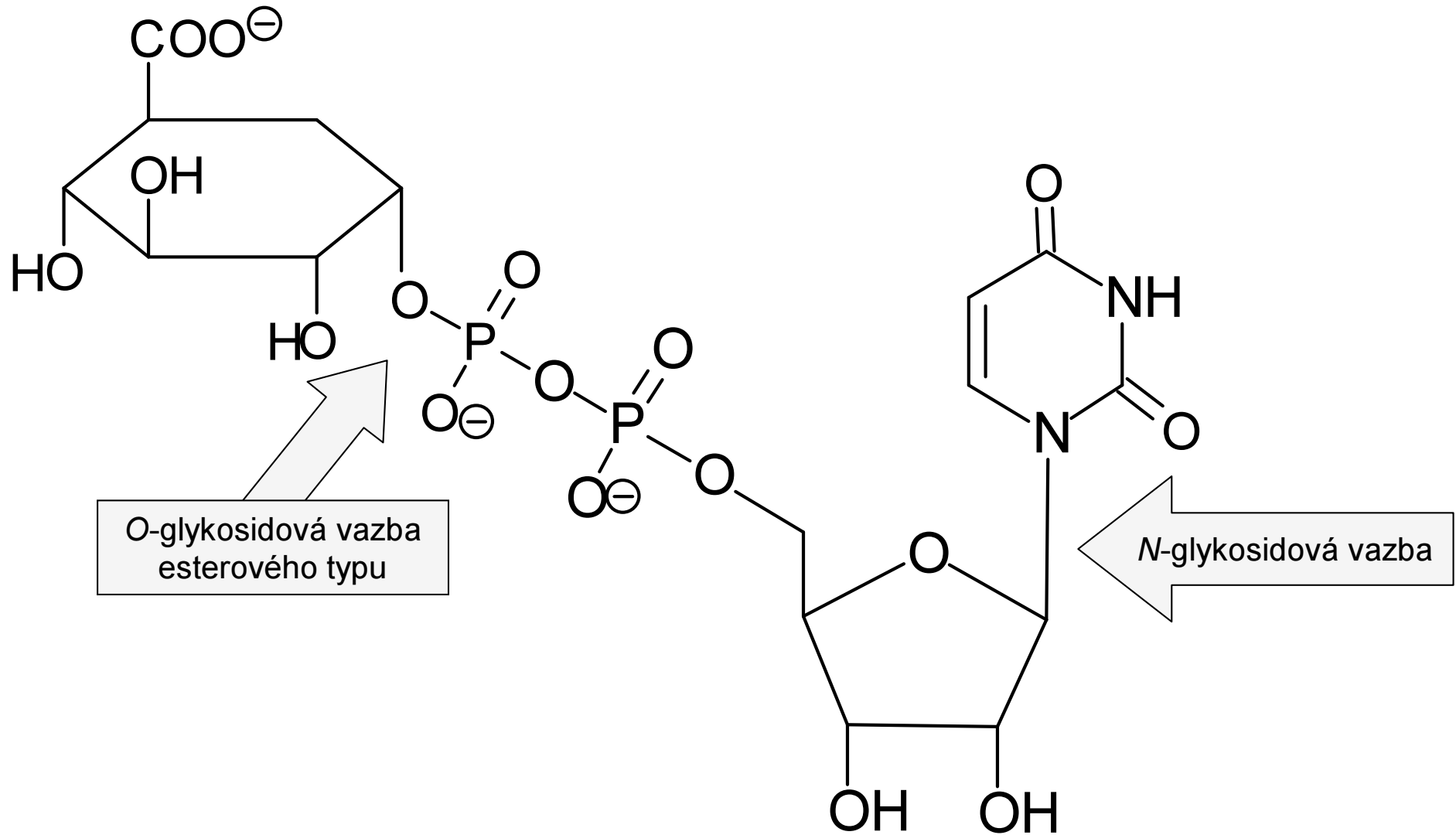
Typ konjugace	Konjugační činidlo	Skupina v xenobiotiku
Glukuronidace	UDP-glukuronát	-OH, -COOH, -NH <sub>2</sub>
Sulfatace	PAPS	-OH, -NH <sub>2</sub> , -SH
Methylace	SAM	-OH, -NH <sub>2</sub>
Acetylace	Acetyl-CoA	-OH, -NH <sub>2</sub>
Glutathionem	Glutathion	Ar-Hal, Ar-epoxydy
Aminokyselinou	Glycin, taurin	-COOH

# Biosyntéza UDP-glukuronátu





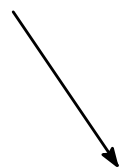
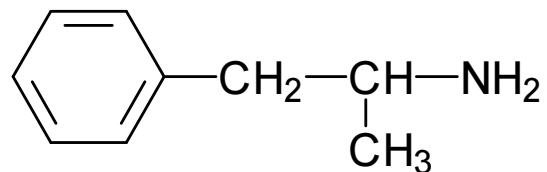
# UDP-glukuronát



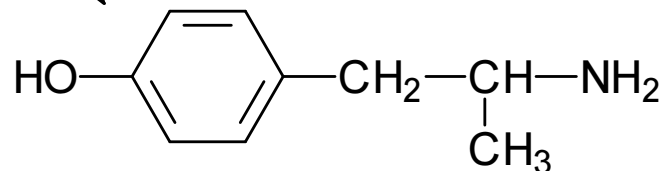
# Glukuronáty jsou nejčastější konjugáty

- Vznikají *O*-glukosiduronáty
  - etherový typ (Ar-O-glukuronát, R-O-glukuronát)
  - esterový typ (Ar-COO-glukuronát)
- *N*-, *S*-glukosiduronáty
- Substráty: arom. aminy, amfetaminy, kys. salicylová, léčiva, flavonoidy, ...
- Endogenní substráty: bilirubin, steroidy

