

# Xenobiotika a jejich účinky na organismus. Detoxikace, mechanismus.

# 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 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 ⇒ 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

# ABC transportéry (ATP binding cassettes)

Nadrodina transmembránových proteinů, které mají doménu pro vazbu určitého substrátu a doménu pro ATP. Po vazbě ATP získá transportér schopnost pumpovat ligand přes membránu.

Lidský genom obsahuje nejméně 49 genů pro ABC transportéry. ABC kasety u savců mohou být jak v plazmatických, tak v intracelulárních membránách a umožňují přenos různých typů lipidů, peptidů, různých toxických organických molekul a chemoterapeutik.

- Jednou skupinou ABC transportérů u člověka jsou P-glykoproteiny, označované jako MRP proteiny (multidrug resistance proteins).
- Odstraňují z buněk celou řadu xenobiotik. Při jejich zvýšené expresi u nádorových buněk dochází ke zvýšení rezistenci na léčbu chemoterapeutiky.
- Další MRP proteiny zajišťují eflux látek konjugovaných s glutathionem, sírovou kyselinou a glukuronáty.



# 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
<b>Hydroxylace</b>	(hetero)aromatické sloučeniny ( $\text{Ar-H} \rightarrow \text{Ar-OH}$ )
Sulfooxidace	dialkylsulfid ( $\text{R-S-R}$ ) $\rightarrow$ sulfoxid ( $\text{R-SO-R}$ )
Dehydrogenace	alkohol / aldehyd-hydrát $\rightarrow$ aldehyd / kyselina
Redukce	nitrosloučeniny ( $\text{R-NO}_2$ ) $\rightarrow$ aminy ( $\text{R-NH}_2$ )
Hydrolyza	ester $\rightarrow$ kyselina + alkohol

Reakce probíhají hlavně v ER, některé v cytosolu

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

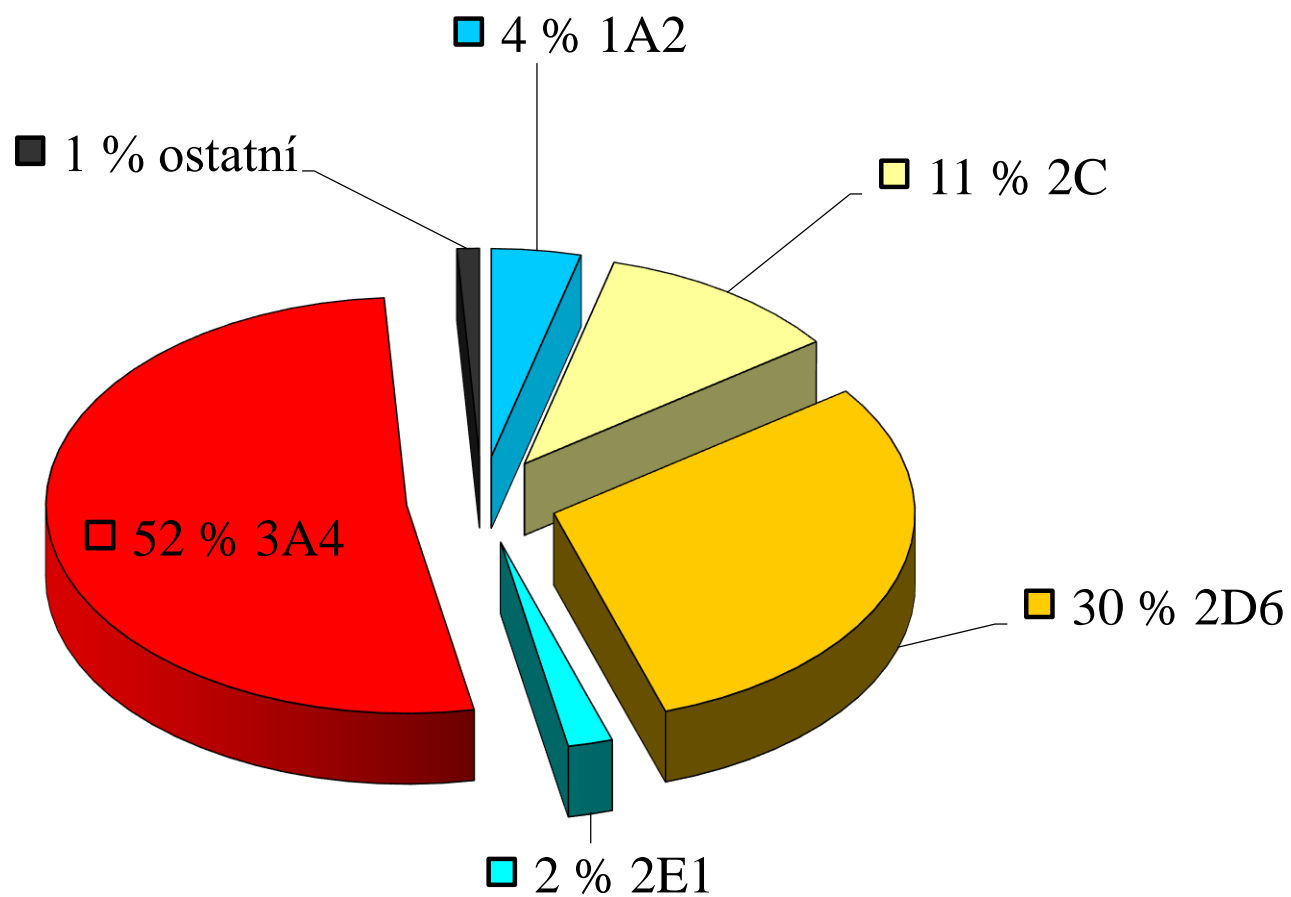
# Cytochromy P-450 (CYP)

- 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**

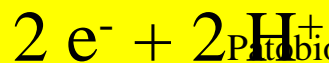
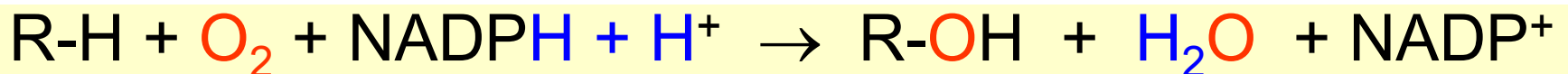
Patobiochemie - xenobiologie

