

Biotransformace xenobiotik

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

- tři hlavní vstupy: střevo, plíce, kůže
- bariéry mezi krví a tkáněmi jsou tvořeny epitelem
 - 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

Velmi hydrofobní látky by bez biotransformace mohly přetrvávat v tukové tkáni neomezeně dlouho!!

Exkrece xenobiotik z buňky

- primární aktivní transport – vyžaduje energii, štěpení ATP
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	(hetero)aromatické sloučeniny ($\text{Ar-H} \rightarrow \text{Ar-OH}$)
Sulfoxidace	dialkylsulfid (R-S-R) \rightarrow sulfoxid (R-SO-R)
Dehydrogenace	alkohol / aldehyd-hydrát \rightarrow aldehyd / kyselina
Redukce	nitrosloučeniny (R-NO_2) \rightarrow aminy (R-NH_2)
Hydrolýza	ester \rightarrow kyselina + alkohol

Reakce probíhají hlavně v ER, některé v cytosolu

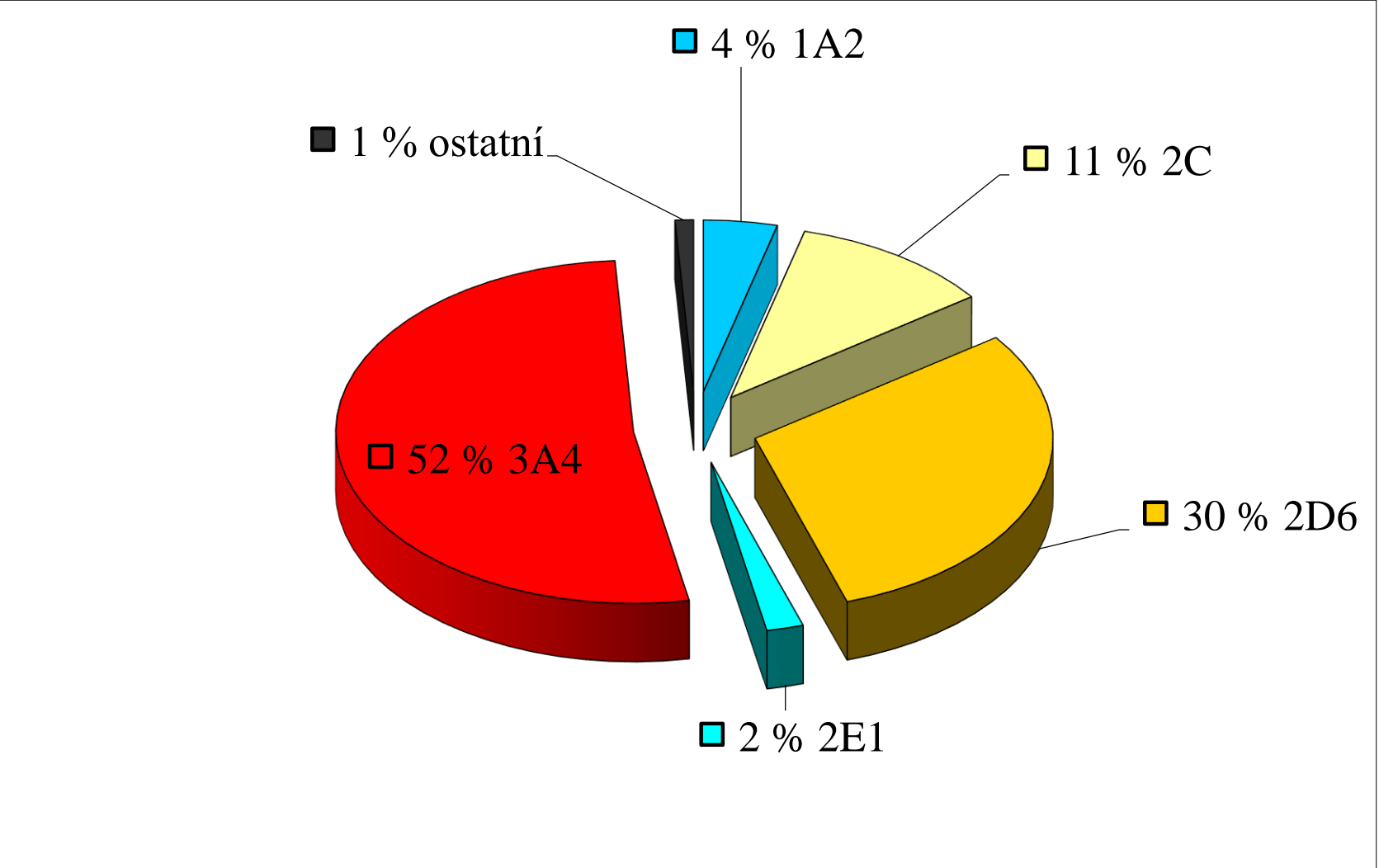
Enzymy I. fáze jsou poměrně nespecifické – **výhoda !!**

Cytochromy P-450 (CYP)

- Skupina (nadrodina) **hemových** enzymů (velké množství izoformem)
- Mohou katalyzovat různé typy reakcí, hlavně **hydroxylaci**
- Široká a překrývající se substrátová specifita - **výhoda**
- Mohou být indukovány a inhibovány
- Obsaženy ve všech tkáních (kromě svalů a erytrocytů)
- Nejvíce zastoupené v **játrech** (ER)
- Vykazují genetický polymorfismus – atypická biotransformace léčiv

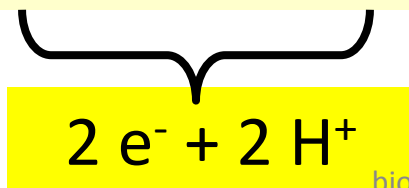
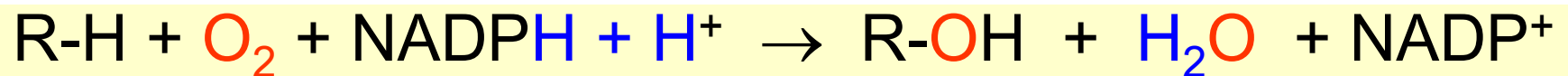
Vysvětlení zkratky: P = pigment, 450 = vlnová délka (nm), při které enzym výrazně absorbuje po navázání oxidu uhelnatého CO

Podíl isoformem CYP na metabolismu léčiv

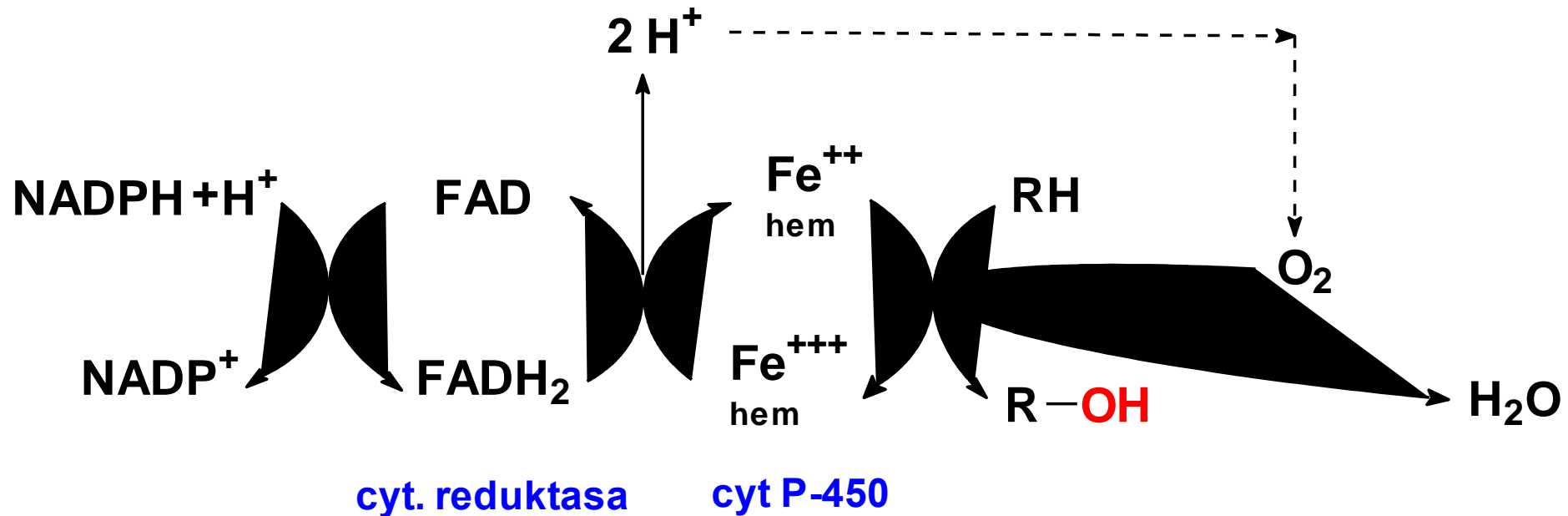


Mechanismus hydroxylace působením CYP

- vznik hydroxylové skupiny (R-H → R-OH)
- jsou to monooxygenasy, z molekuly O₂ se inkorporuje jeden atom O do substrátu, mezi C a H
- druhý atom O vytváří vodu, donorem 2H je NADPH + H⁺
- dochází k redukci dikyslíku na -OH skupinu a vodu