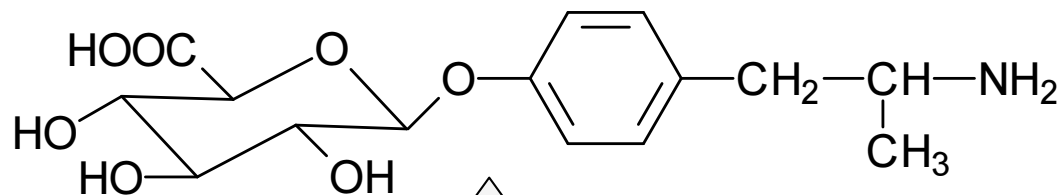
# Biotransformace amfetaminu



I. fáze



II. fáze

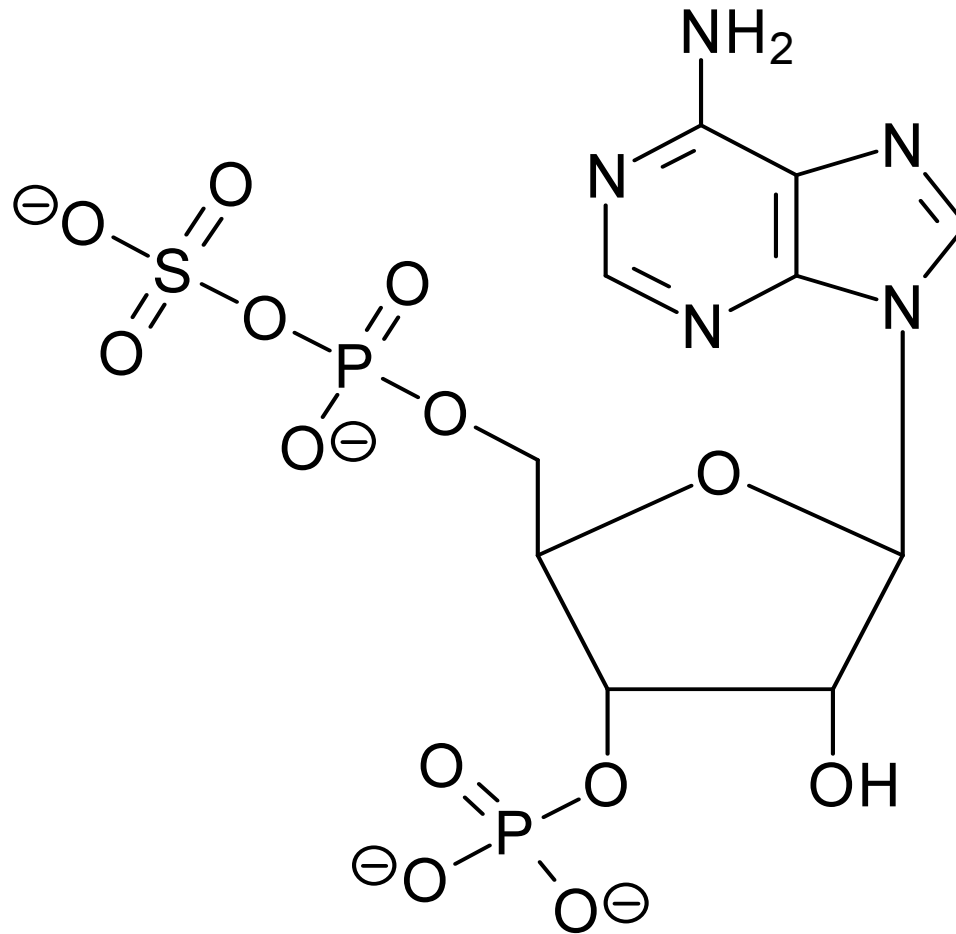


O-glukosiduronát  
etherového typu

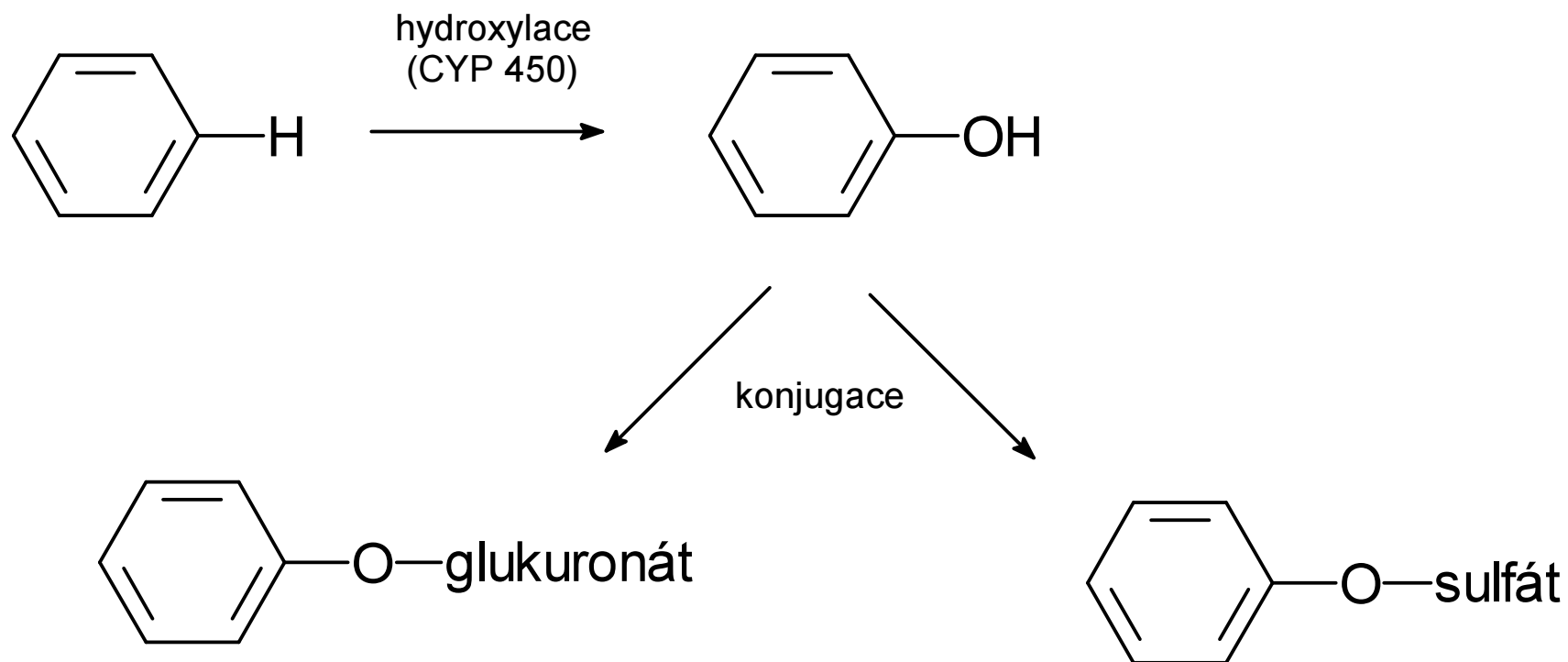
viz také Biochemie II - Praktická cvičení,  
průkaz drog v moči, str. 88

# PAPS je sulfatační činidlo

(phospho adenosine phospho sulfate)



# Konjugace fenolu



# Glutathion má trojí význam

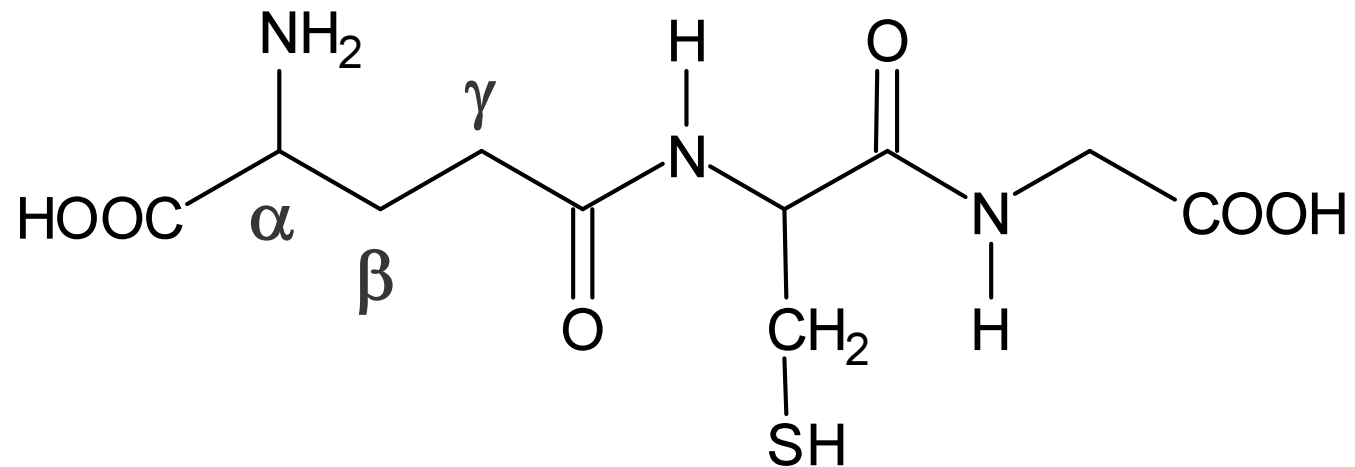
$\gamma$ -glutamylcysteinylglycin

- **Redukční činidlo** (glutathionperoxidasa)
- **Konjugační činidlo** (glutathiontransferasa)