# Podíl isoforem CYP na metabolismu léčiv

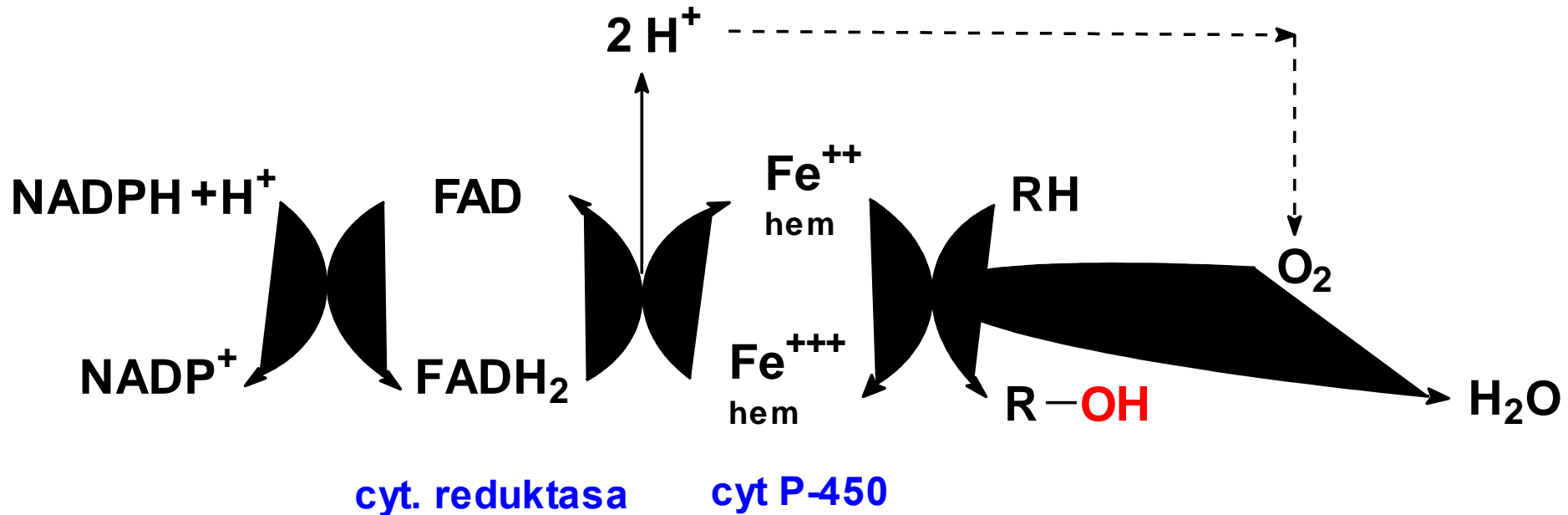


# Mechanismus hydroxylace působením CYP

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



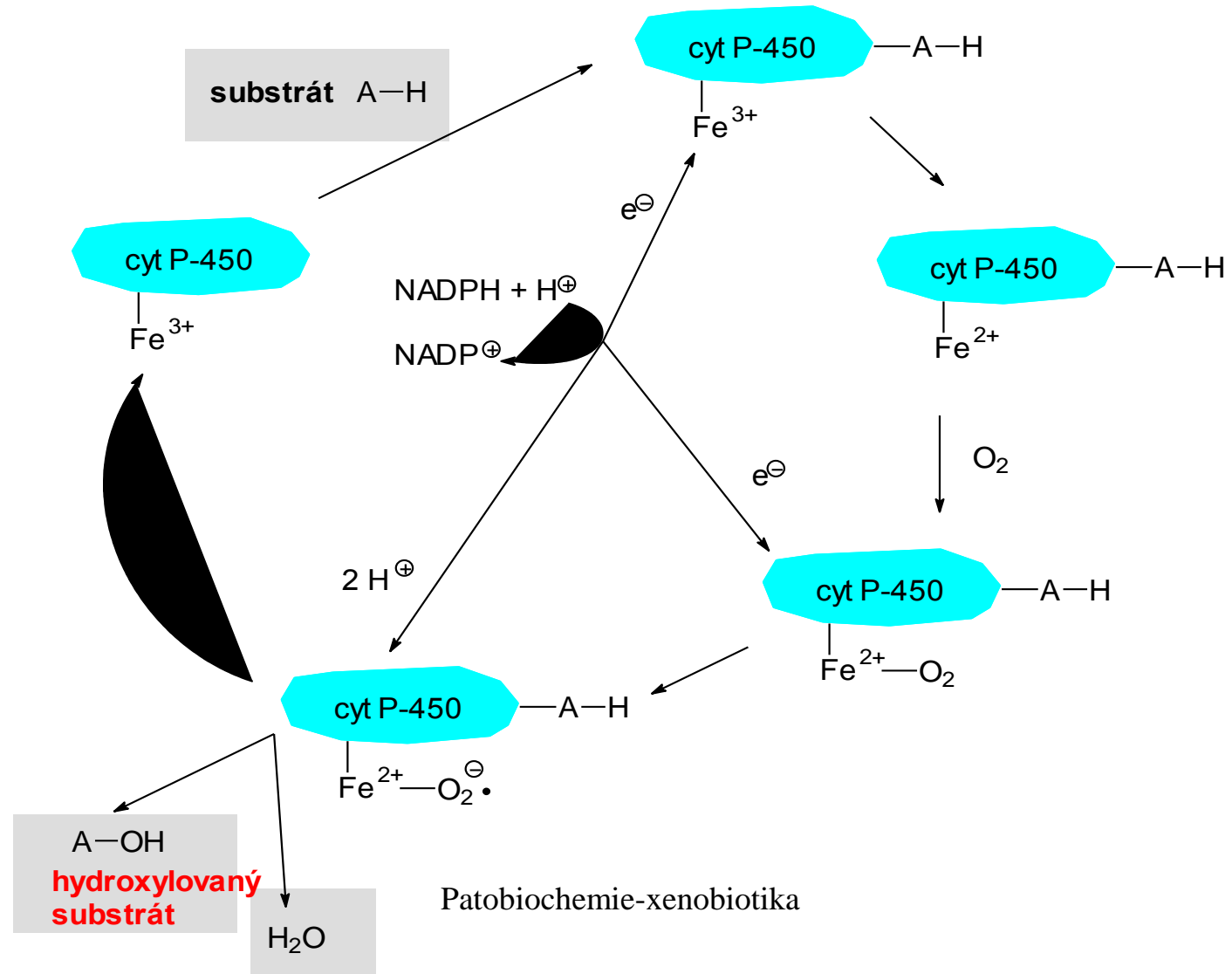
# Složky systému cytochromu P-450



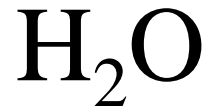
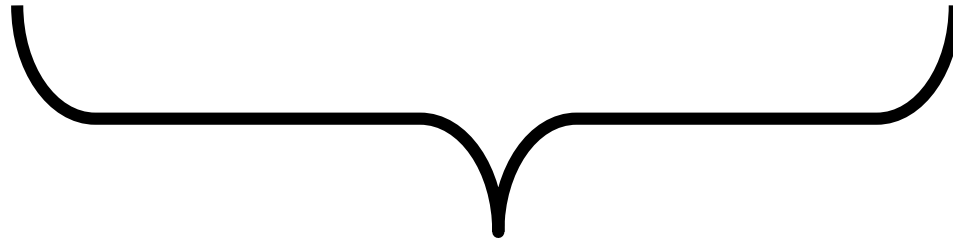
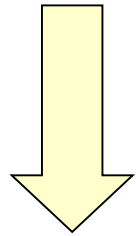
System cytochromu P-450 je složen ze:

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

# Podrobnější schéma hydroxylace ukazuje aktivaci a redukci O<sub>2</sub>



# Co se stalo s dikyslíkem





# 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 hydroxylačních 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**

# Mechanismy indukce CYP

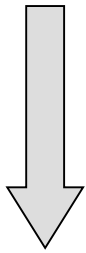
induktor (komplex s intracelulárním receptorem):