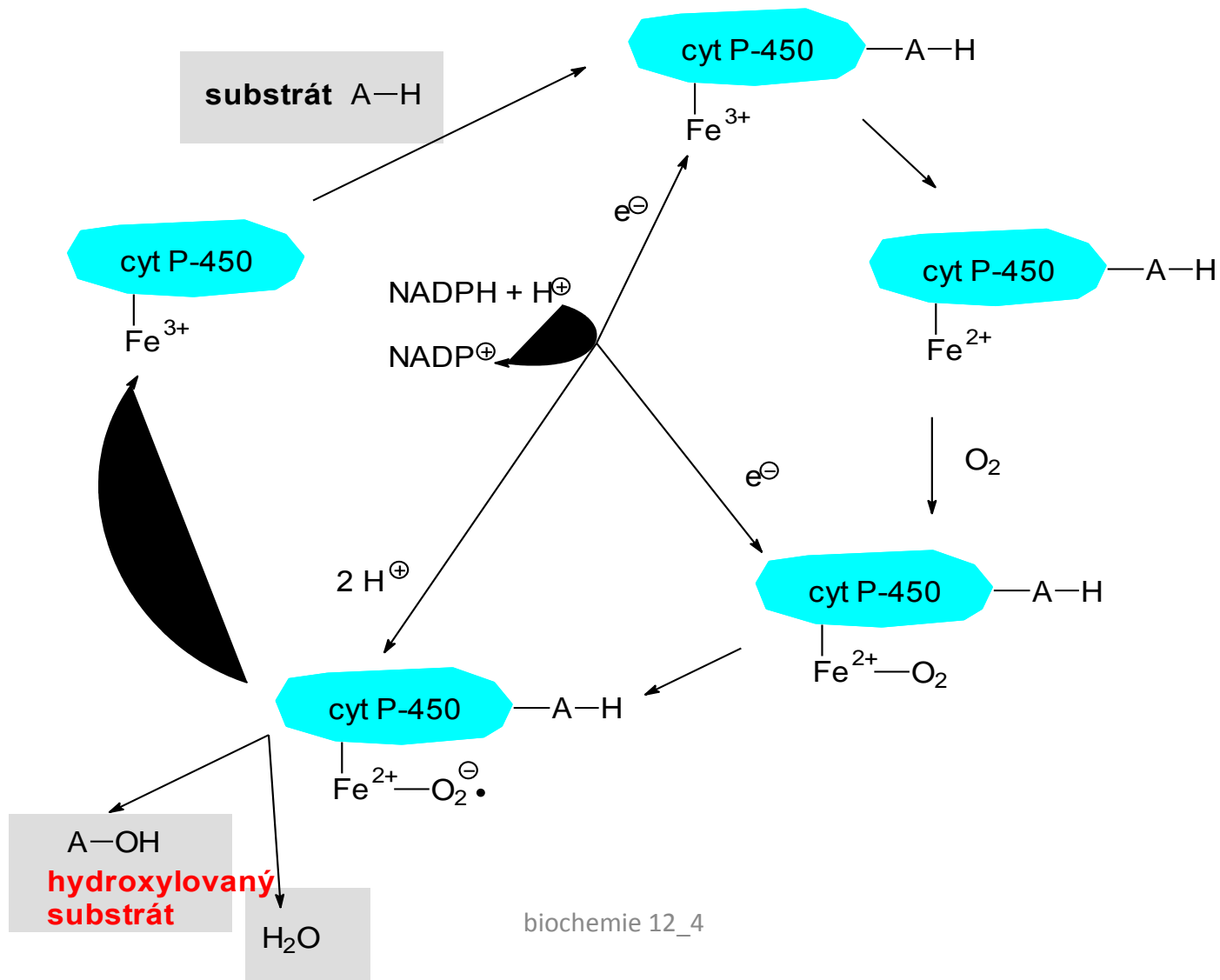
Složky systému cytochromu P-450



Systém cytochromu P-450 je složen ze:

- dvou enzymů a tří kofaktorů (NADPH, FAD, hem)
- NADPH:CYP **reduktasa** (dělič elektronového páru, $2 \text{ H} \rightarrow 2 \text{ e}^- + 2 \text{ H}^+$)
- cytochrom P-450 (**hydroxylasa**)

Podrobnější schéma hydroxylace ukazuje aktivaci a redukci O₂



Hydroxylace účinkem CYP nastává
endogenních i exogenních substrátů

- Endoplazmatické retikulum:

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

- Mitochondrie:

steroidní hormony

Srovnání různých hydroxylačních reakcí

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

Hlavní izoformy cytochromu P-450

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

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

^a Pouze vybrané příklady z mnoha existujících. ^b 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**

Mechanismy indukce CYP

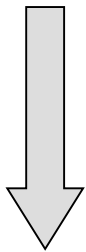
induktor (komplex s intracelulárním receptorem):

- váže se na DNA a zvyšuje transkripci mRNA = stimulace syntézy CYP
- snižuje rychlost degradace mRNA a/nebo CYP
- ovlivňuje posttranskripční modifikace mRNA
- může vyvolat hypertrofii ER

Genetický polymorfismus CYP450 a klinický účinek

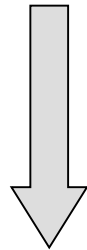
Průměrná dávka léčiva

Pomalý
metabolizátor



vyšší hladiny léku
nežádoucí účinky
toxicita

Střední (Rychlý)
metabolizátor



většina populace

normální odpověď
klinický účinek léčiva

Ultrarychlý
metabolizátor

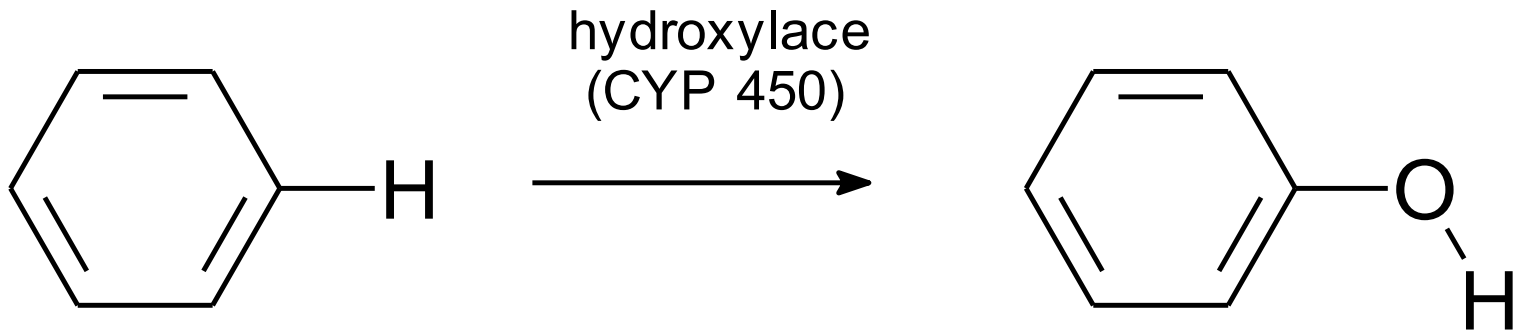


žádný / nedostatečný
efekt

Př. warfarin
krvácivé stavy

Problém:
psychofarmaka

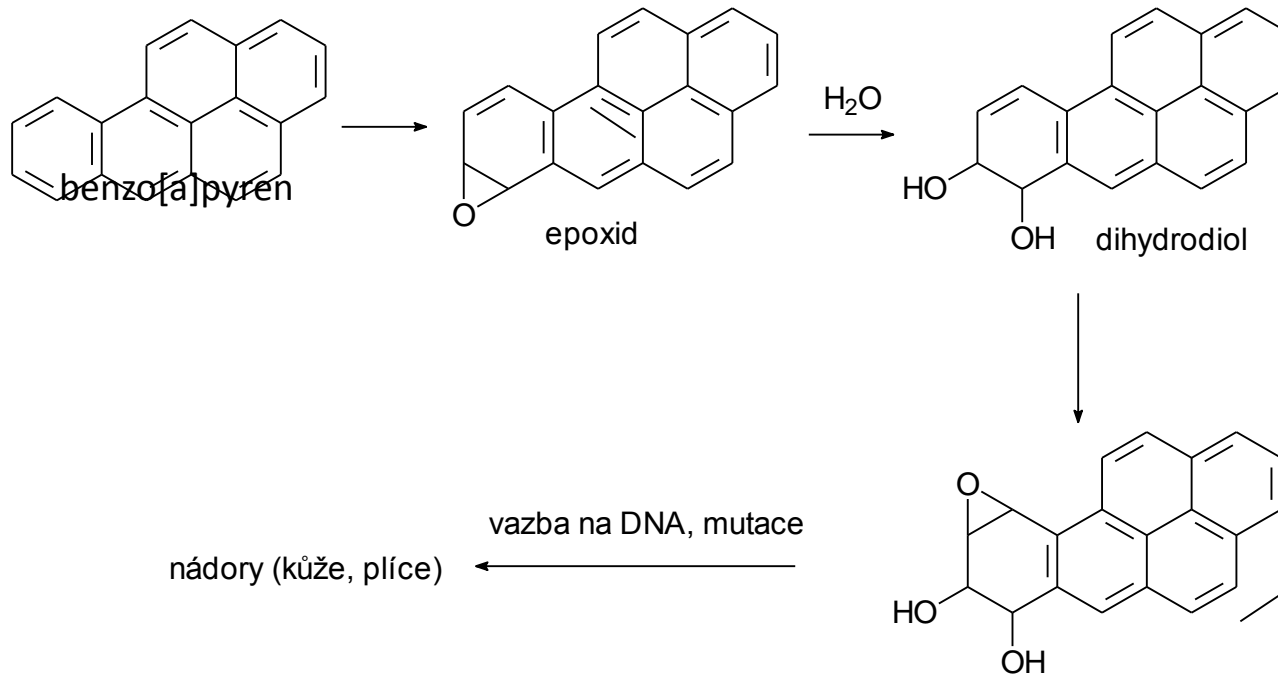
Biotransformace benzenu



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

Příklad

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 ...