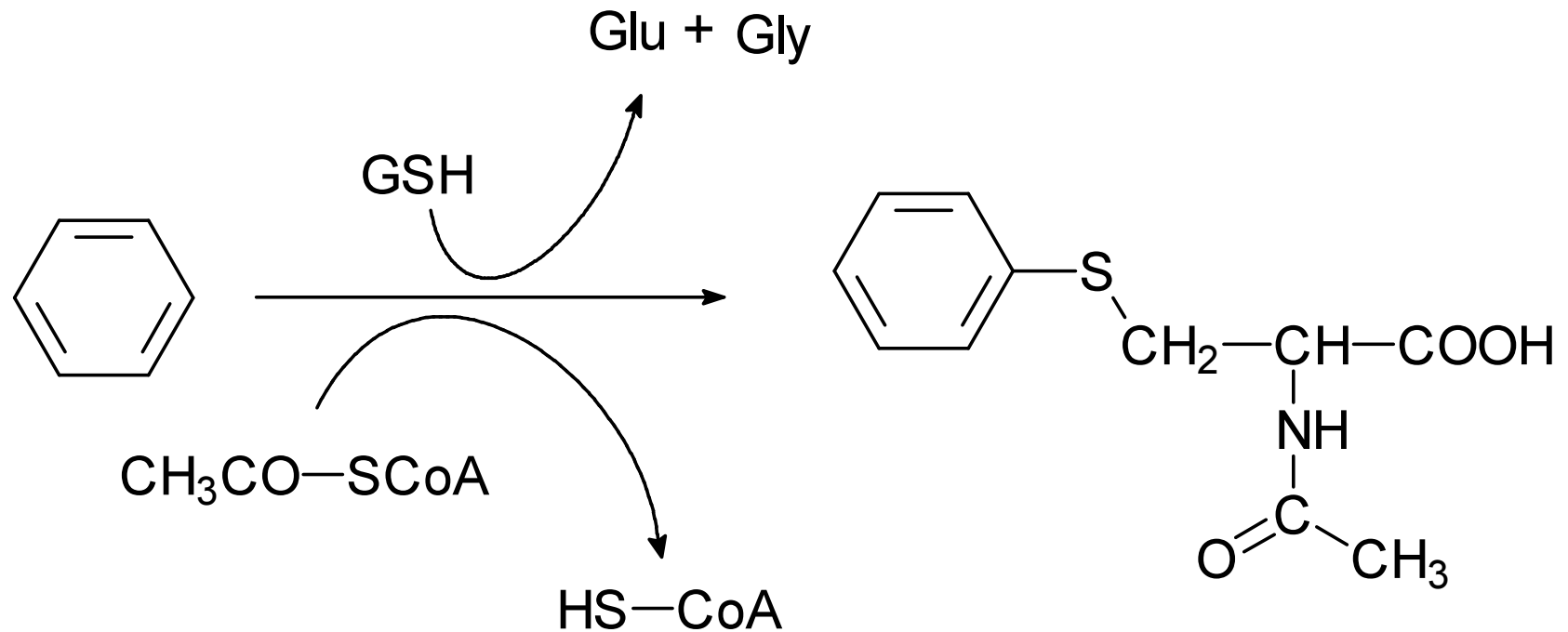
Endogenní substráty – konjugace leukotrienů

- **Transport AK do buněk** ( $\gamma$ -glutamyltransferasa)

# Glutathion (GSH)



## Před exkrecí vznikají z R-SG merkapturové kyseliny



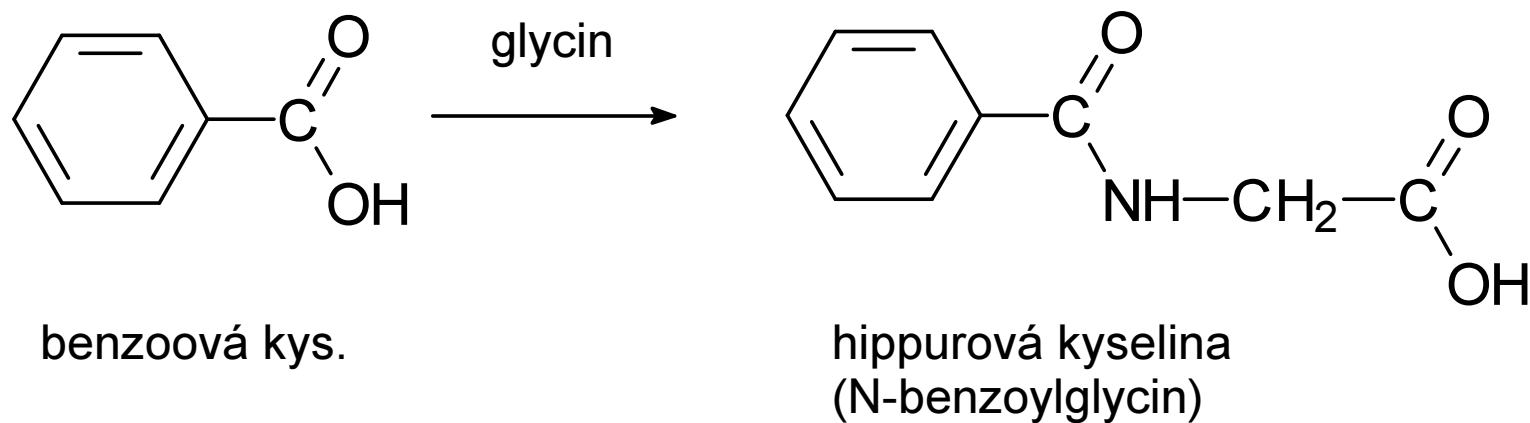
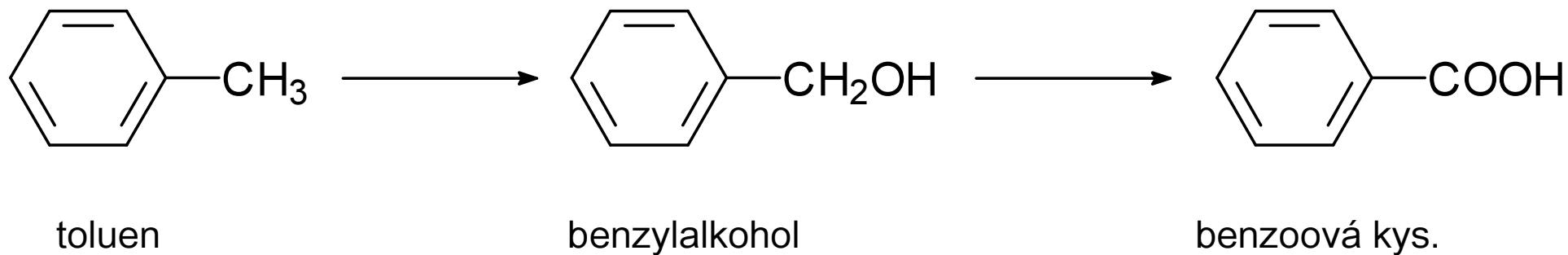
*N*-acetyl-*S*-fenyl-cystein  
(merkapturová kyselina)