- 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

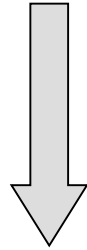
Pomalý  
metabolizátor



vyšší hladiny léku  
nežádoucí účinky  
toxicita

Př. warfarin  
krvácivé stavy

Střední (Rychlý)  
metabolizátor



většina populace

normální odpověď  
klinický účinek léčiva

Patobiochemie-xenobiotika

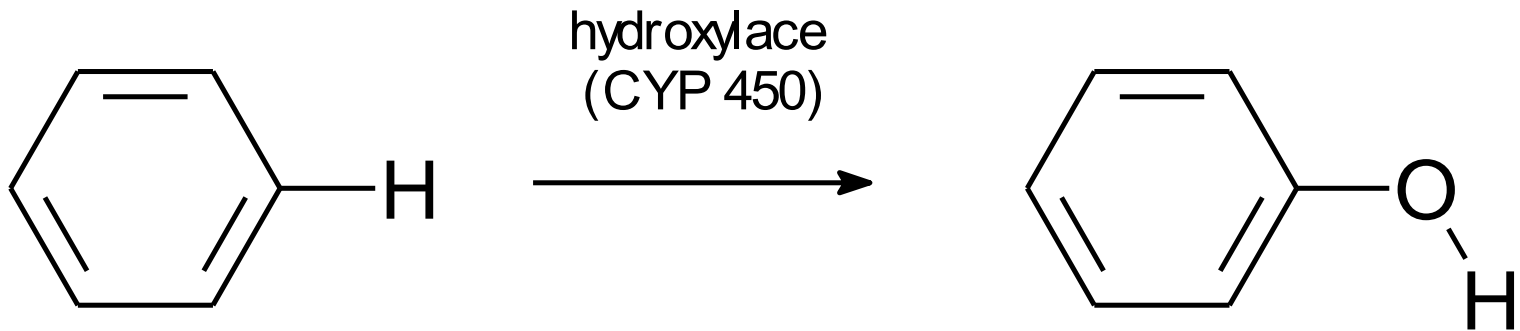
Ultrarychlý  
metabolizátor



žádný / nedostatečný  
efekt

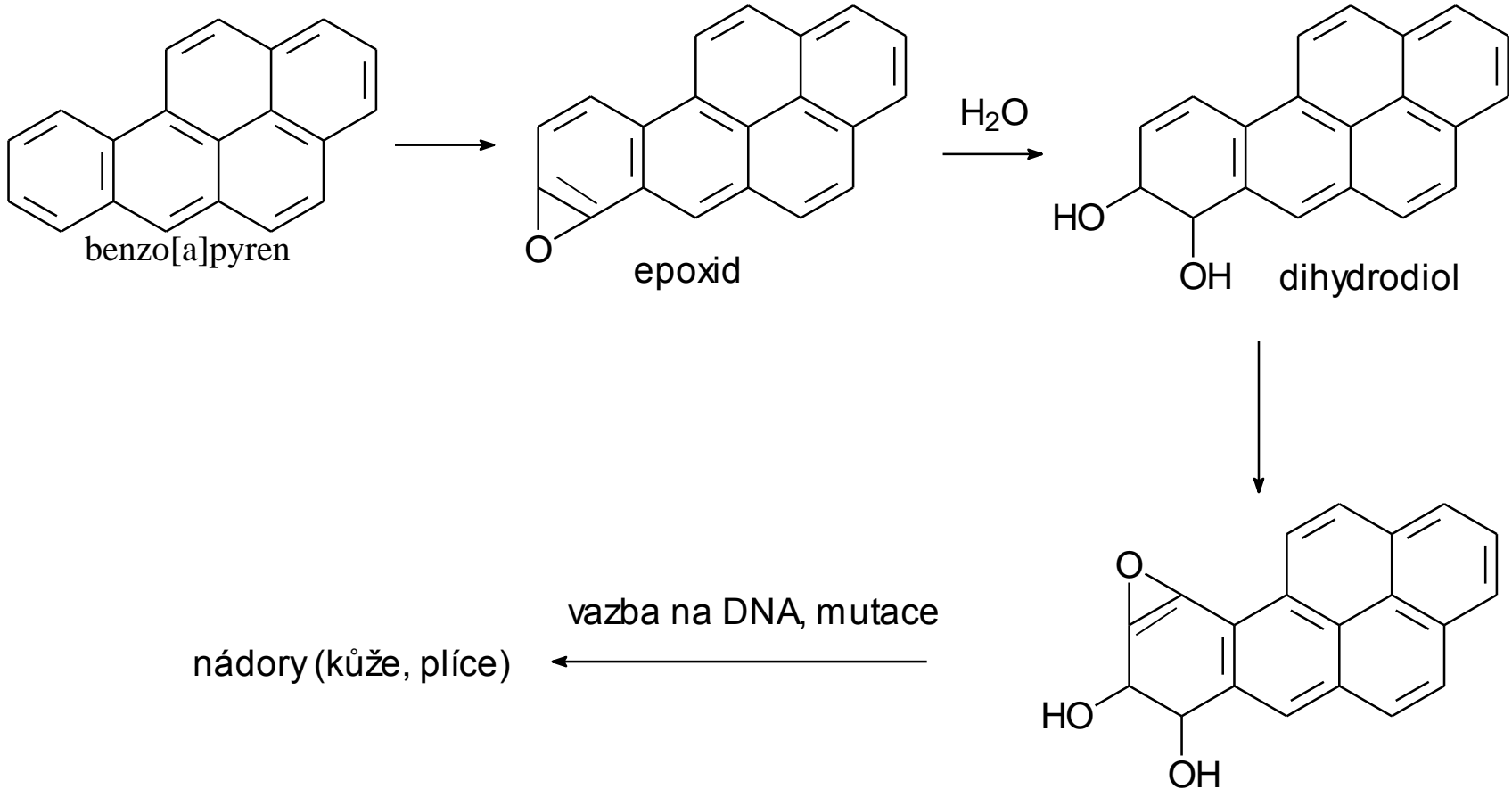
Problém:  
psychofarmaka

# Biotransformace benzenu



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

# 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

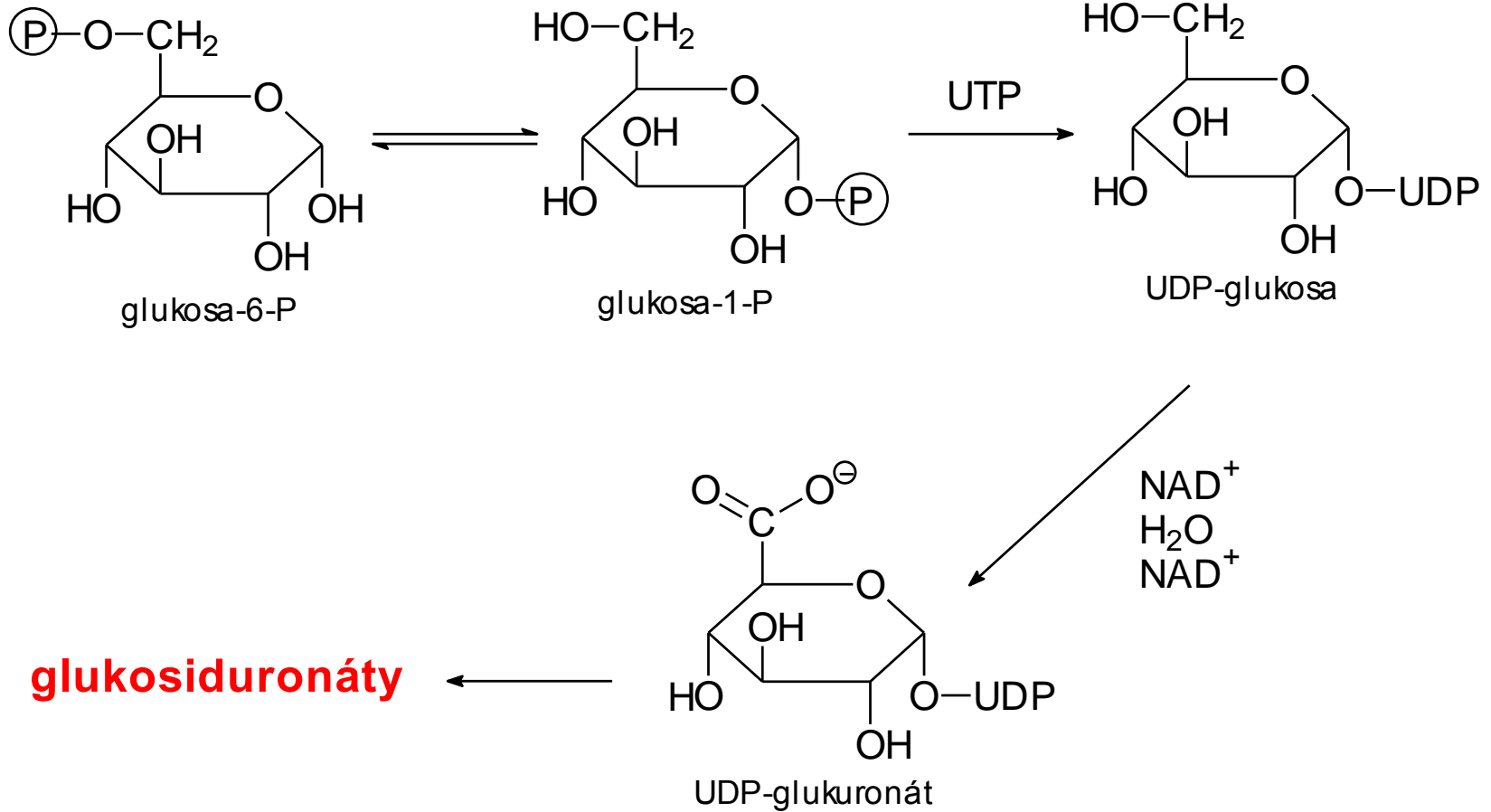