Co vzniká spalováním

Materiál	Toxické produkty spalování
PVC	Dioxiny
Polystyrén	Styrén
PET lahve	Polycyklické aromatické uhlovodíky
Dřevo z demolice, nábytku	Dioxiny
Zbytky jídla, tráva, listí ...	Dioxiny
Barevné časopisy	Těžké kovy
Tetrapak	Chlororganické látky, těžké kovy
Pneumatiky	Polycyklické aromatické uhlovodíky

II. Fáze biotransformace

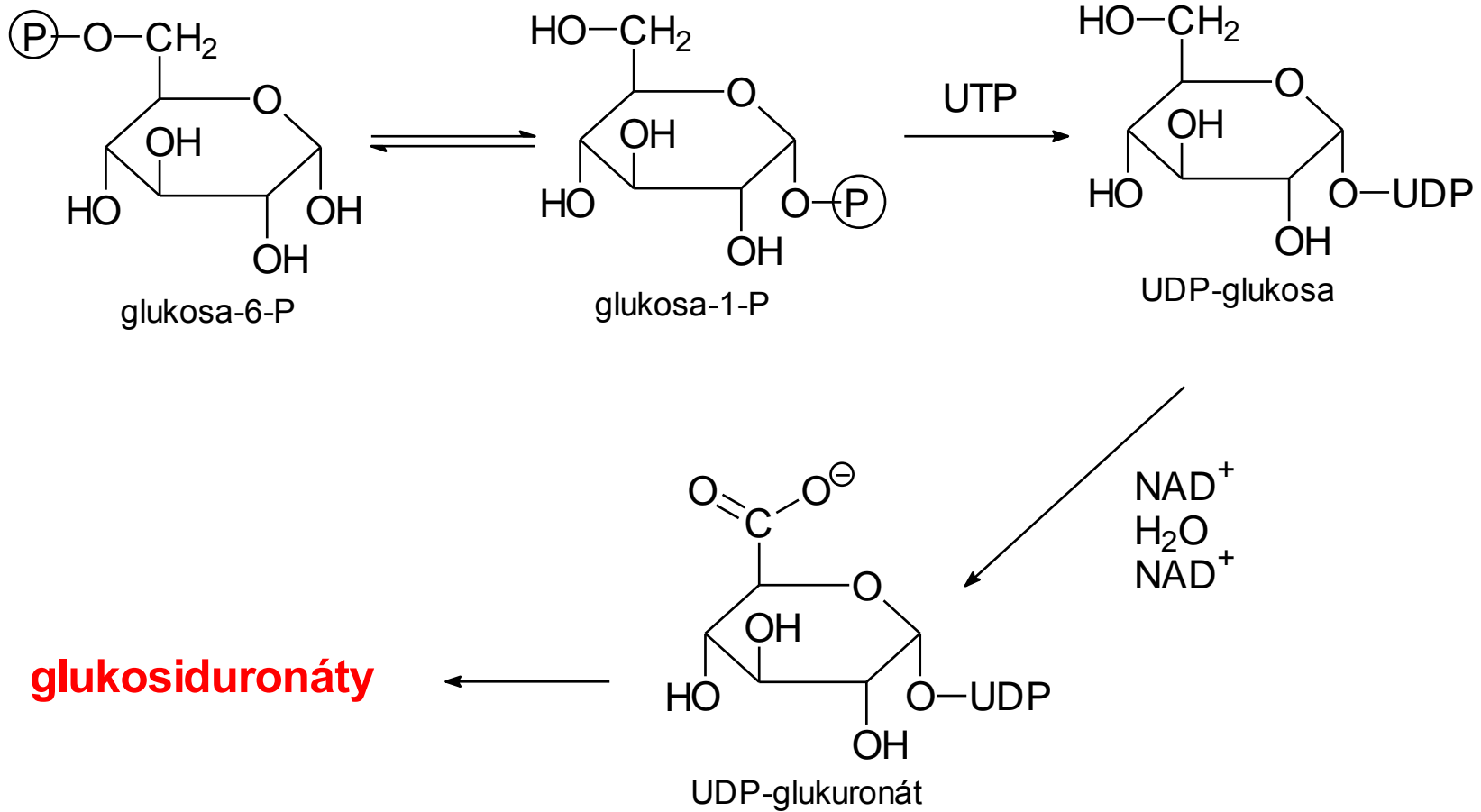
- **Konjugace** - syntetický charakter
- Xenobiotikum po I. fázi biotransformace reaguje endogenní konjugační složkou
- Vzniká konjugát, polárnější – snadno se vylučuje močí/žlučí
- **Endergonní charakter** - nutná energie (reaguje aktivovaná konjugační složka nebo aktivované xenobiotikum)
- Enzymy -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

S

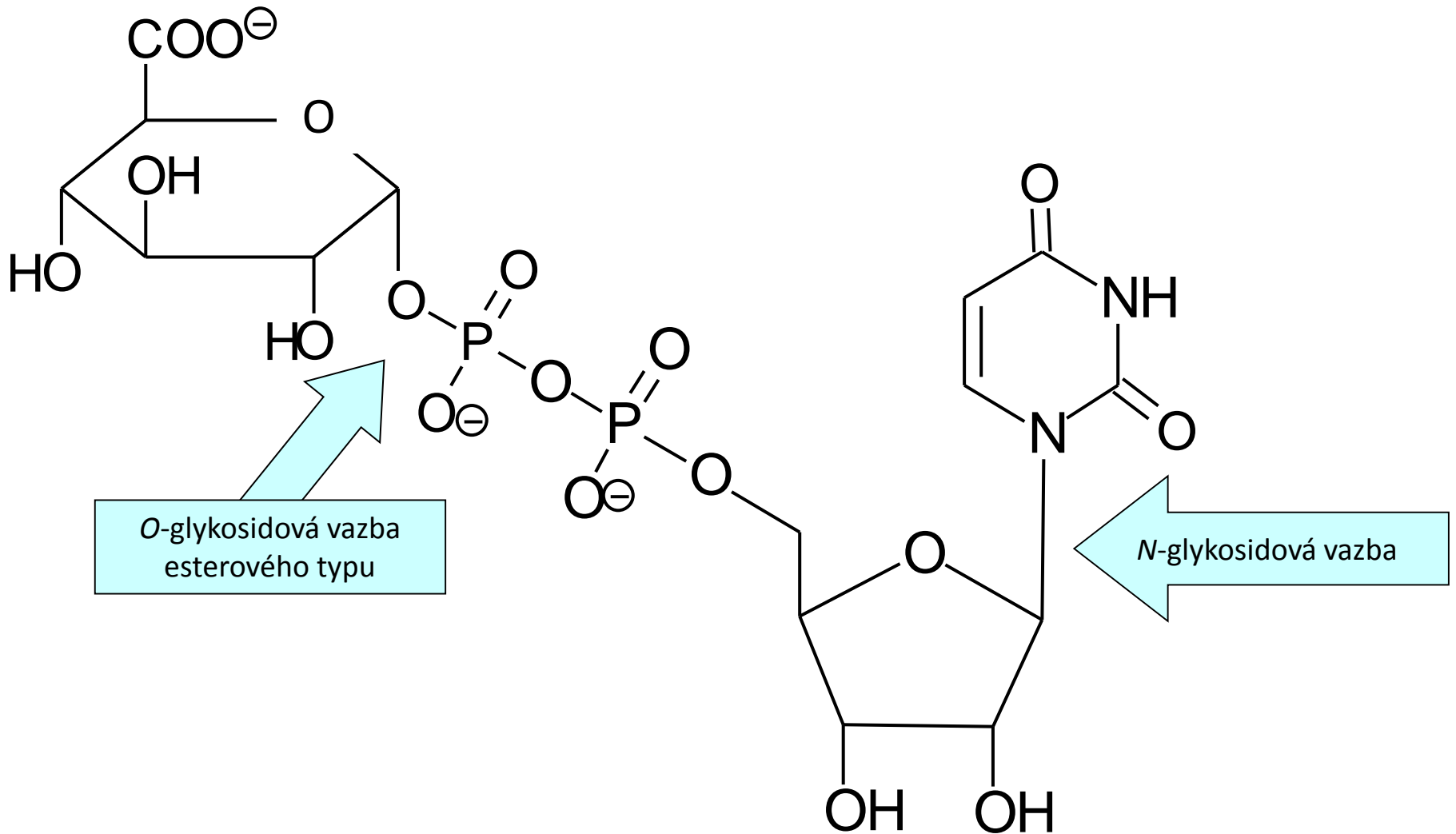
Přehled konjugačních činidel

Typ konjugace	Konjugační činidlo	Skupina v xenobiotiku
Glukuronidace	UDP-glukuronát	-OH, -COOH, -NH ₂
Sulfatace	PAPS	-OH, -NH ₂ , -SH
Methylace	SAM	-OH, -NH ₂
Acetylace	acetyl-CoA	-OH, -NH ₂
Glutathionem	glutathion	Ar-Hal, Ar-epoxydy
Aminokyselinou	glycin, taurin	-COOH

Biosyntéza UDP-glukuronátu

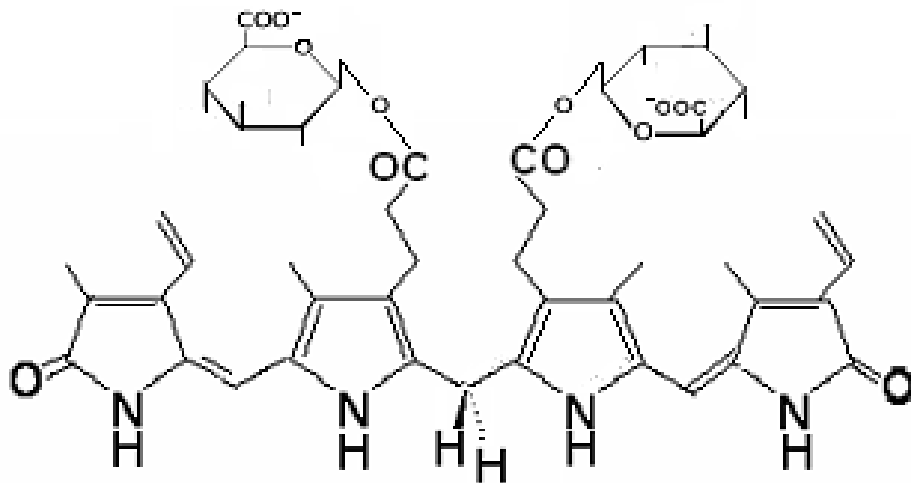


UDP-glukuronát

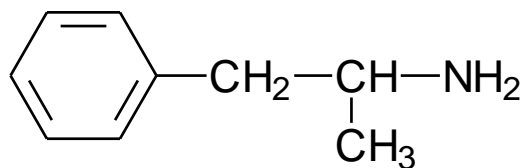


Glukuronáty jsou nejčastější konjugáty

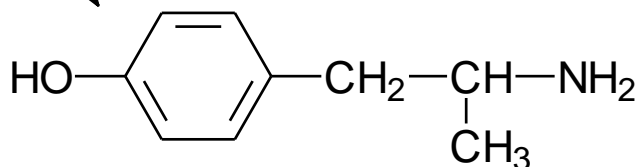
- Vznikají *O*-glukosiduronáty
etherový typ (Ar-O-glukuronát, R-O-glukuronát)
esterový typ (Ar-COO-glukuronát)
- *N*-, *S*-glukosiduronáty
- Substráty: arom. aminy, amfetaminy, kys. salicylová, léčiva, flavonoidy, ...
- Endogenní substráty: bilirubin, steroidy