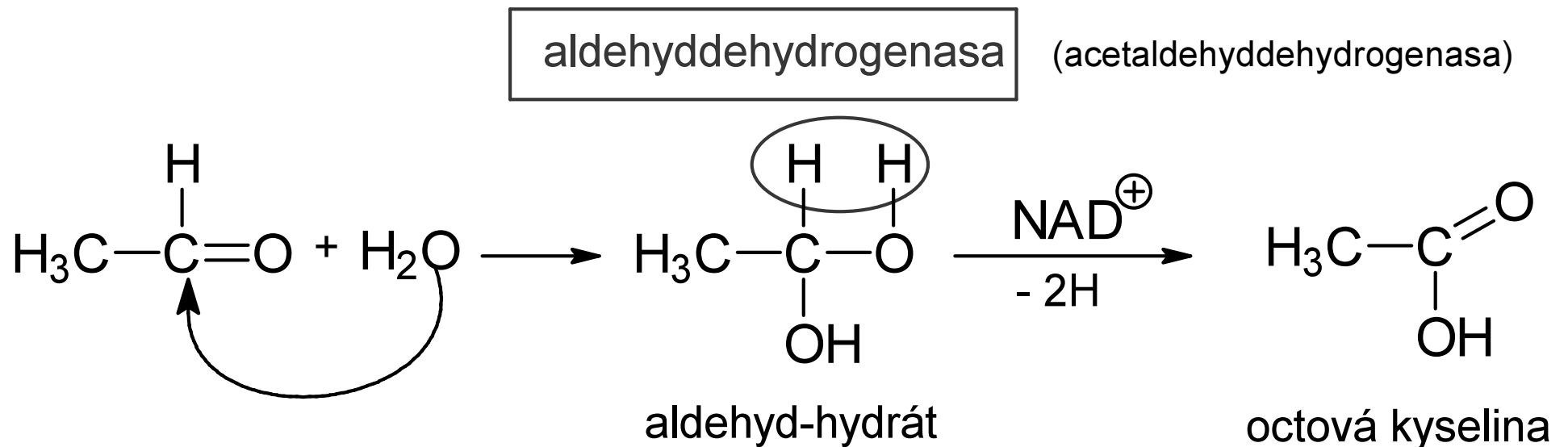
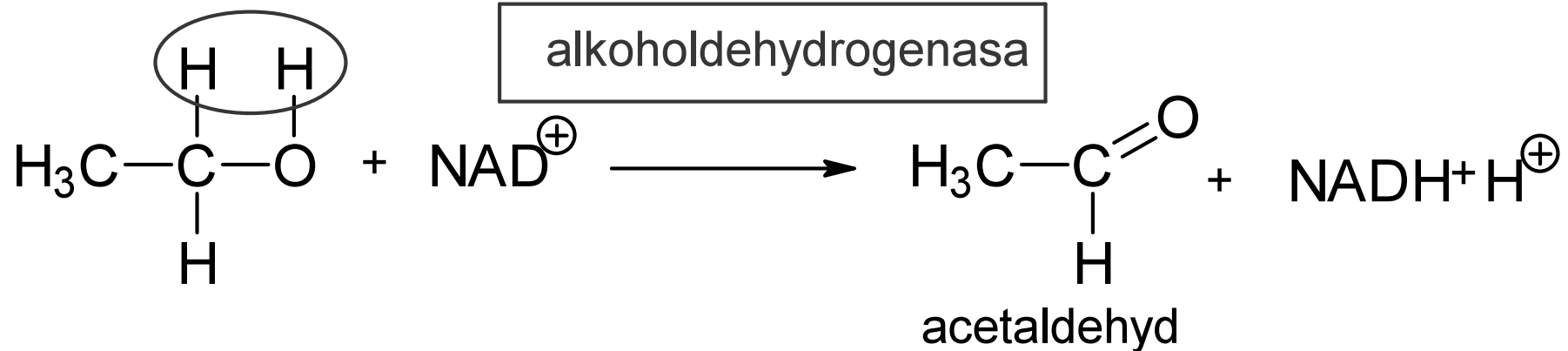
# Konjugace aminokyselinami

- glycin, taurin
- xenobiotika s -COOH skupinou
- vznik amidové vazby
- endogenní substráty – žlučové kyseliny

# Jak odhalit čičače toluenu?



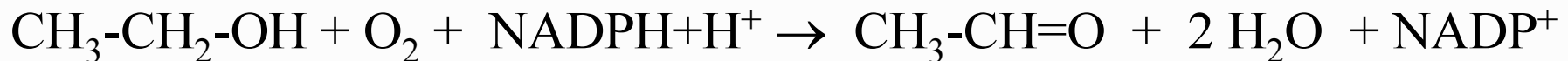
# Biotransformace ethanolu v játrech (cytosol)



# Další dráhy biotransformace ethanolu

## ER hepatocytu:

MEOS (mikrosomální ethanol oxidující systém, CYP2E1)