# II. Fáze biotransformace

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

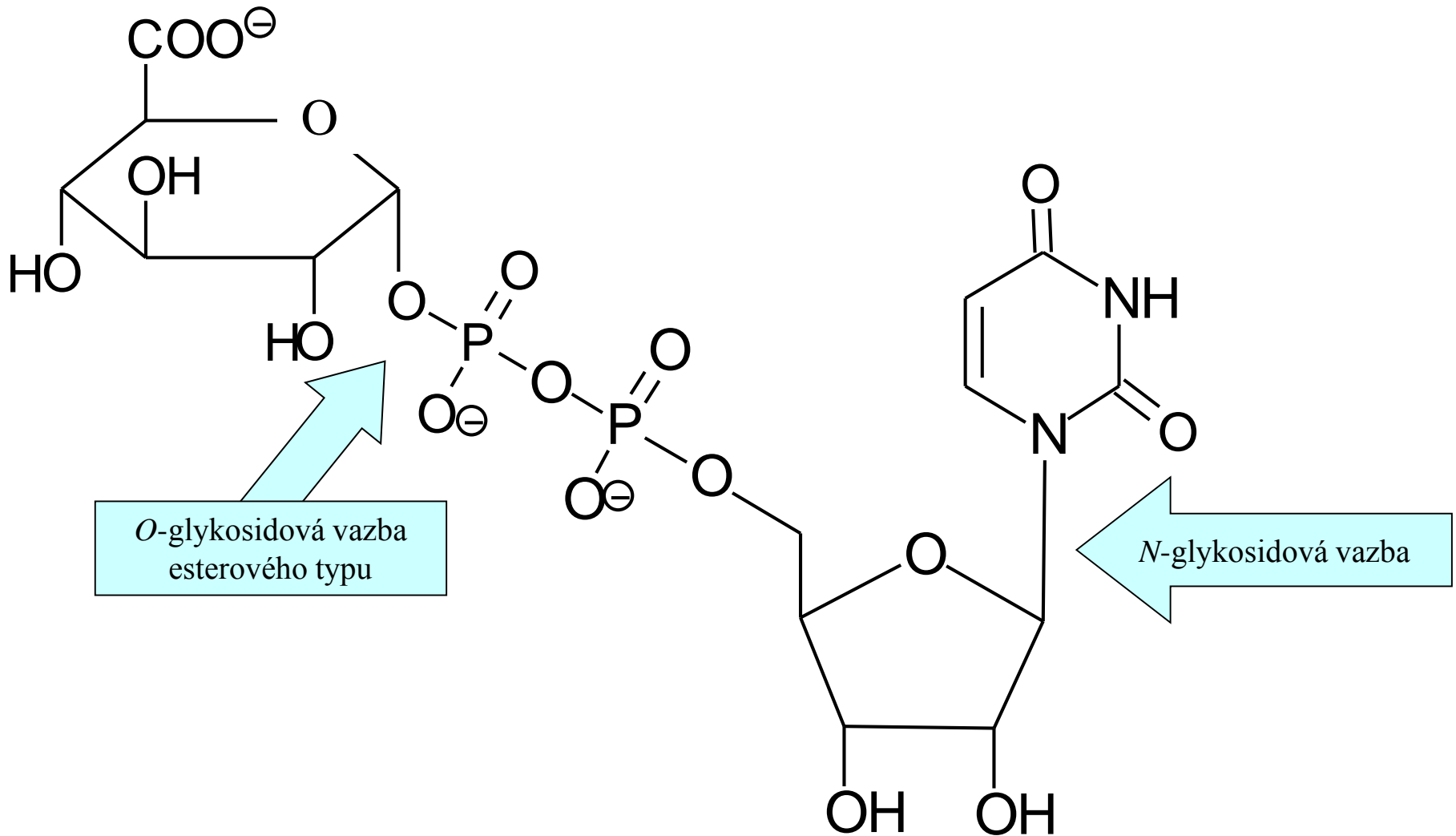
# Přehled konjugačních činidel

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

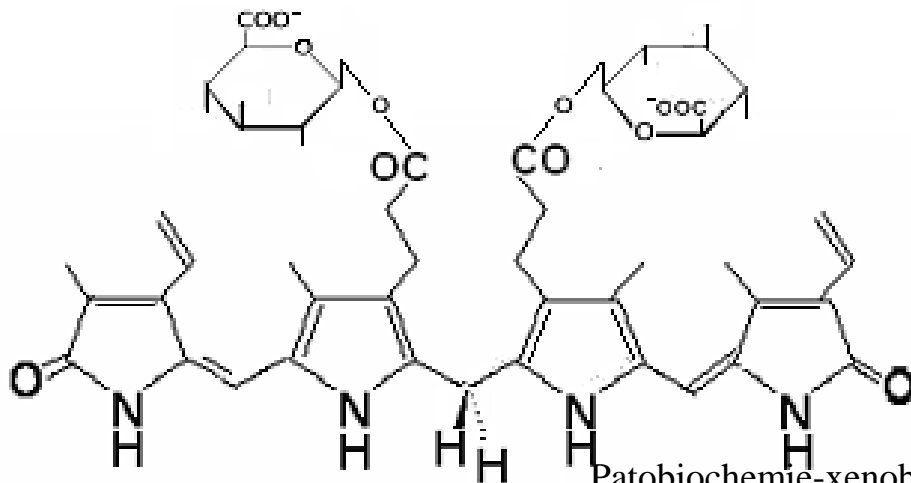


# UDP-glukuronát

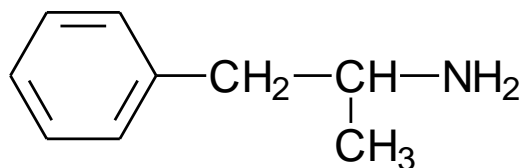


# Glukuronáty jsou nejčastější konjugáty

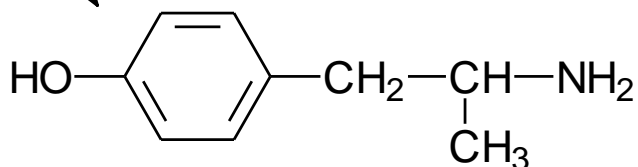
- Vznikají O-glukosiduronáty  
etherový typ (Ar-O-glukuronát, R-O-glukuronát)  
esterový typ (Ar-COO-glukuronát)
- *N*-, *S*-glukosiduronáty
- Substráty: arom. aminy, amfetaminy, kys. salicylová, léčiva, flavonoidy, ...
- Endogenní substráty: bilirubin, steroidy