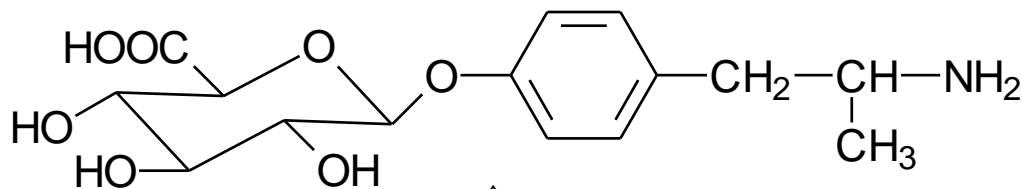
Biotransformace amfetaminu



I. fáze



II. fáze

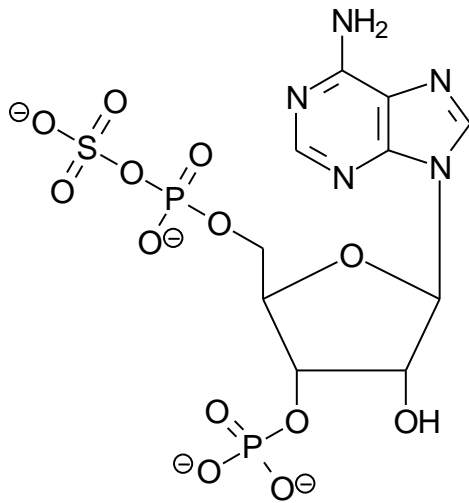


O-glukosiduronát
etherového typu

Příznaky užívání: neklid, euforie, upovídanost, třes, nespavost, pocení, sucho v ústech, rozšířené zřetelnice, hubnutí, úzkostné stavy, paranoia, halucinace

PAPS je sulfatační činidlo

(phospho adenosine phospho sulfate)



Fyziologické sulfatace:

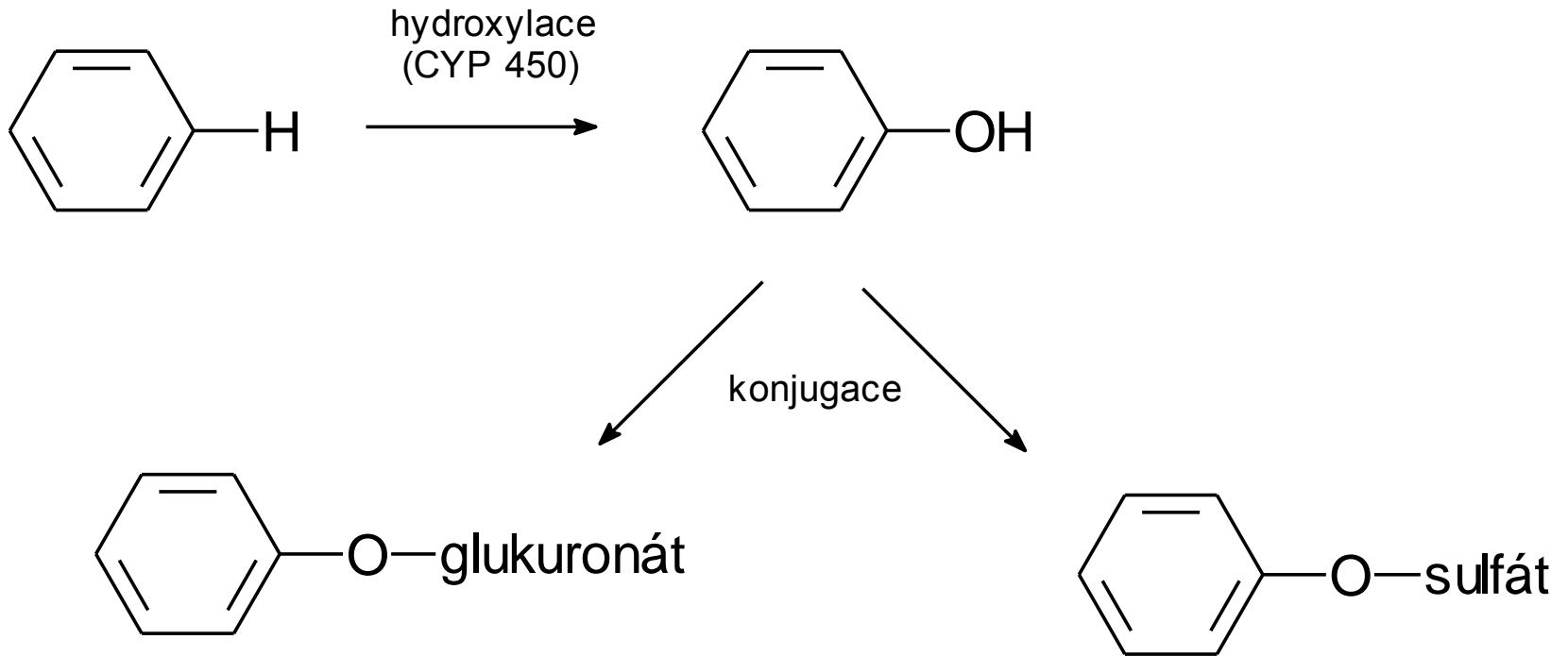
Glykosaminoglykany

heparin, dermatansulfát,
keratansulfát, chondroitinsulfát

Sulfoglykosfingolipidy

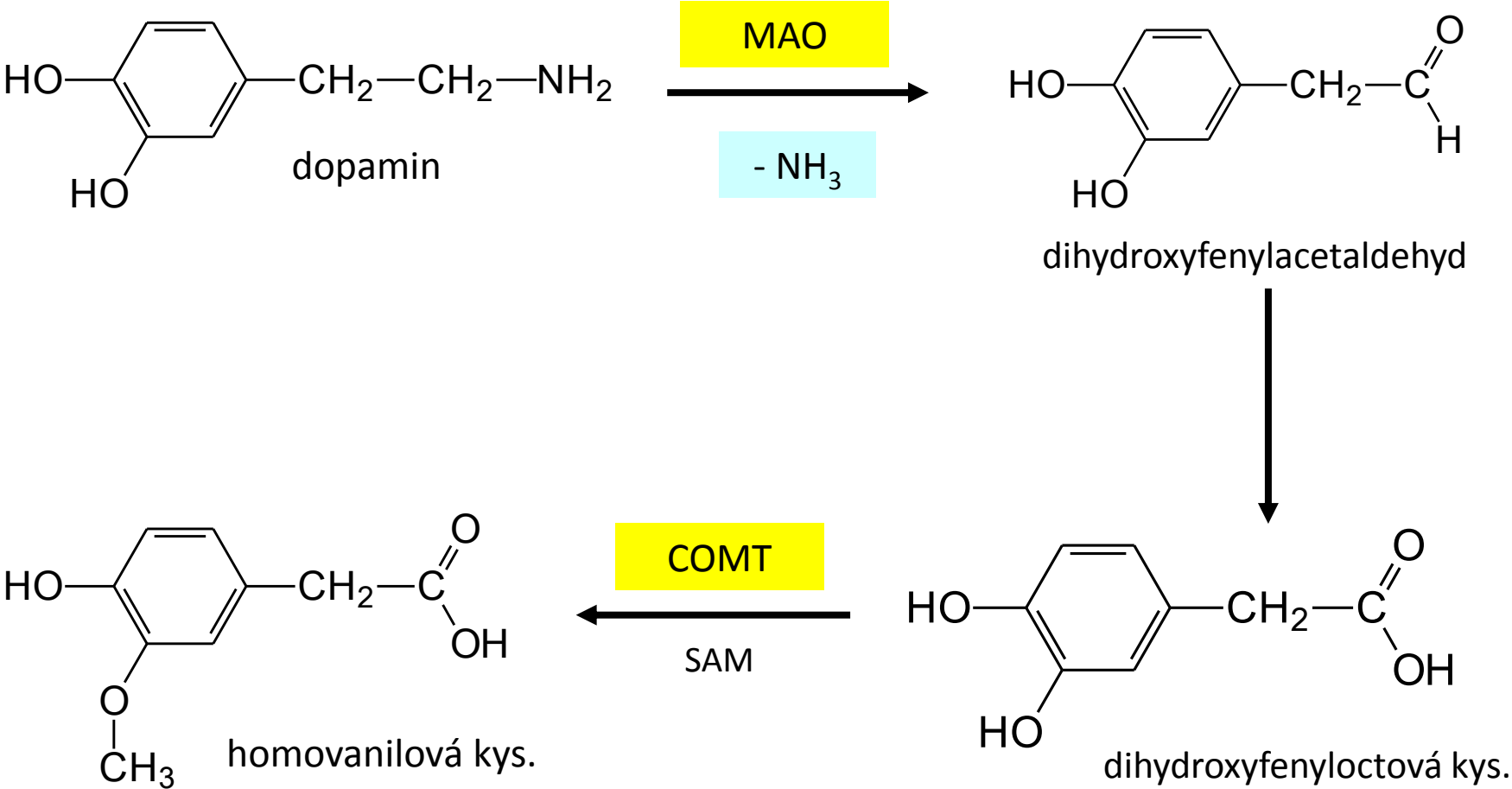
(kyselá glykolipidy, sulfatidy)