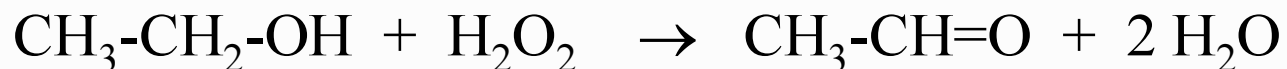


Tento systém se aktivuje až při zvýšené konzumaci alkoholu

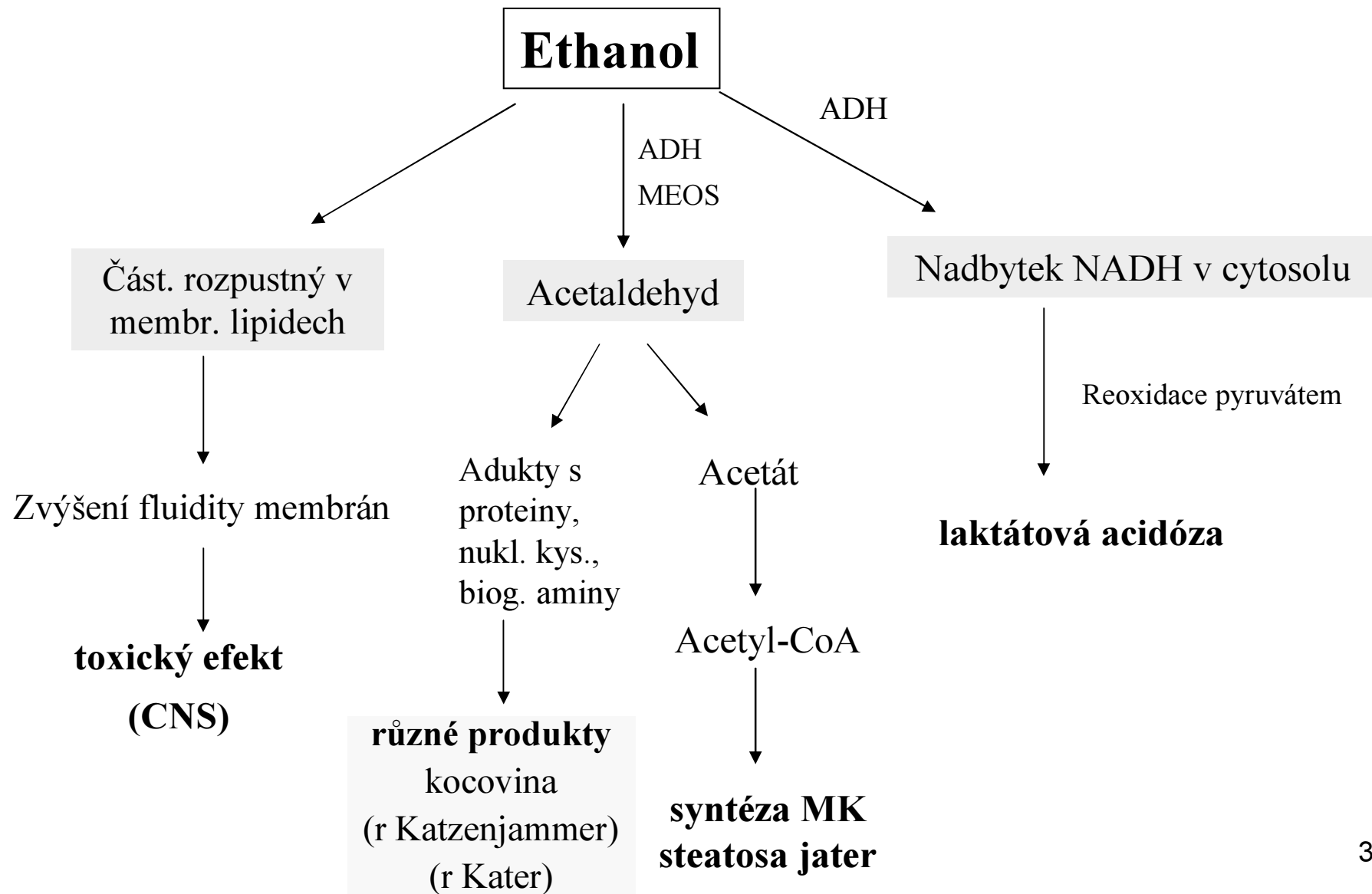
= vyšší hladiny ( $> 0,5 \text{ ‰}$ )  $\Rightarrow$  **zvýšená produkce acetaldehydu**

(viz Semináře II, str. 55, srovnejte hodnoty  $K_M$  pro různé enzymy)

Peroxisomy: oxidace ethanolu za účasti peroxidu vodíku, katalasa



# Důsledky biotransformace ethanolu



# Jak odhalit alkoholika?

GMT

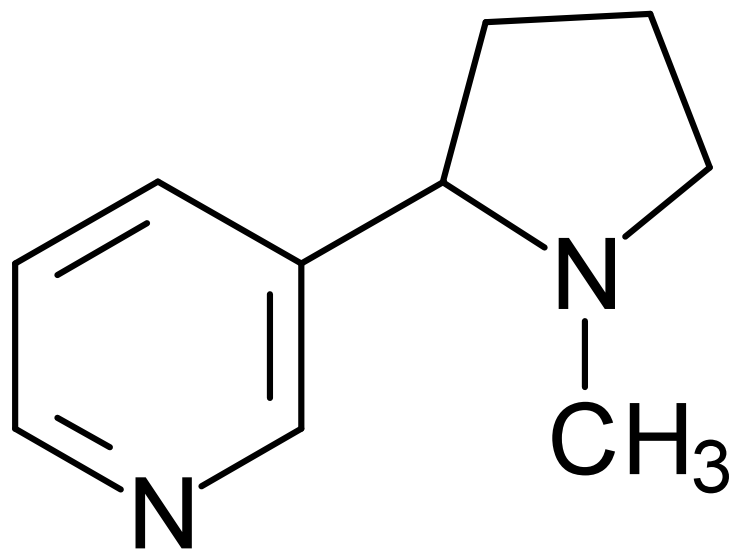
CDT

apo A-I

FAEE

- **GMT** ( $\gamma$ -glutamyltransferasa, viz Semináře I, s.36; Semináře II, s.14)
- **CDT (carbohydrate-deficient transferrin)**  
molekula transferrinu obsahuje 4-6 sialových kys. Chronický abusus alkoholu narušuje glykosylaci transferrinu, vzniká CDT = formy transferrinu s 0-2 sial. kys. Zvýšená hodnota CDT = marker vydatného požívání EtOH během uplynulých 4 týdnů (kontrola abstinence u léčených ethyliků)
- **apo A-I** (strukturní protein HDL, zvýšená hodnota = marker chronického abusu alkoholu)
- **FAEE (fatty acids ethyl esters)** přetrvávají v krvi až 24 hod poté, co klesne hladina EtOH na nulu  
(význam při vyšetřování dopravních nehod)