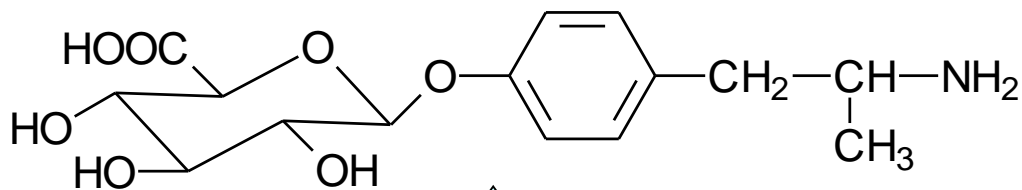
# Biotransformace amfetaminu



I. fáze



II. fáze



O-glukosiduronát  
etherového typu

**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)

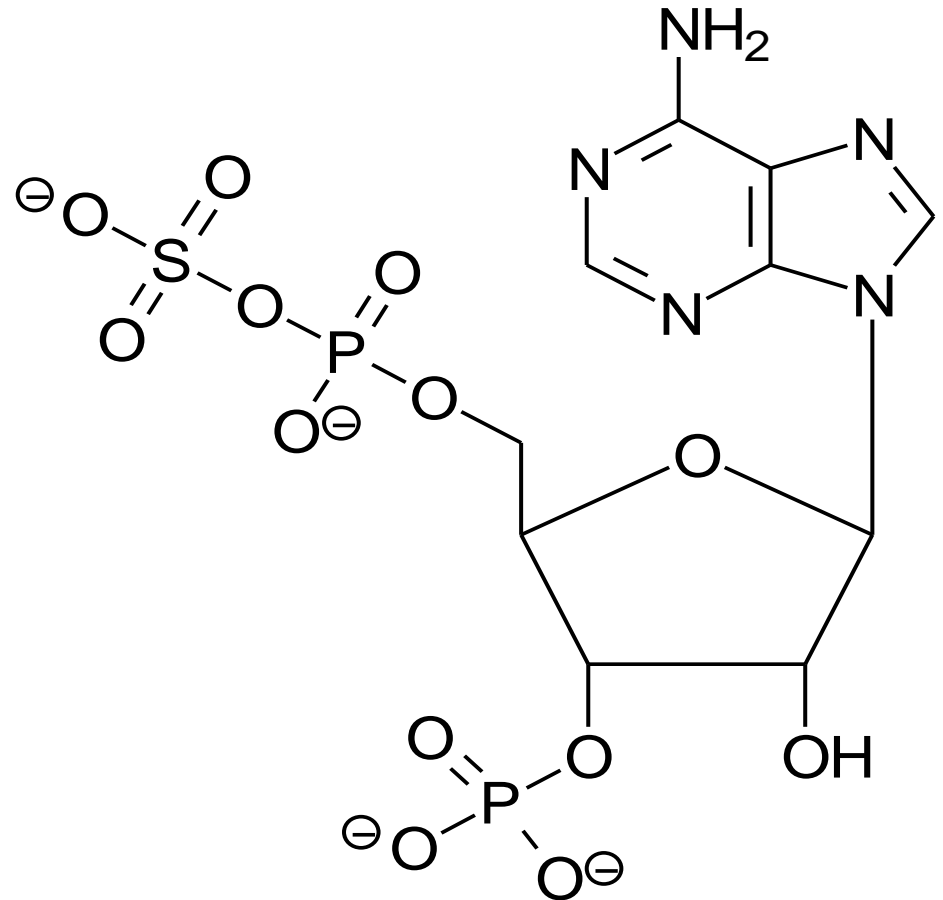
**Fyziologické sulfatace:**

**Glykosaminoglykany**

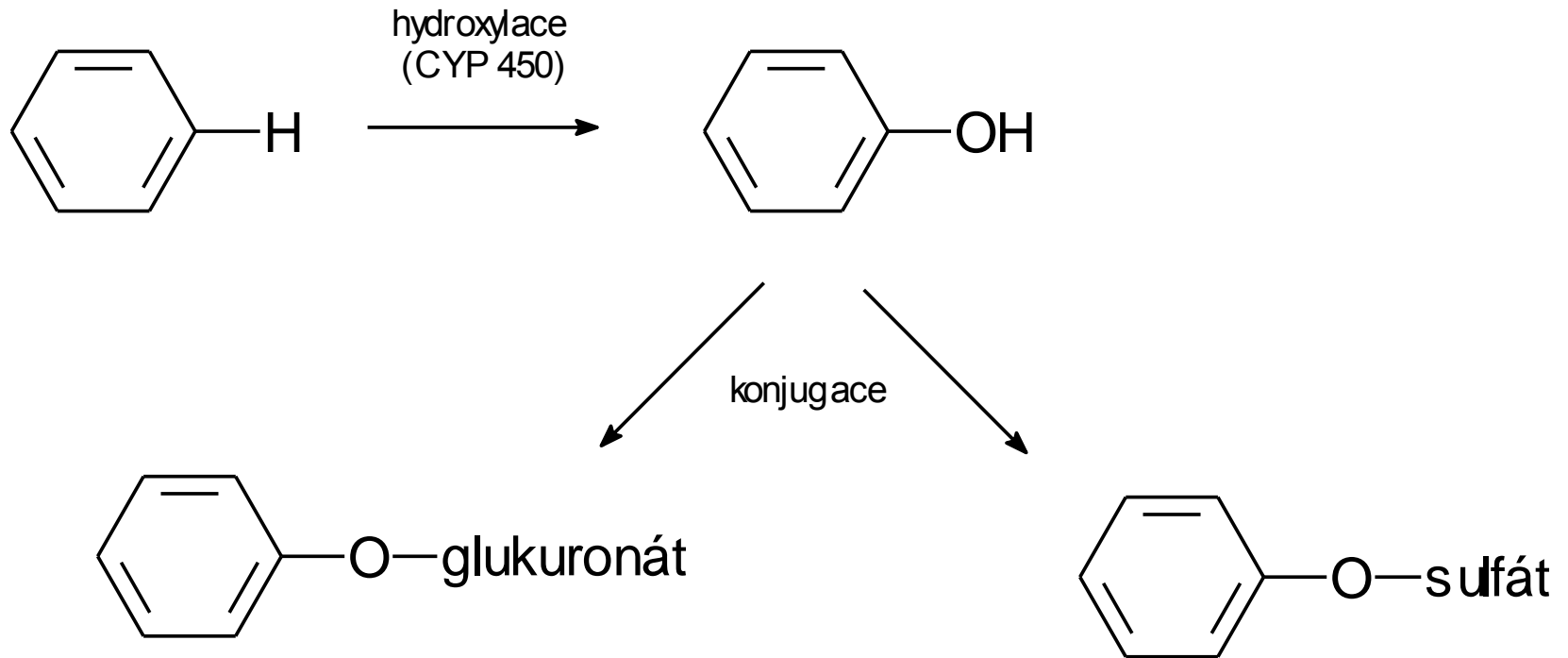
heparin, dermatansulfát,  
keratansulfát,  
chondroitinsulfát

**Sulfoglykosfingolipidy**

(kyselá glykolipidy, sulfatidy)