Konjugace fenolu



Methylace je součástí inaktivace katecholaminů a estrogenů

MAO monoaminoxidasa, COMT katechol-*O*-methyltransferasa



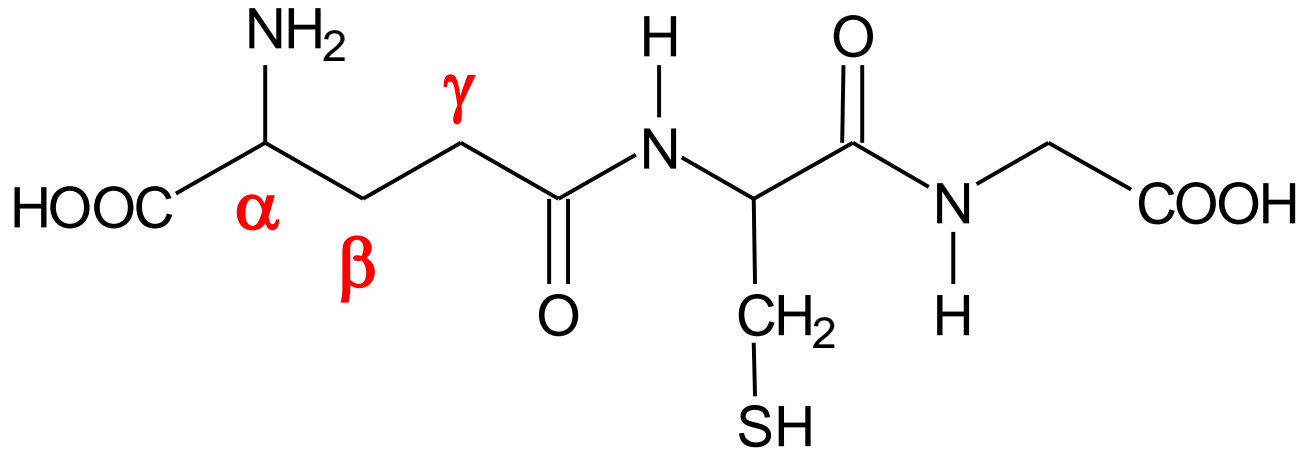
Inaktivace může probíhat i v opačném pořadí: nejdříve COMT, pak MAO, výsledný produkt je stejný.

Glutathion má trojí význam

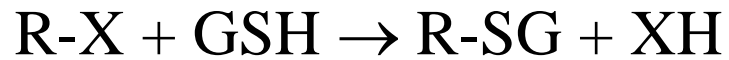
γ -glutamylcysteinylglycin

- **Redukční činidlo** (glutathionperoxidasa)
- **Konjugační činidlo** (glutathiontransferasa)
Endogenní substráty – konjugace leukotrienů
- **Transport AK do buněk** (γ -glutamyltransferasa)

Glutathion (GSH)



elektrofilní
centrum

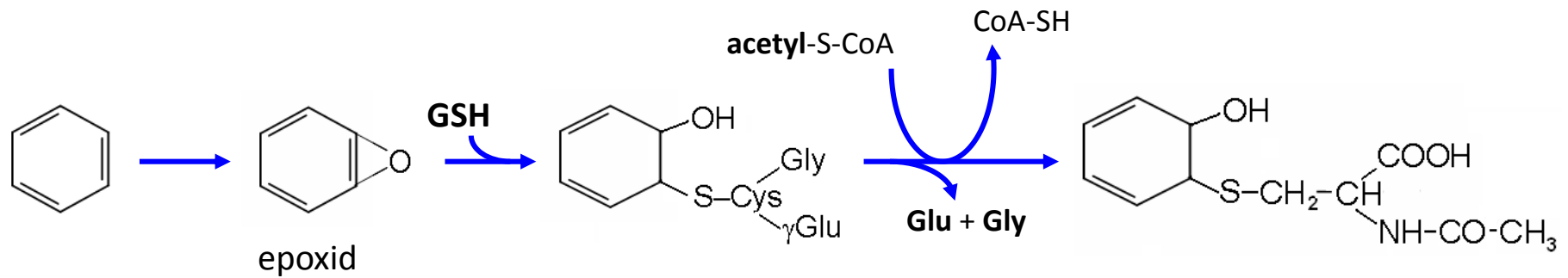


(R-X epoxidy, halogenalkany)

nukleofilní
skupina

Příklad

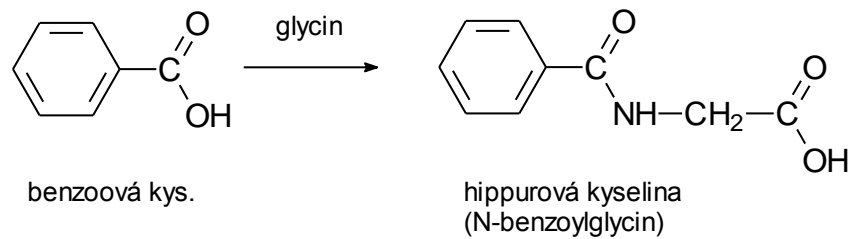
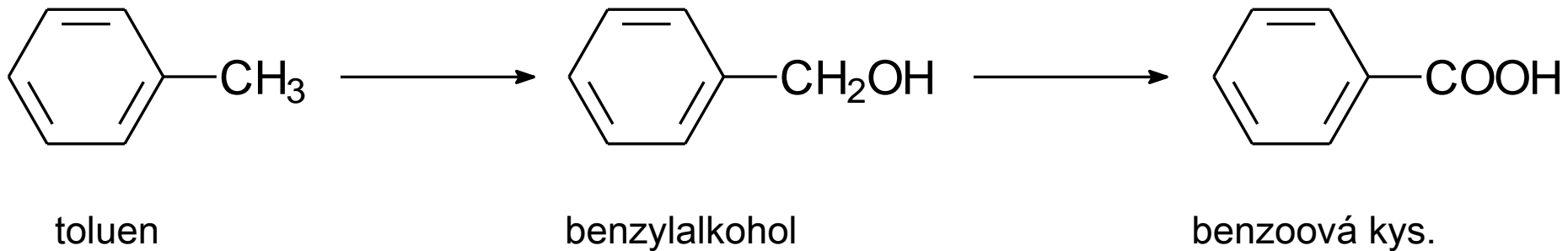
Před exkrecí vznikají z R-SG merkapturové kyseliny



N-acetyl-S-substitovaný cystein
(merkapturová kyselina)

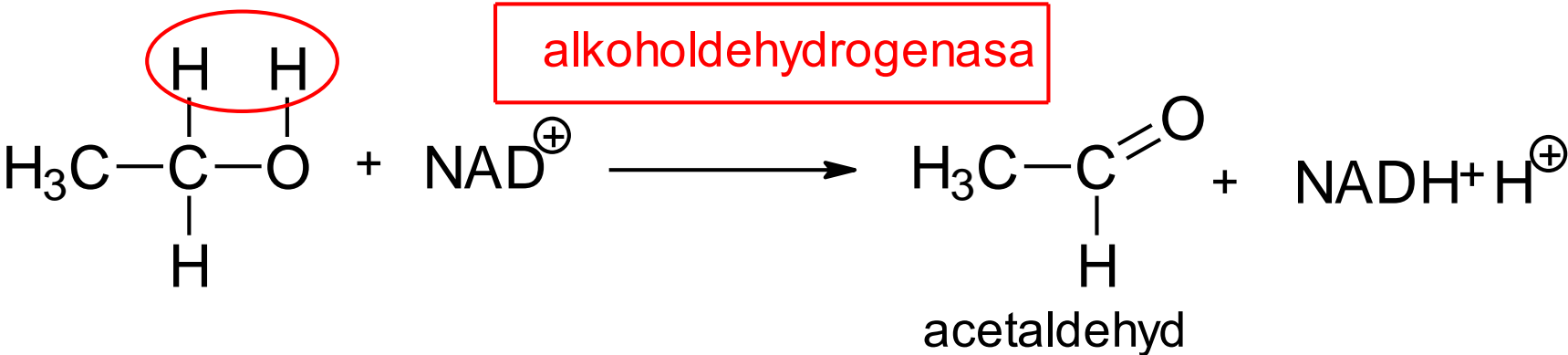
Konjugace aminokyselinami

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

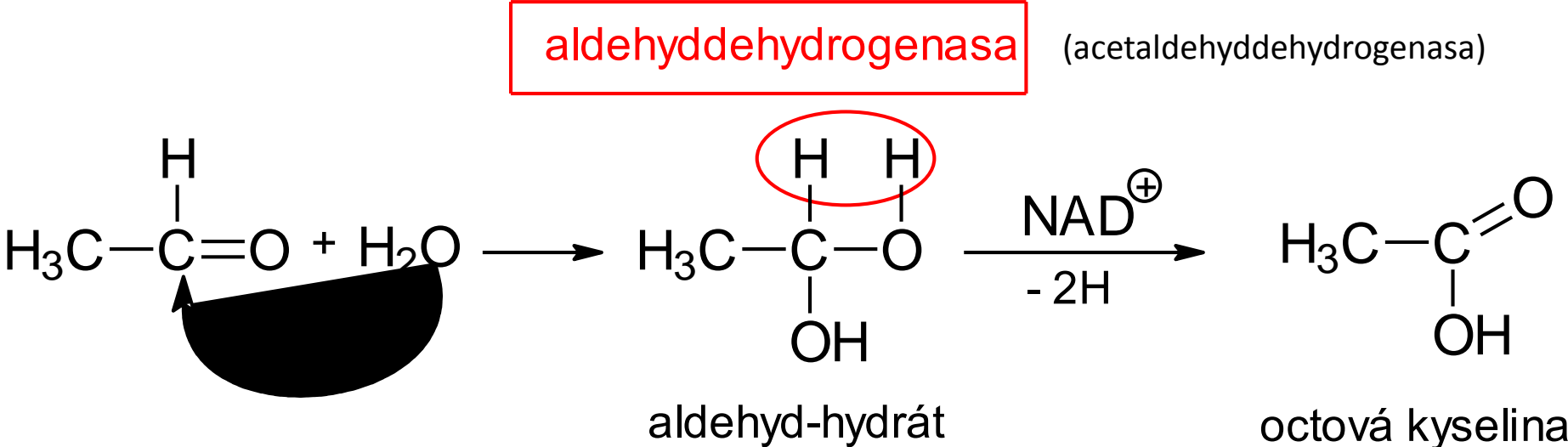


aktivovaná navázáním
na CoA: benzoyl-CoA

Biotransformace ethanolu v játrech (cytosol)