# Nikotin je hlavní alkaloid tabáku



3-(1-methylpyrrolidin-2-yl)pyridin

Na krabičce cigaret

**Nikotin: 0.9 mg/cig.**

**Dehet: 11 mg/cig.**



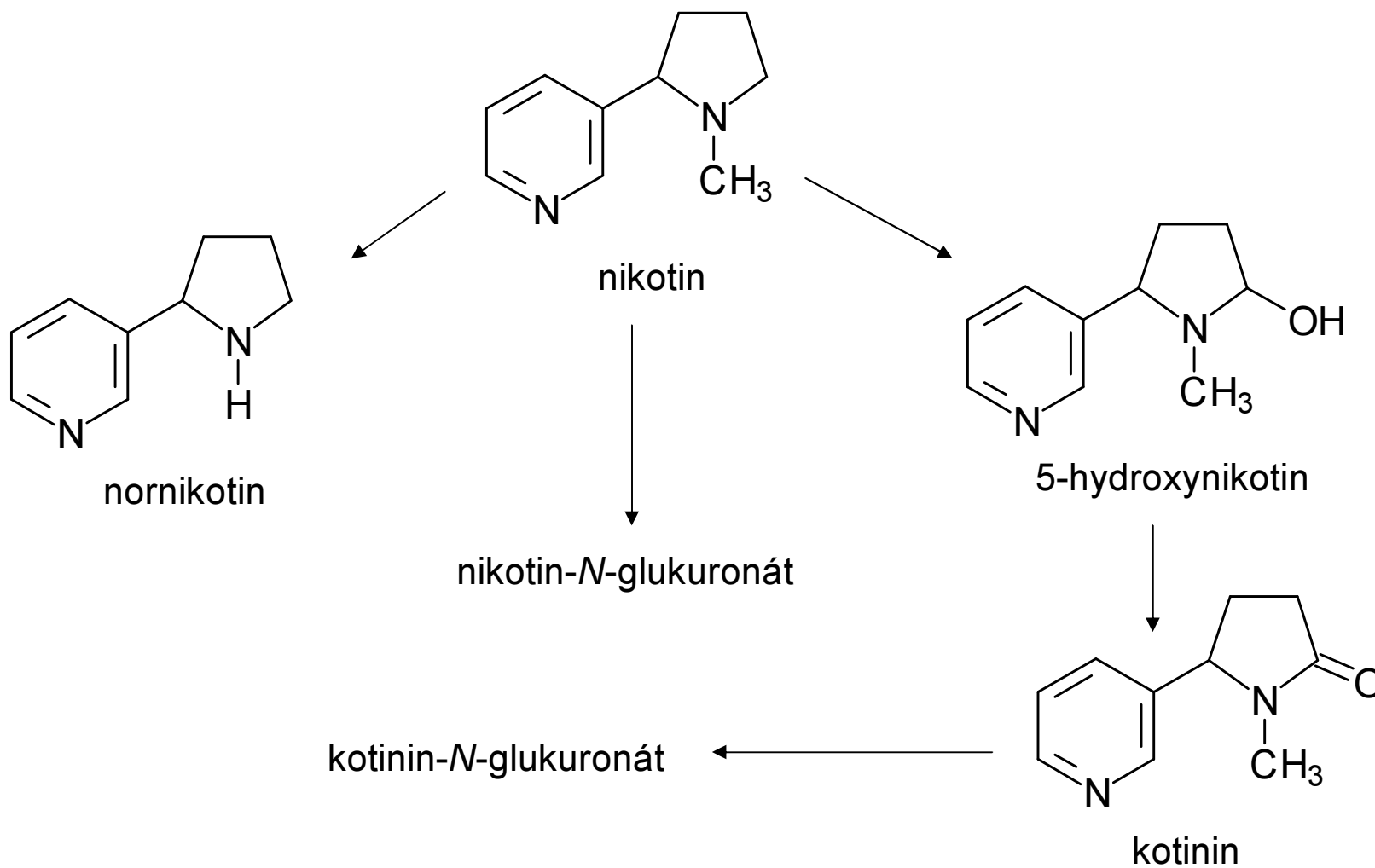
# Co se děje při hoření cigarety?

- teplota kolem 900 °C
- sušený tabák podléhá nedokonalému spalování,  
vzniká složitá směs produktů
- nikotin částečně destiluje a přechází do kouře (aerosolu),  
částečně se pyrolyticky rozkládá

# Cigaretový kouř obsahuje

- **volný nikotin (bázi)** - váže se na nikotinové receptory v mozku, dřeni nadlečin a jinde (viz Semináře II, str. 72)
- **CO** - váže se na hemoglobin, vzniká karbonylhemoglobin – ischemie tkání (u silných kuřáků až 12 % CO-Hb)
- **oxidy dusíku** - mohou generovat volné radikály
- **polykondenzované aromatické uhlovodíky (PAU)** (pyren, chrysen ...), hlavní složky **dehtu**, atakují a poškozují DNA, karcinogeny
- **další látky** ( $N_2$ ,  $CO_2$ , HCN,  $CH_4$ , terpeny, estery ...)

# Biotransformace nikotinu



# Jak odhalit kuřáka?

## 1. test se slinami

kuřákovy sliny obsahují mnohonásobně více thiokyanatanu než sliny nekuřáka, poločas 6 dní,

thiokyanatan  $\text{SCN}^-$  vzniká biotransformací  $\text{CN}^-$

(síra pochází z cysteinu)

reakcí s  $\text{Fe}^{3+}$  ionty  $\rightarrow$  červený komplex

## 2. nikotin v moči

## 3. minoritní alkaloidy tabáku a metabolity nikotinu v moči

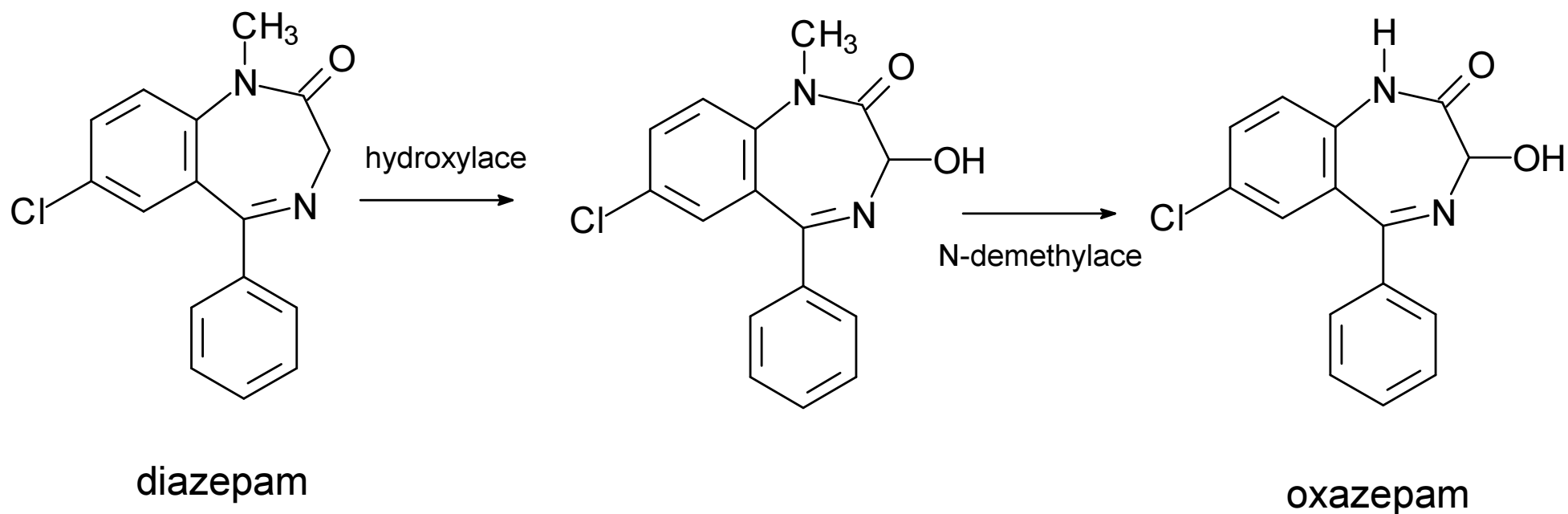
(kotlinin, nornikotin, anatabin, anabasin)