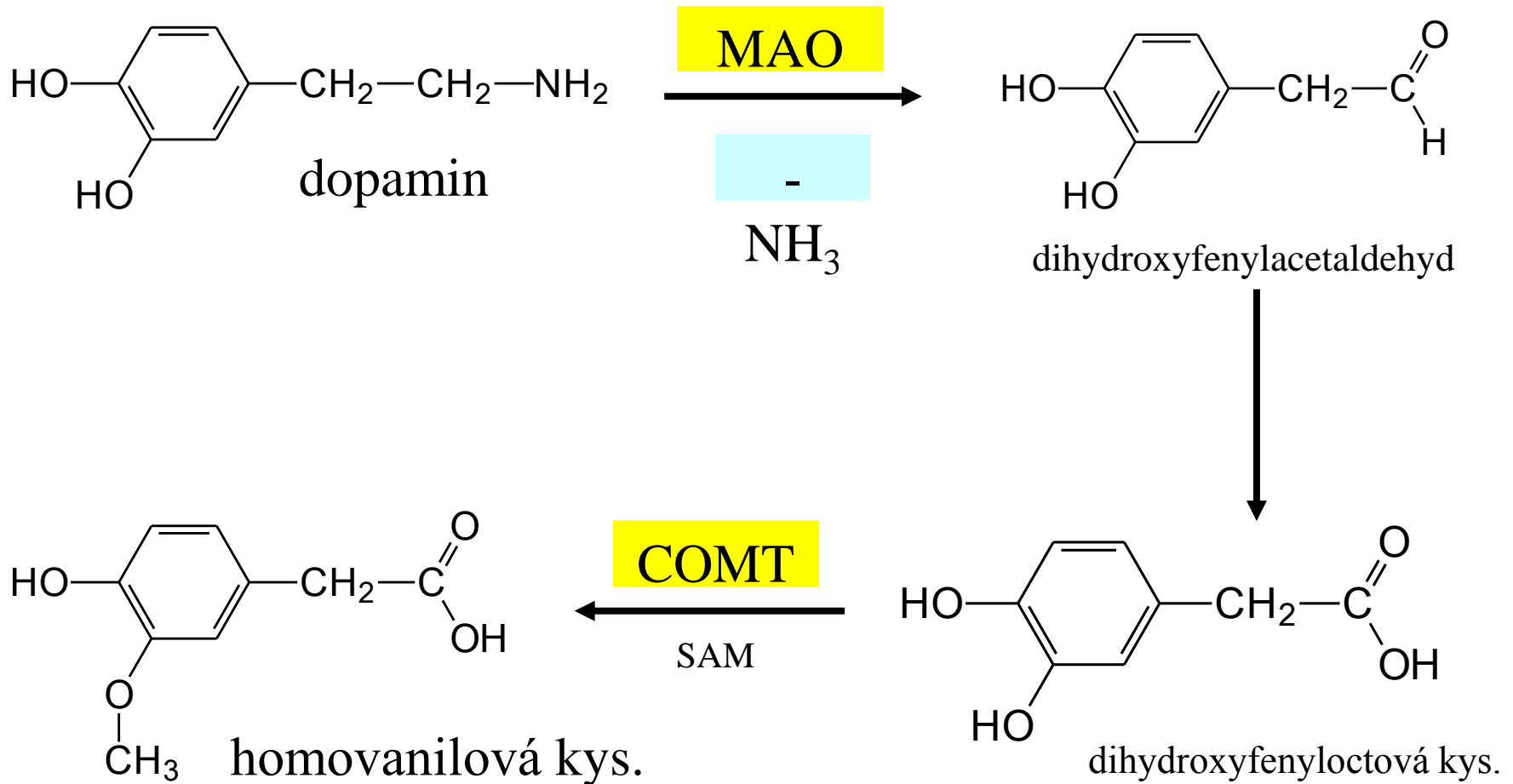


# Konjugace fenolu



# Methylace je součástí inaktivace katecholaminů a estrogenů

MAO monoaminoxidasa, COMT katechol-*O*-methyltransferasa



# Glutathion má trojí význam

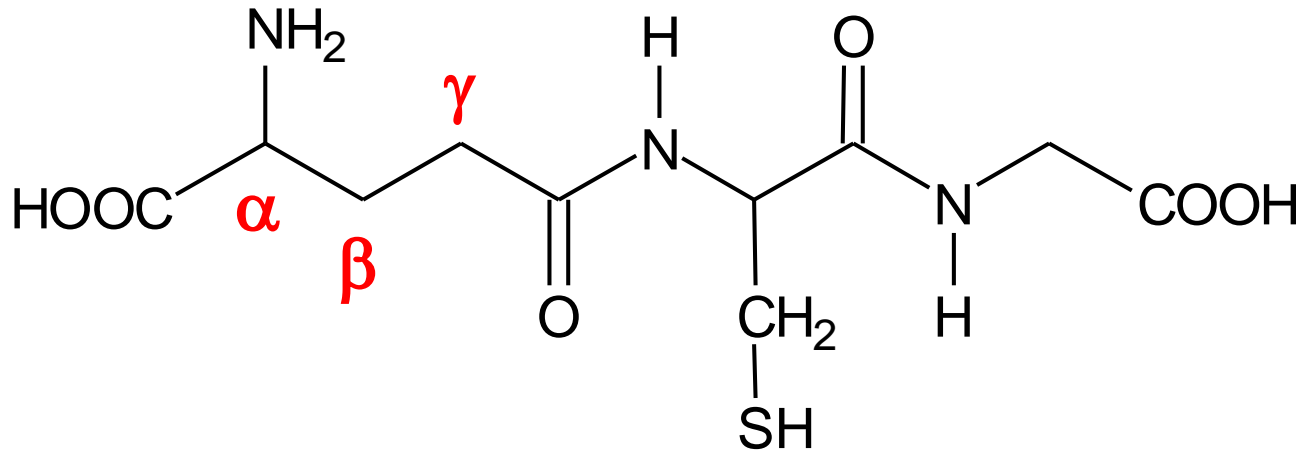
$\gamma$ -glutamylcysteinylglycin

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

Endogenní substráty – konjugace leukotrienů

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

# Glutathion (GSH)

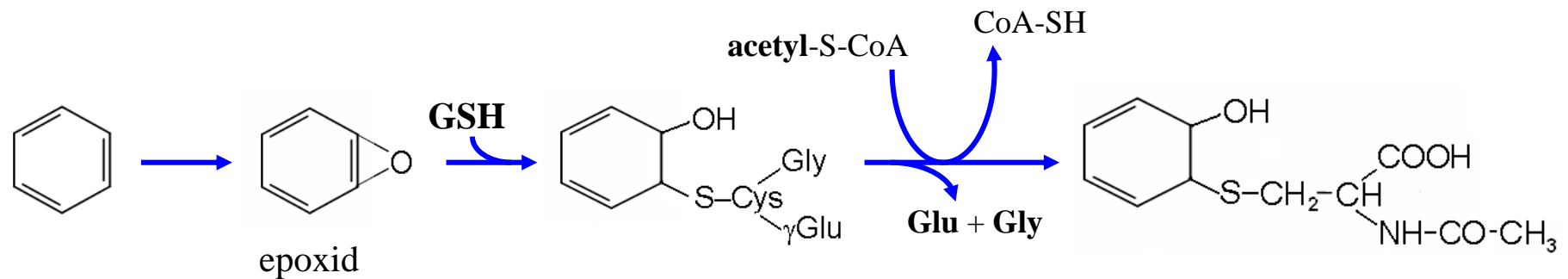


elektrofilní  
centrum



nukleofilní  
skupina

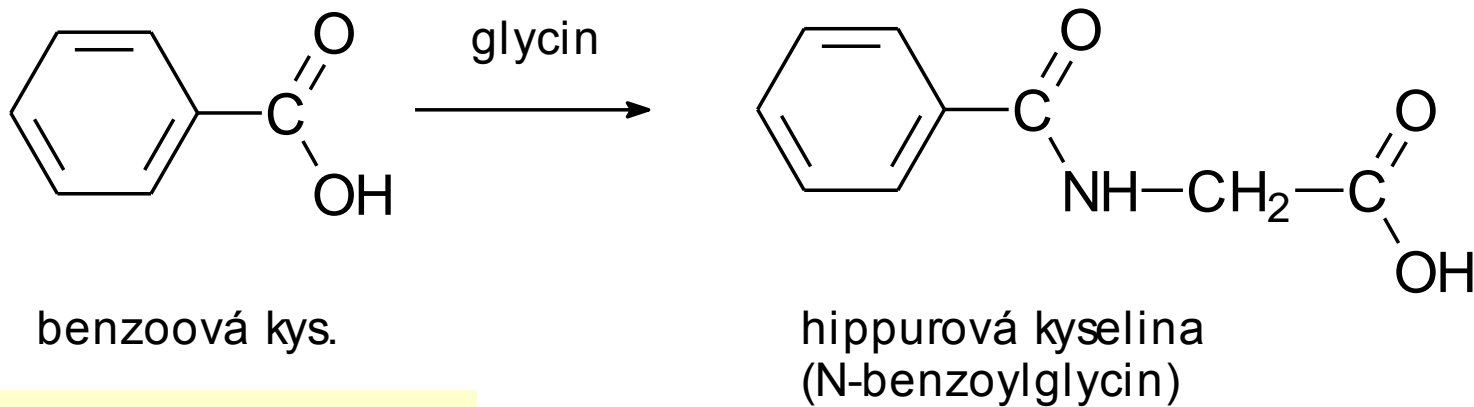
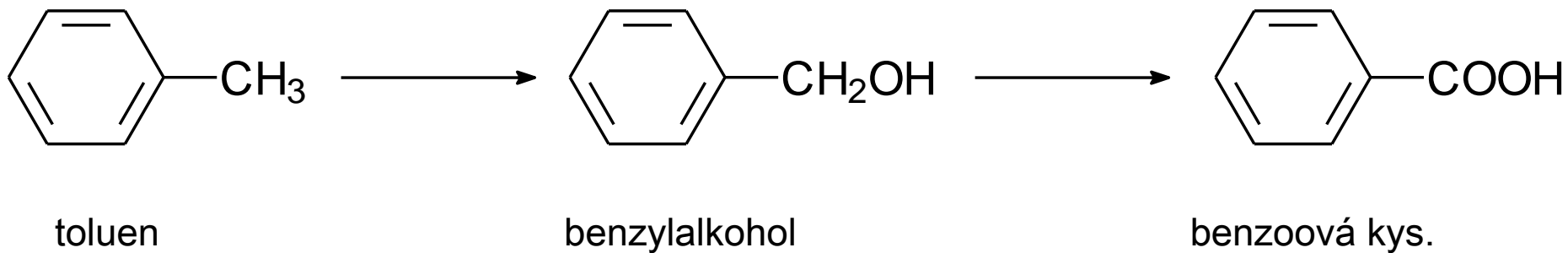
Před exkrecí vznikají z R-SG merkapturové kyseliny