TEST

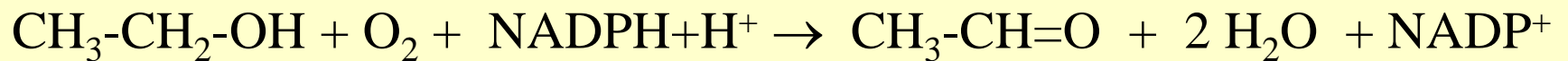


- **Alkoholdehydrogenasa (AD)** – metaloenzym (Zn), více molekulových forem, v játrech, plicích, ledvinách, GIT, a dalších tkáních
- Žaludeční forma je výrazně aktivnější u mužů než u žen
- **Acetaldehyddehydrogenasa (AcD)** – více forem, játra, cytosol i mitochondrie

Další dráhy biotransformace ethanolu

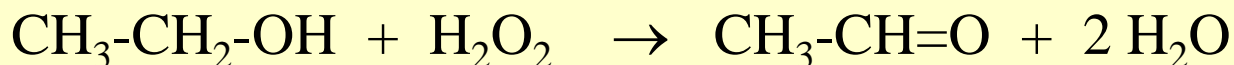
ER hepatocytu:

MEOS (mikrosomální ethanol oxidující systém, CYP2E1)

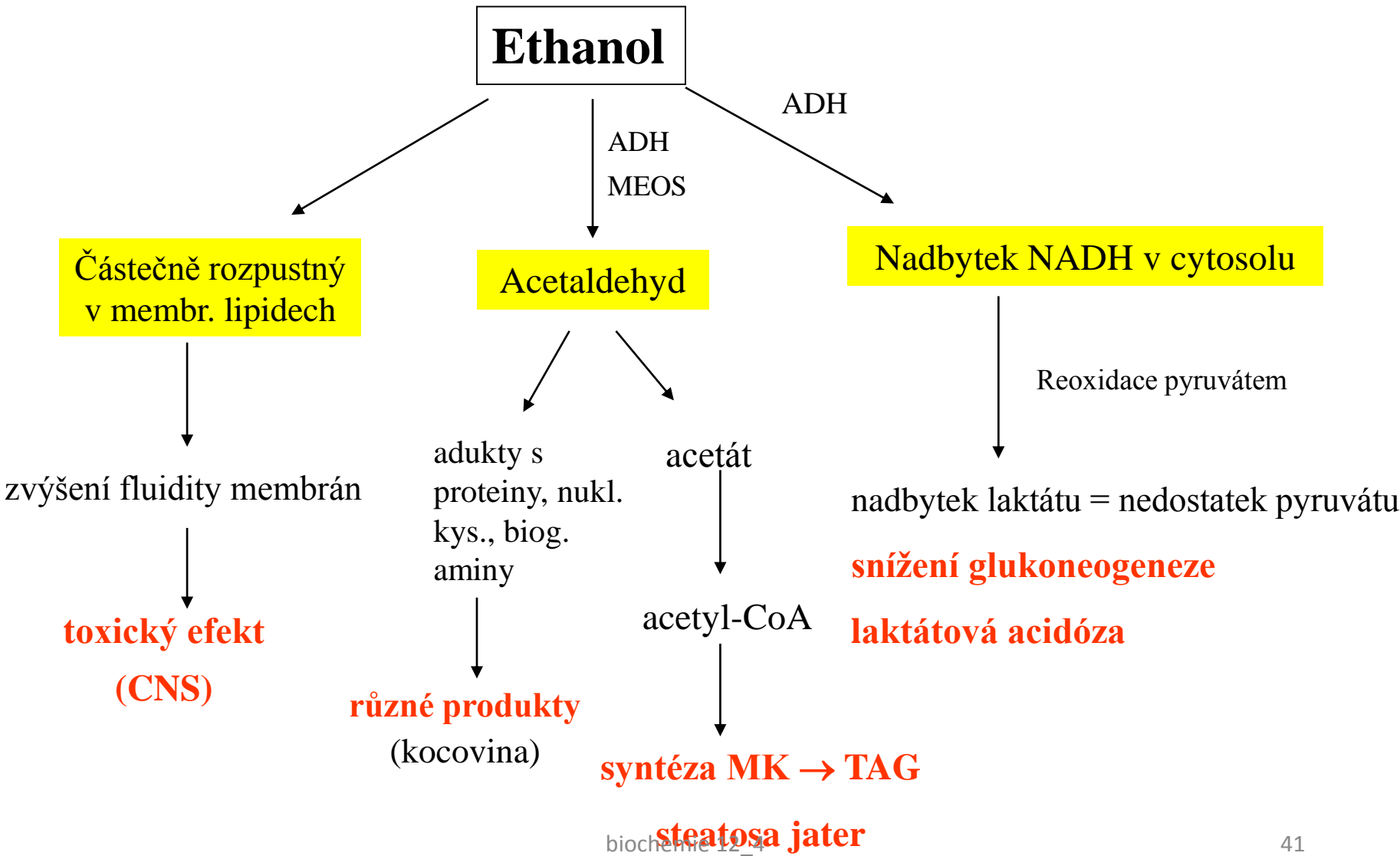


Tento systém se aktivuje až při zvýšené konzumaci alkoholu
= vyšší hladiny (> 0,5 ‰) \Rightarrow **zvýšená produkce acetaldehydu**

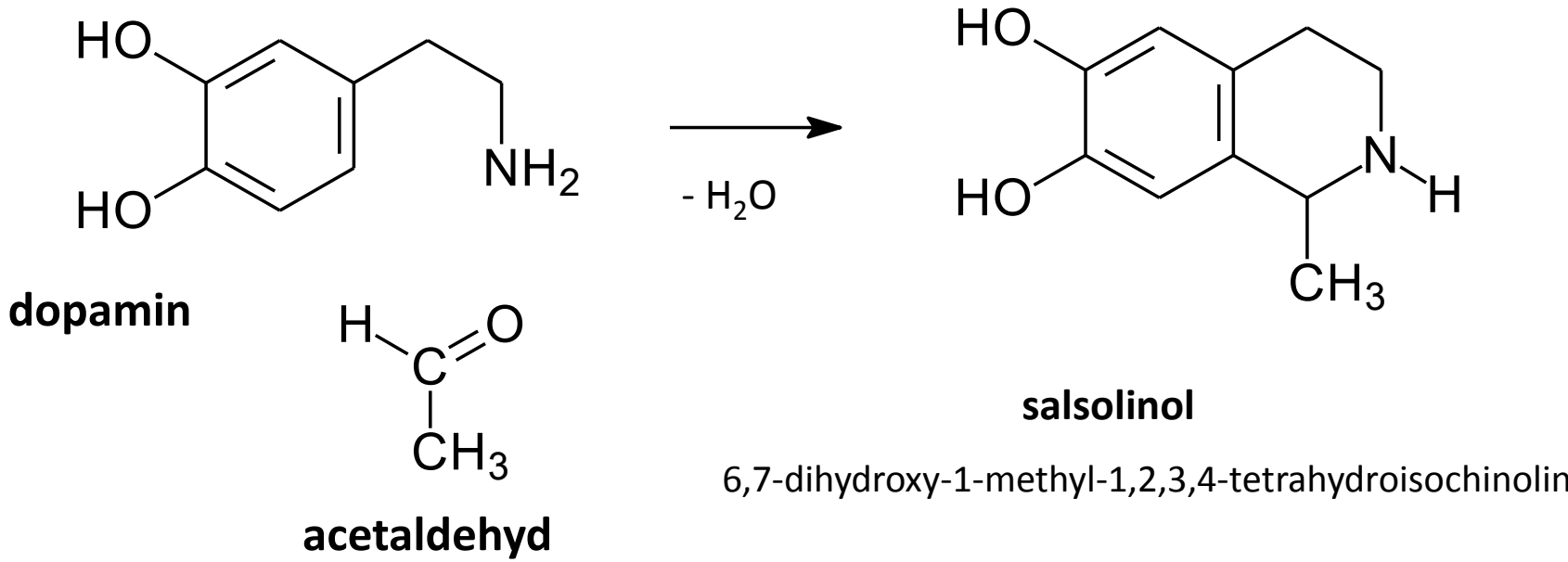
Peroxisomy: oxidace ethanolu za účasti peroxidu vodíku, **katalasa**