# Biotransformace vybraných léčiv

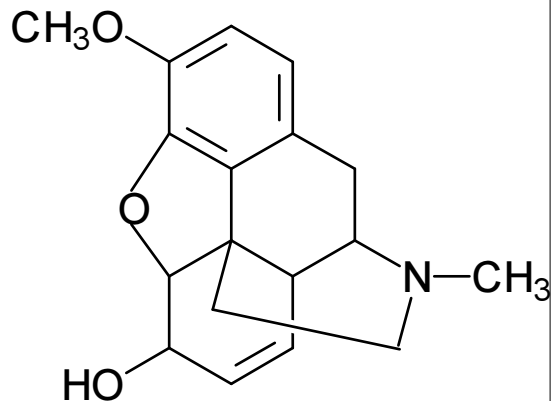
Léčivo	Metabolit
Diazepam	oxazepam (aktivní stejně)
Kodein	morfin (aktivní jinak)
Bromhexin	ambroxol (aktivní)
Paracetamol	různé konjugáty (neaktivní) <sup>a</sup>
Acetylsalicylová kys.	různé konjugáty (neaktivní)

<sup>a</sup> Situace může být složitější, viz dále

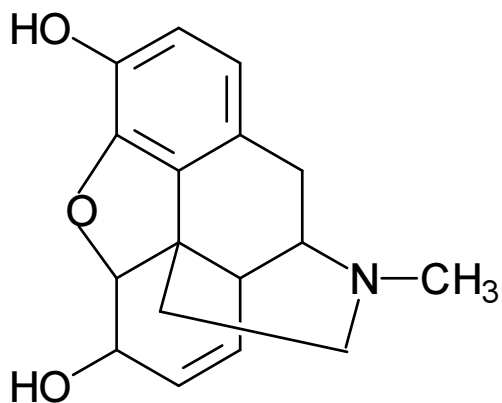
# Biotransformace diazepam



# Kodein podléhá *O*-demethylaci na morfin

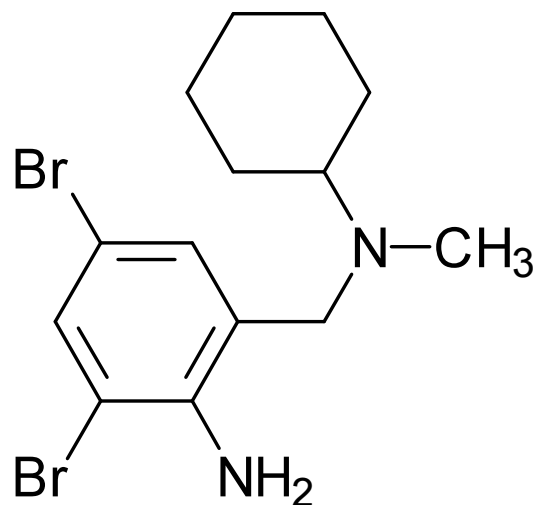


kodein (3-*O*-methylnorfin)