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

# Konjugace aminokyselinami

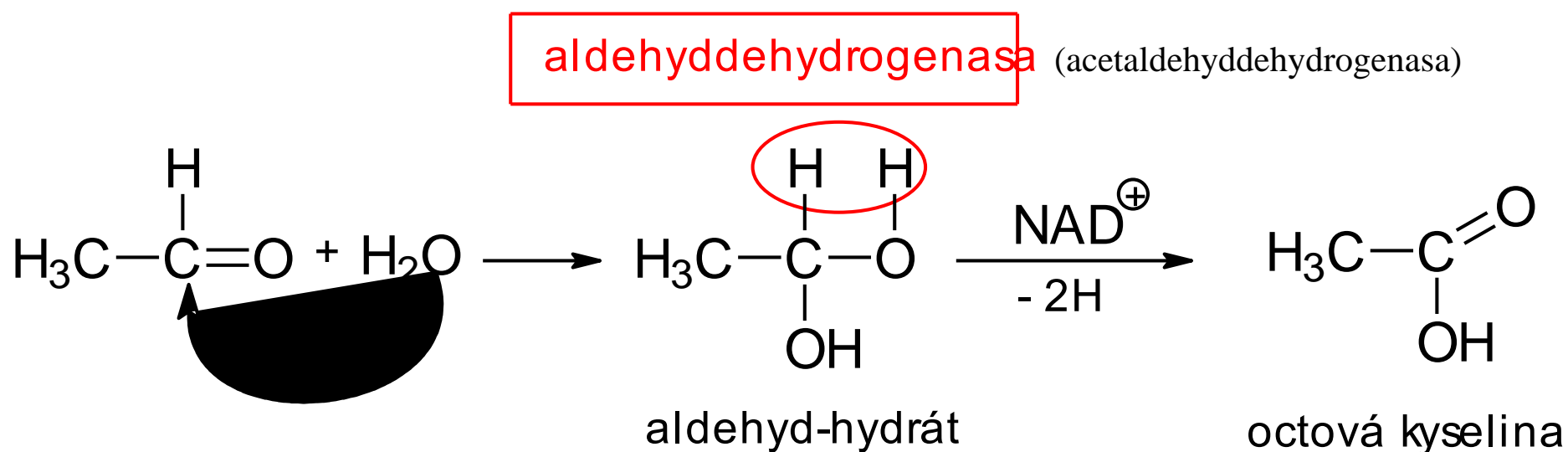
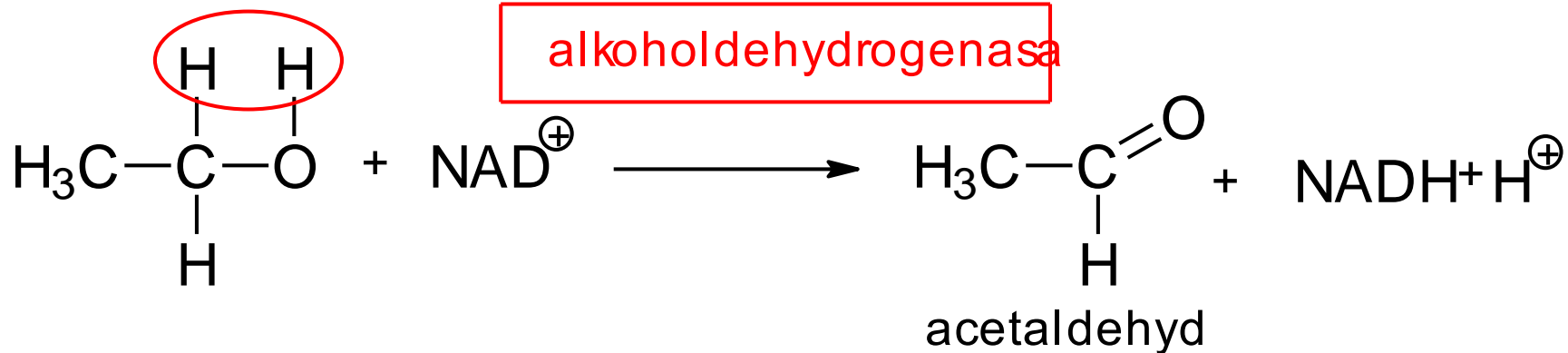
- glycin, taurin
- xenobiotika s -COOH skupinou
- vznik amidové vazby
- endogenní substráty – žlučové kyseliny



aktivovaná navázáním  
na CoA: benzoyl-CoA



# Biotransformace ethanolu v játrech (cytosol)

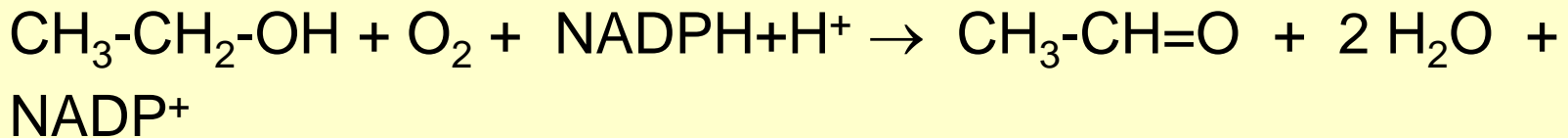


- **Alkoholdehydrogenasa (AD)** – metaloenzym (Zn), více molekulových forem, v játrech, plicích, ledvinách, GIT, a dalších tkáních
- Žaludeční forma je výrazně aktivnější u mužů než u žen
- **Acetaldehyddehydrogenasa (AcD)** – více forem, játra, cytosol i mitochondrie

# Další dráhy biotransformace ethanolu

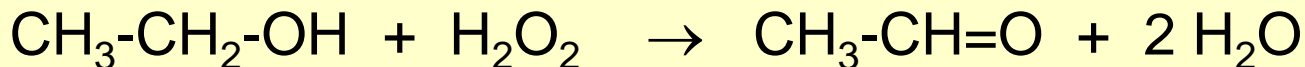
## ER hepatocytu:

MEOS (mikrosomální ethanol oxidující systém, CYP2E1)

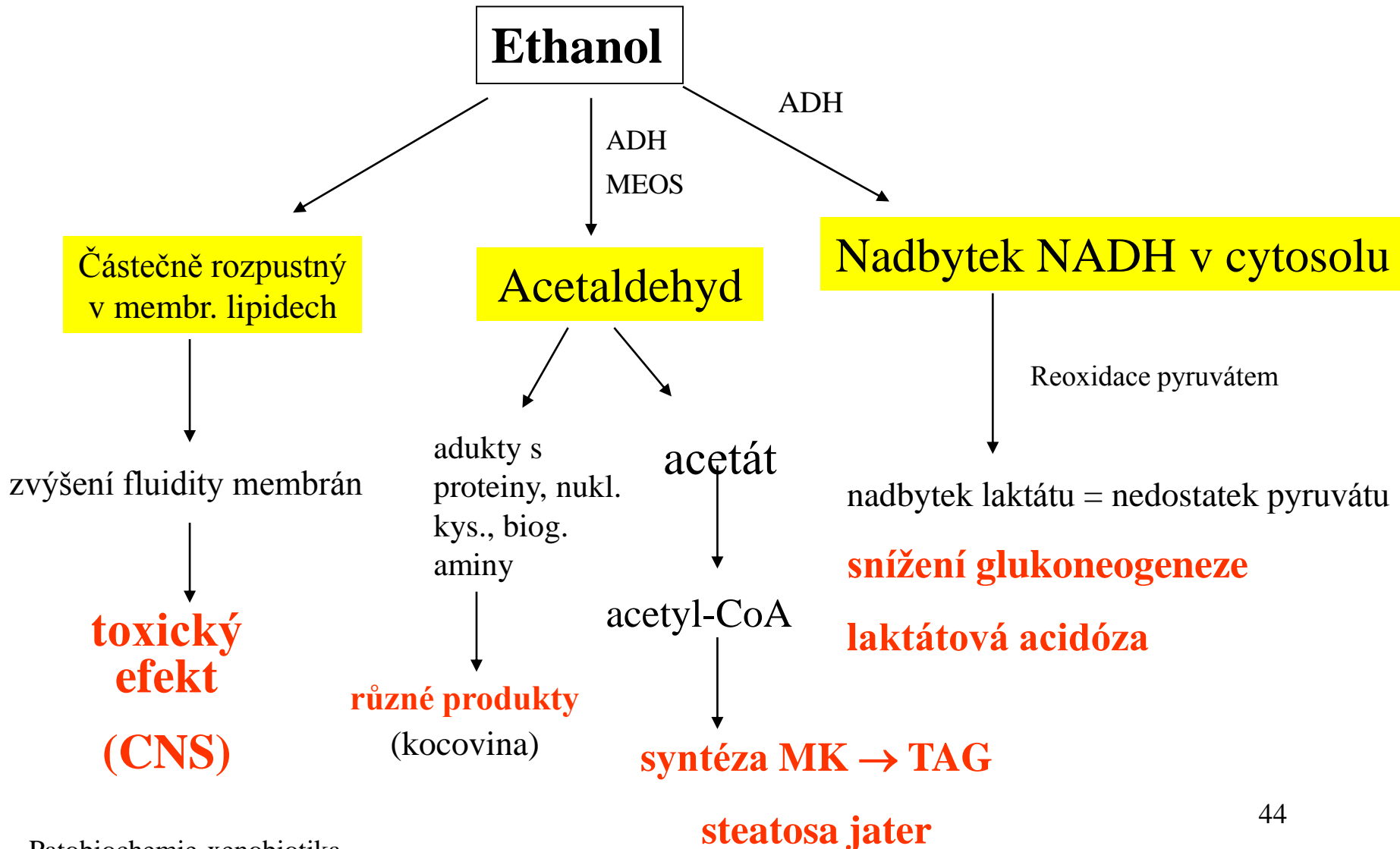


Tento systém se aktivuje až při zvýšené konzumaci alkoholu  
= vyšší hladiny (> 0,5 ‰) ⇒ **zvýšená produkce acetaldehydu**