Důsledky biotransformace ethanolu



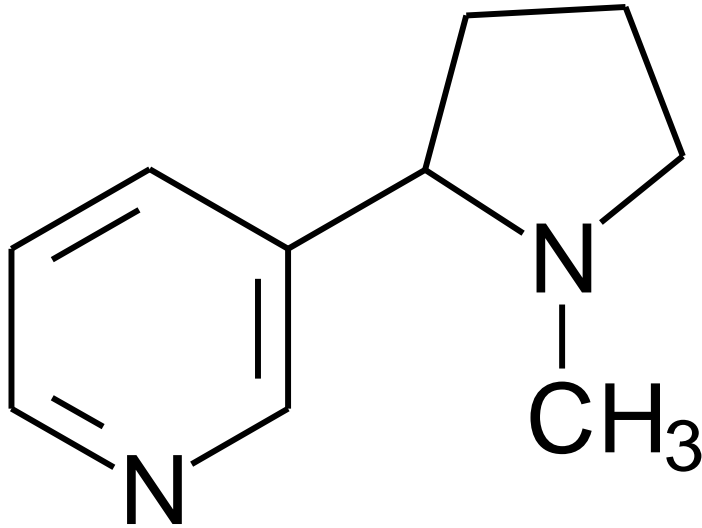
Reakcí acetaldehydu s biogenními aminy vznikají deriváty tetrahydroisochinolinu (tzv. živočišné alkaloidy)



Tabák

Látky	nikotin, produkty nedokonalého spalování
Účinky	euforie, psychická relaxace, zvýšení tepové frekvence, vazokonstrikce, stimuluje sekreci adrenalinu („tichý stres“), zvyšuje sekreci slin a žaludeční šťávy, zesiluje střevní peristaltiku (defekační účinek první ranní cigarety)
Příznaky užívání	typický zápach, zažloutlé prsty a zuby
Rizika	plicní choroby (CHOPN, nádory), infarkt, vředová choroba žaludku, poruchy potence, předčasné vrásky

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?

sušený tabák podléhá nedokonalému spalování, vzniká složitá směs produktů

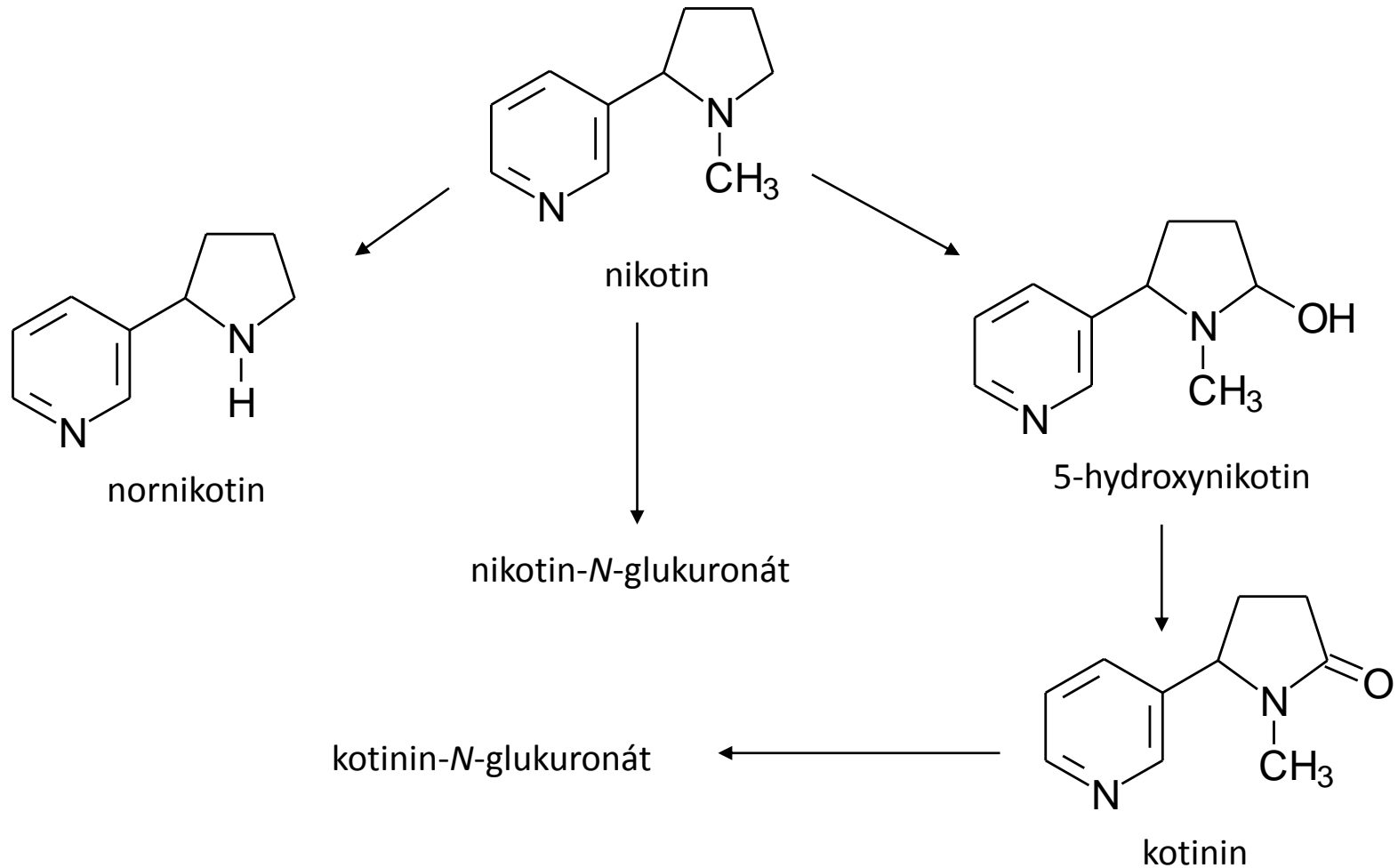
nikotin částečně destiluje a přechází do kouře (aerosolu),

částečně se pyrolyticky rozkládá

Cigaretový kouř obsahuje

- **volný nikotin (bázi)** - váže se na nikotinové receptory v mozku, dřeni nadlehin a jinde
- **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 SCN^- vzniká biotransformací CN^-

(síra pochází z katabolismu cysteinu)

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

2. nikotin v moči

3. minoritní alkaloidy tabáku a metabolity nikotinu v moči

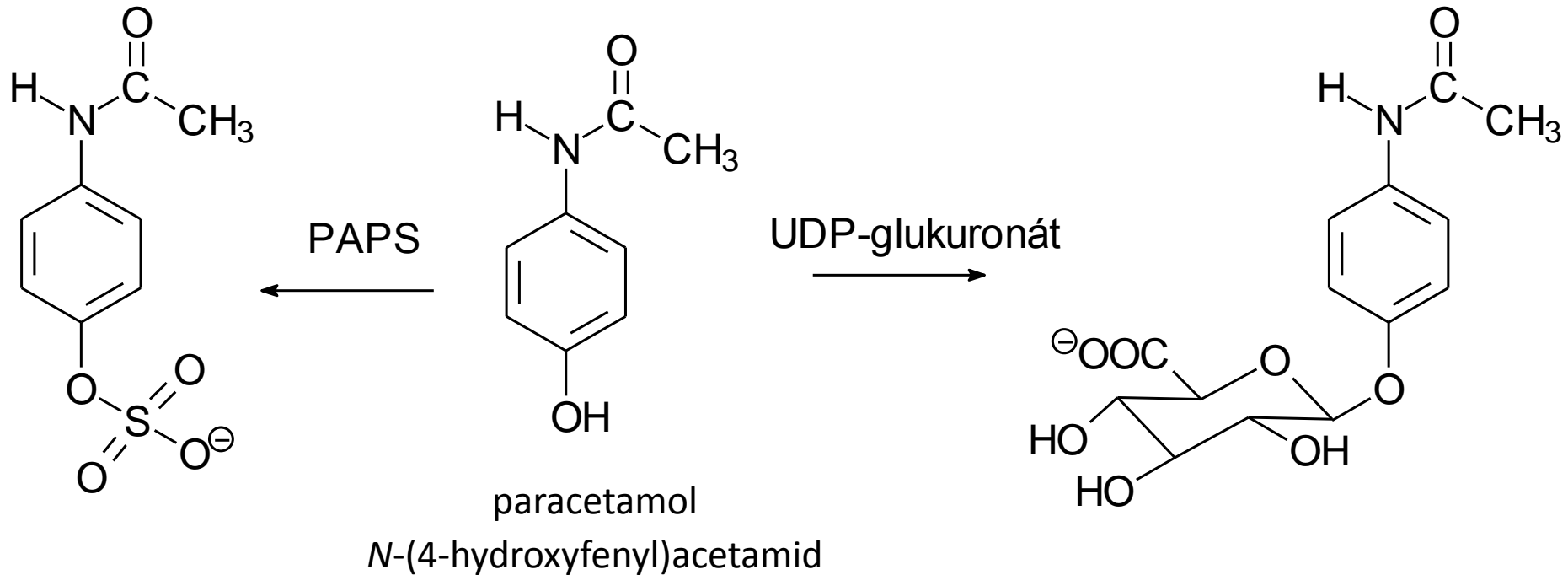
(kotlinin, nornikotin, anatabin, anabasin)

Biotransformace vybraných léčiv

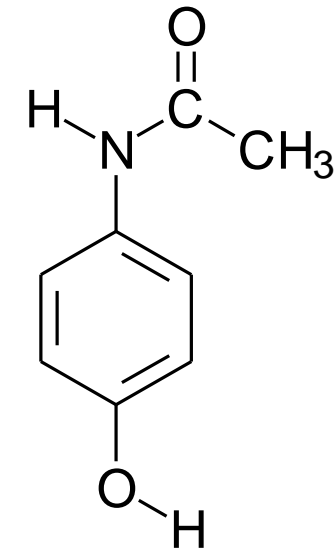
Léčivo	Biotransformace	Metabolit
Diazepam	hydroxylace, demethylace	oxazepam (aktivní stejně)
Kodein	demethylace	morfin (aktivní jinak)
Bromhexin	hydroxylace, demethylace	ambroxol (aktivní)
Paracetamol	konjugace, oxidace	různé konjugáty (neaktivní) ^a
Acetylsalicylová k.	hydrolýza, hydroxyl., konjug.	různé konjugáty (neaktivní)