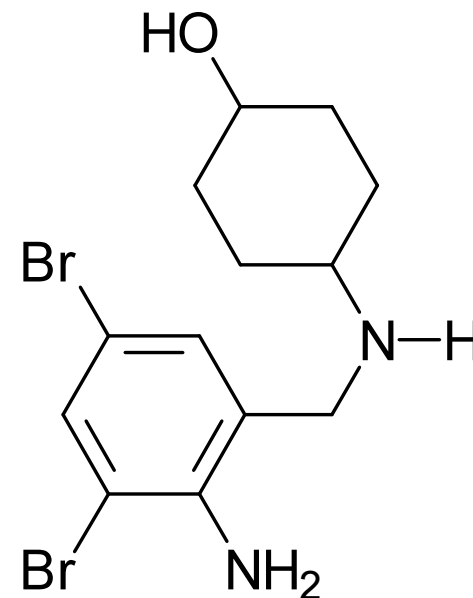
morfin

# Biotransformace bromhexinu



bromhexin

N-demethylace  
hydroxylace

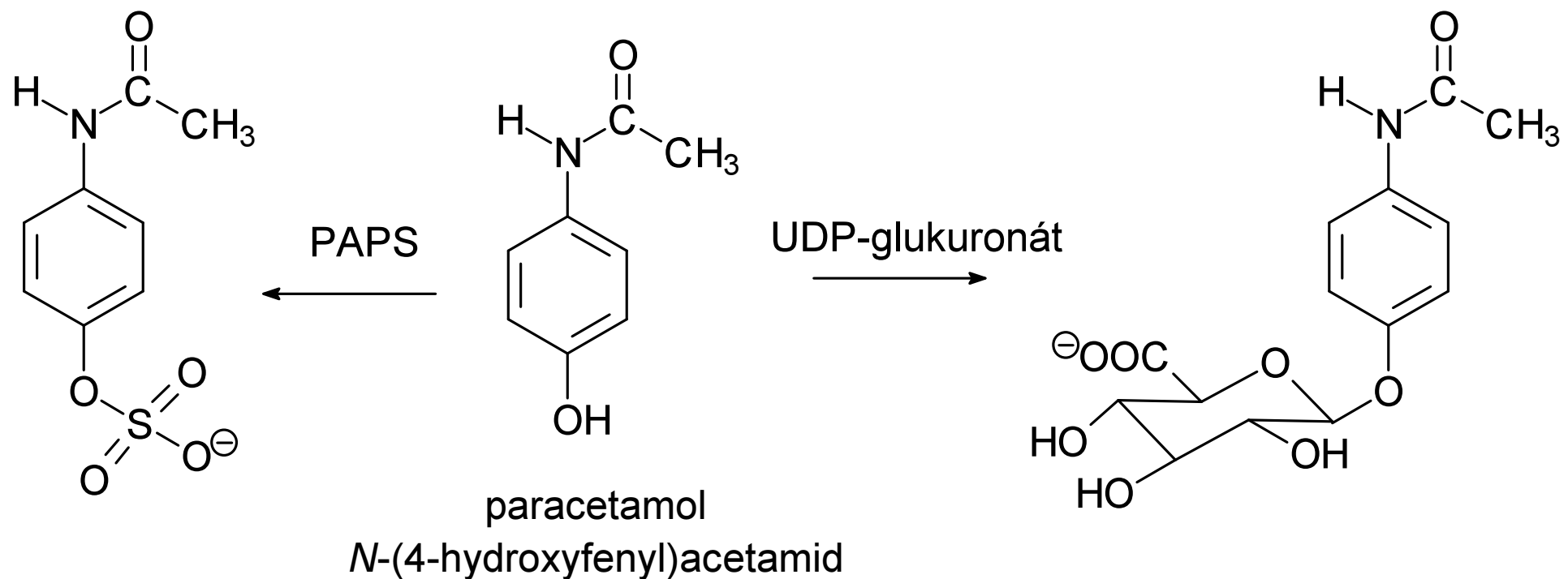


ambroxol

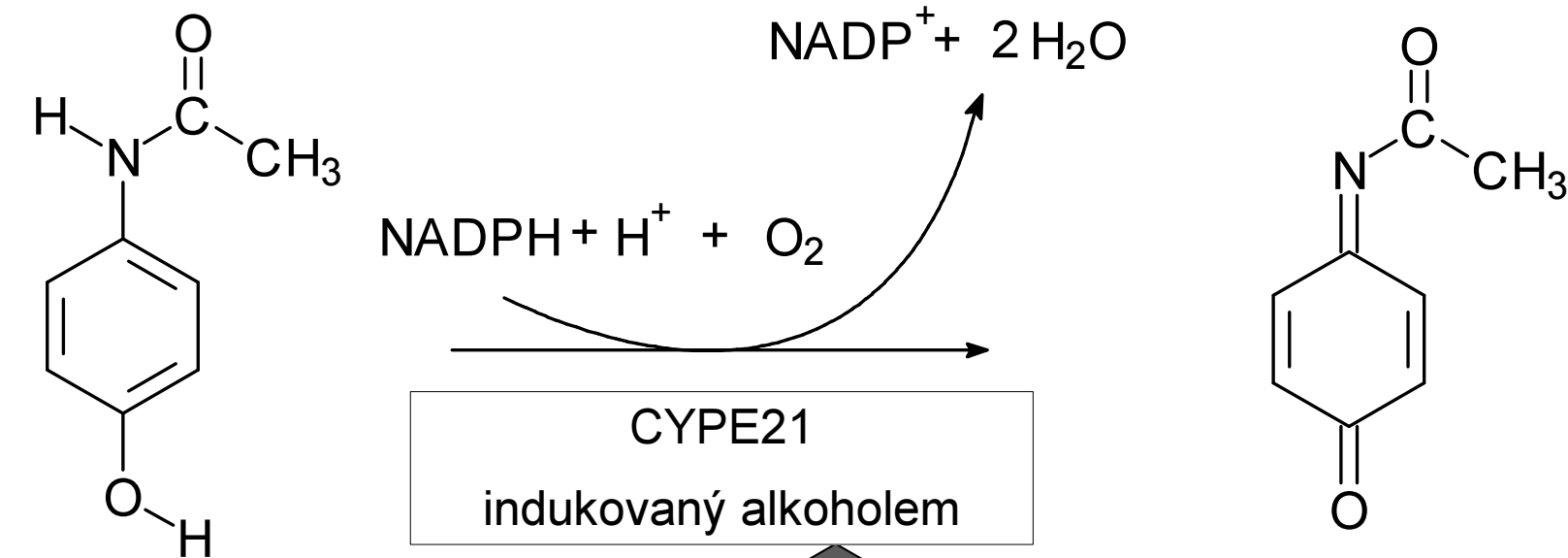
proléčivo (prodrug)



# Hlavní dráha biotransformace paracetamolu je konjugace



# Vedlejší dráha biotransformace paracetamolu vede k hepatotoxickému chinoniminu



paracetamol

N-acetylbenzochinonimin  
(hepatotoxický)

váže se na buněčné  
proteiny - nekróza

- ☠ nebezpečí při předávkování
- ☠ u alkoholiků je větší část paracetamolu metabolizována na chinonimin

# **Volně prodejné přípravky s paracetamolem**

(jednoduché a kombinované)

Acifein (SK)

Ataralgin (CZ)

Benuron (D)

Coldrex Hotrem (UK)

Coldrex Nite (UK)

Efferalgan (F)

Fervex (F)

Grippostad (D)

Humex Cold (F)

Medipyrin (SK)

Mexalen (D)

Mexavit (D)

Migraeflux (D)

Panadol (UK)

Paralen Plus (CZ)

Paralen (CZ)

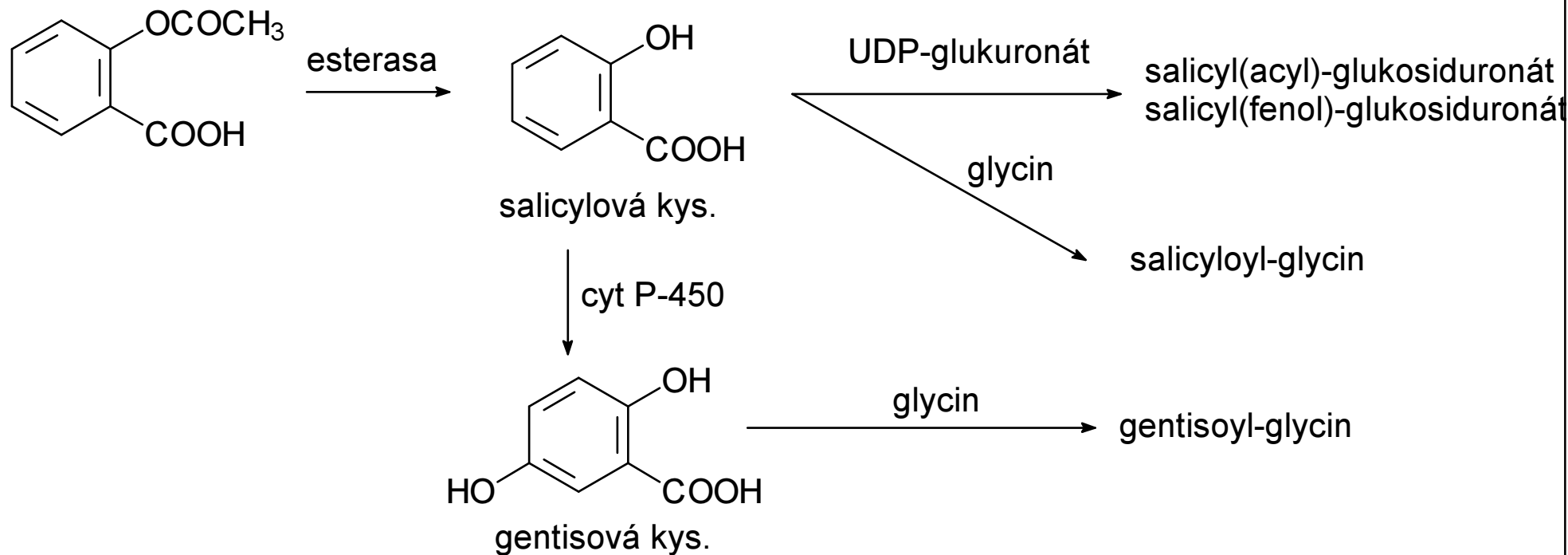
Paraskorbin (CZ)

Saridon (F)

Tomapyrin (D)

Valetol (CZ)

# Biotransformace acetylsalicylové kyseliny



**K čemu je dobrá znalost  
biotransformace léčiv?**

# Polypragmazie a její důsledky

(viz Biochemie II - Semináře, str. 54, otázka 52)

- užívání mnoha léčiv současně
- vzájemná interakce léčiv nebo jejich metabolitů (potencování, inhibice)
- indukce, ale současně zatížení hydroxylujícího systému (CYP450)
- více se uplatňují vedlejší (minoritní) dráhy biotransformace  $\Rightarrow$  výraznější toxické účinky
- možná deplece glutathionu .... atd.

# Vybrané ukazatele jaterního poškození

Analyt (sérum)	Referenční hodnoty	Změna
ALT	0,1 - 0,8 $\mu$ kat/l	↑
GMD	0,1 - 0,7 $\mu$ kat/l	↑
GMT	0,1 - 0,7 $\mu$ kat/l	↑
Bilirubin	5 - 20 $\mu$ mol/l	↑
Urobilinogeny (moč)	do 17 $\mu$ mol/l	↑
-----		
Cholinesterasa	65 - 200 $\mu$ kat/l	↓
Močovina	3 - 8 mmol/l	↓
Albumin	35 - 53 g/l	↓