^a Situace může být složitější, viz dále

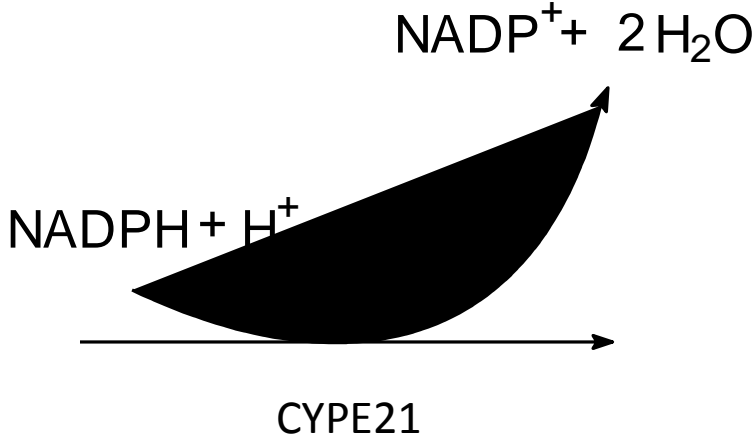
Hlavní dráha biotransformace paracetamolu je konjugace



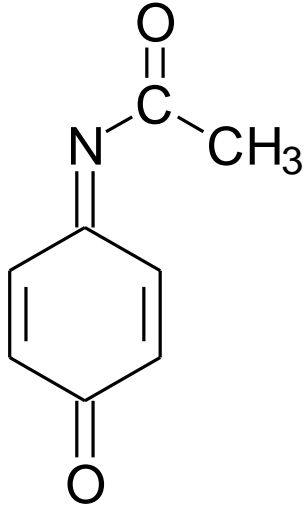
Vedlejší dráha biotransformace paracetamolu vede k hepatotoxickému chinoniminu



paracetamol



indukovaný alkoholem

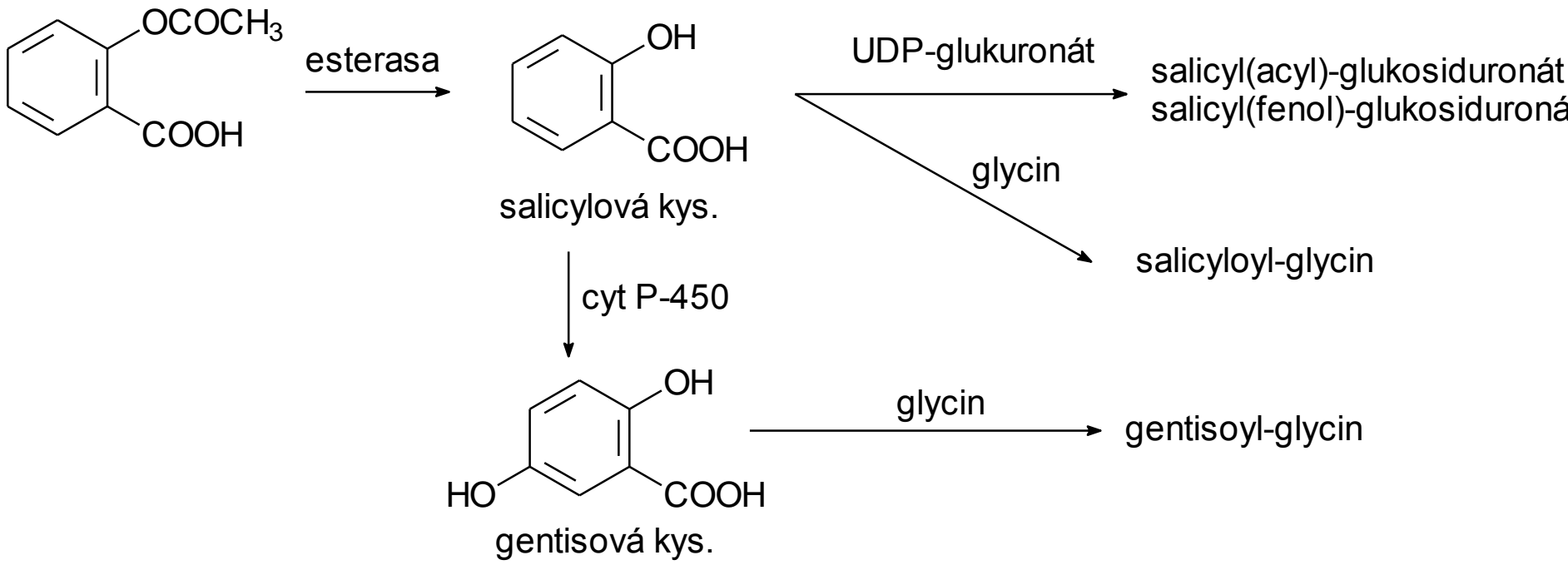


N-acetylbenzochinonimin
(hepatotoxický)

váže se na buněčné proteiny - nekróza

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

Biotransformace acetylsalicylové kyseliny



Polypragmazie a její důsledky

- **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 μ kat/l	↑
GMD	0,1 - 0,7 μ kat/l	↑
GMT	0,1 - 0,7 μ kat/l	↑
Bilirubin	5 - 20 μ mol/l	↑
Amoniak	5 - 50 μ mol/l	↑
Urobilinogeny (moč)	do 17 μ mol/l	↑
-----	-----	-----
Cholinesterasa (CHS)	65 - 200 μ kat/l	↓
Močovina	3 - 8 mmol/l	↓
Albumin	35 - 53 g/l	↓

Jak odhalit alkoholika?

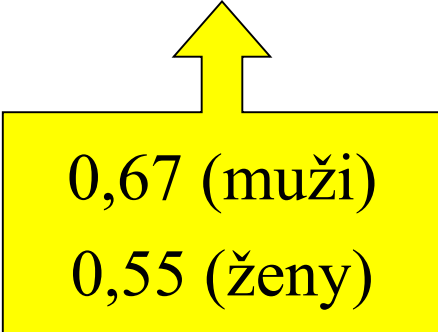
- Enzymy: AST, ALT, GMD, GMT↑, CHS ...↓
- **CDT** (carbohydrate-deficient transferrin, bezsacharidový transferrin)
molekula transferrinu obsahuje 4-6 sialových kys. Chronický abusus alkoholu narušuje glykosylaci transferrinu, vzniká CDT = formy transferrinu s 0-2 sial. kys. Zvýšená hodnota CDT = marker vydatného požívání EtOH během uplynulých 4 týdnů (kontrola abstinence u léčených ethyliků)
- **FAEE (fatty acids ethyl esters)** přetrvávají v krvi až 24 hod poté, co klesne hladina EtOH na nulu (význam u dopravních nehod)
- **Ethylglukosiduronát** (EtG) přetrvává až 5 dní
- **Fosfatidylethanol** (PEth) přetrvává až 3 týdny

Hladina alkoholu v krvi se vypočte z poměru hmotnosti alkoholu (g) a celkové tělesné vody (kg)

$$\text{alkohol v krvi (‰)} = \frac{m_{\text{alkohol}}(\text{g})}{m_t(\text{kg}) \times f}$$

Charakteristika	Muži	Ženy
Celková tělesná voda	60 – 67 %	50 - 55 %
Celkový tělesný tuk	10 – 20 %	20 – 30 %

0,67 (muži)
0,55 (ženy)

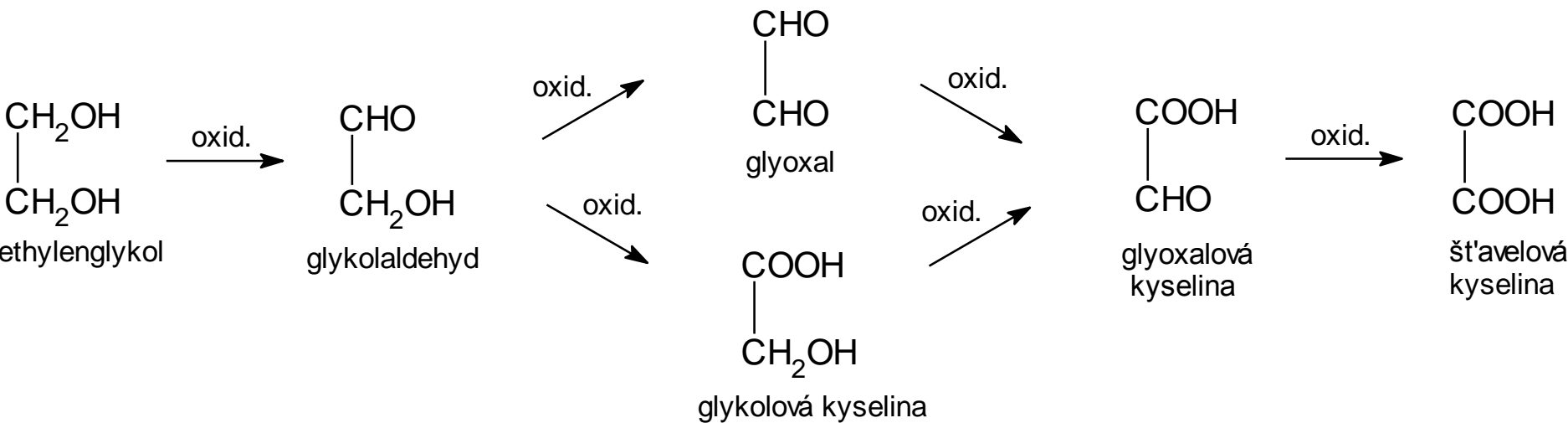


Jazyková poznámka: kocovina

Etymologie slova je nejasná, uvádějí se tři různé výklady

- podle mladoboleslavského hejtmana *Kotze* (1848)
 - proti němu četné výtržnosti zvané lidově kočičiny
- z něm. *Katzenjammer* (kočičí bédování)
- z něm. *kotzen* (zvracet)

Biotransformace ethylenglykolu



Otrava ethylenglykolem může mít fatální průběh