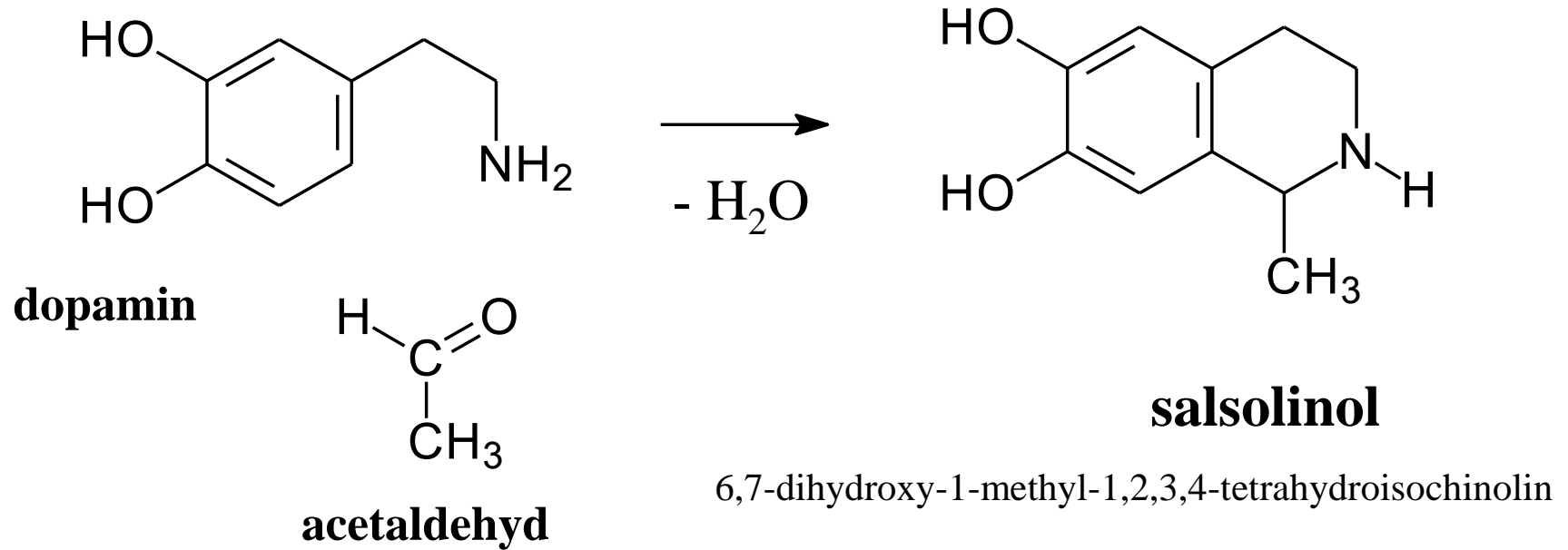
Peroxisomy: oxidace ethanolu za účasti peroxidu vodíku,  
katalasa



# Důsledky biotransformace ethanolu



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



# Jak odhalit alkoholika?

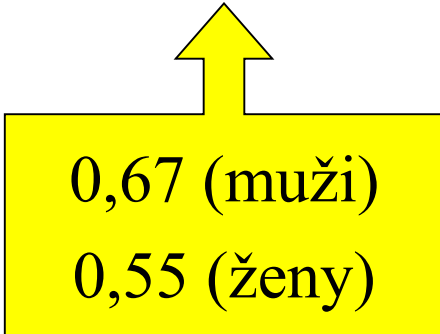
- Enzymy: AST, ALT, GMD, GMT ....↑, CHS ...↓
- **CDT** (carbohydrate-deficient transferrin, bezsacharidový transferrin) molekula transferrinu obsahuje 4-6 sialových kys. Chronický abusus alkoholu narušuje glykosylaci transferrinu, vzniká CDT = formy transferrinu s 0-2 sial. kys. Zvýšená hodnota CDT = 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)

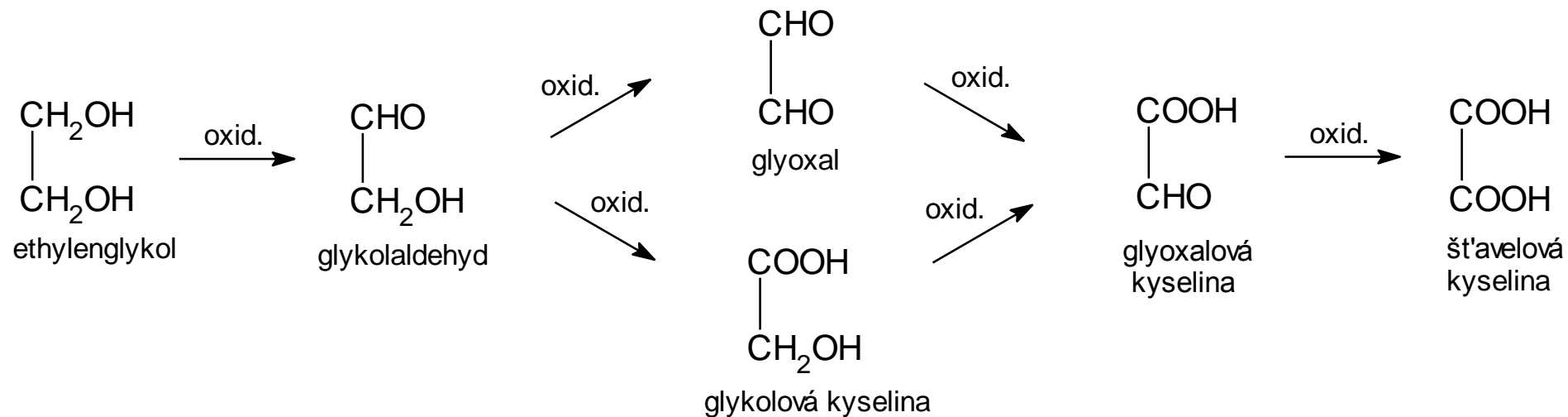
$$\text{alkohol v krvi (‰)} = \frac{m_{\text{alkohol}}(\text{g})}{m_t(\text{kg}) \times f}$$

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

0,67 (muži)  
0,55 (ženy)



# Biotransformace ethylenglykolu



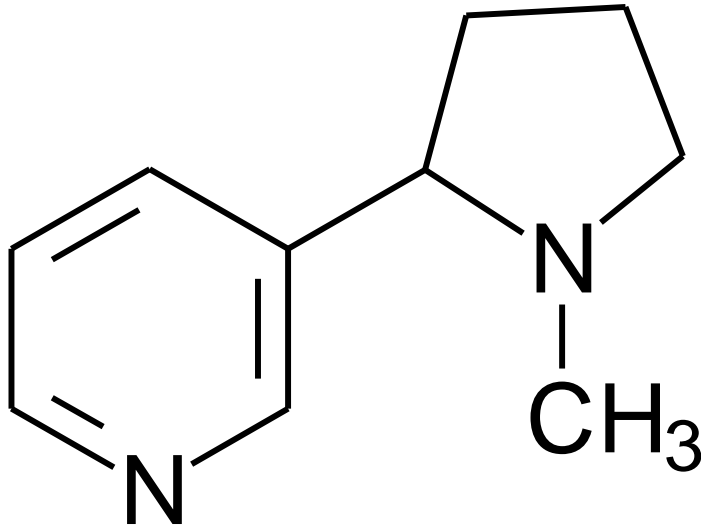
Otrava ethylenglykolem může mít fatální průběh



# Tabák

<b>Látky</b>	nikotin, produkty nedokonalého spalování
<b>Účinky</b>	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)
<b>Příznaky užívání</b>	typický zápach, zažloutlé prsty a zuby
<b>Rizika</b>	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

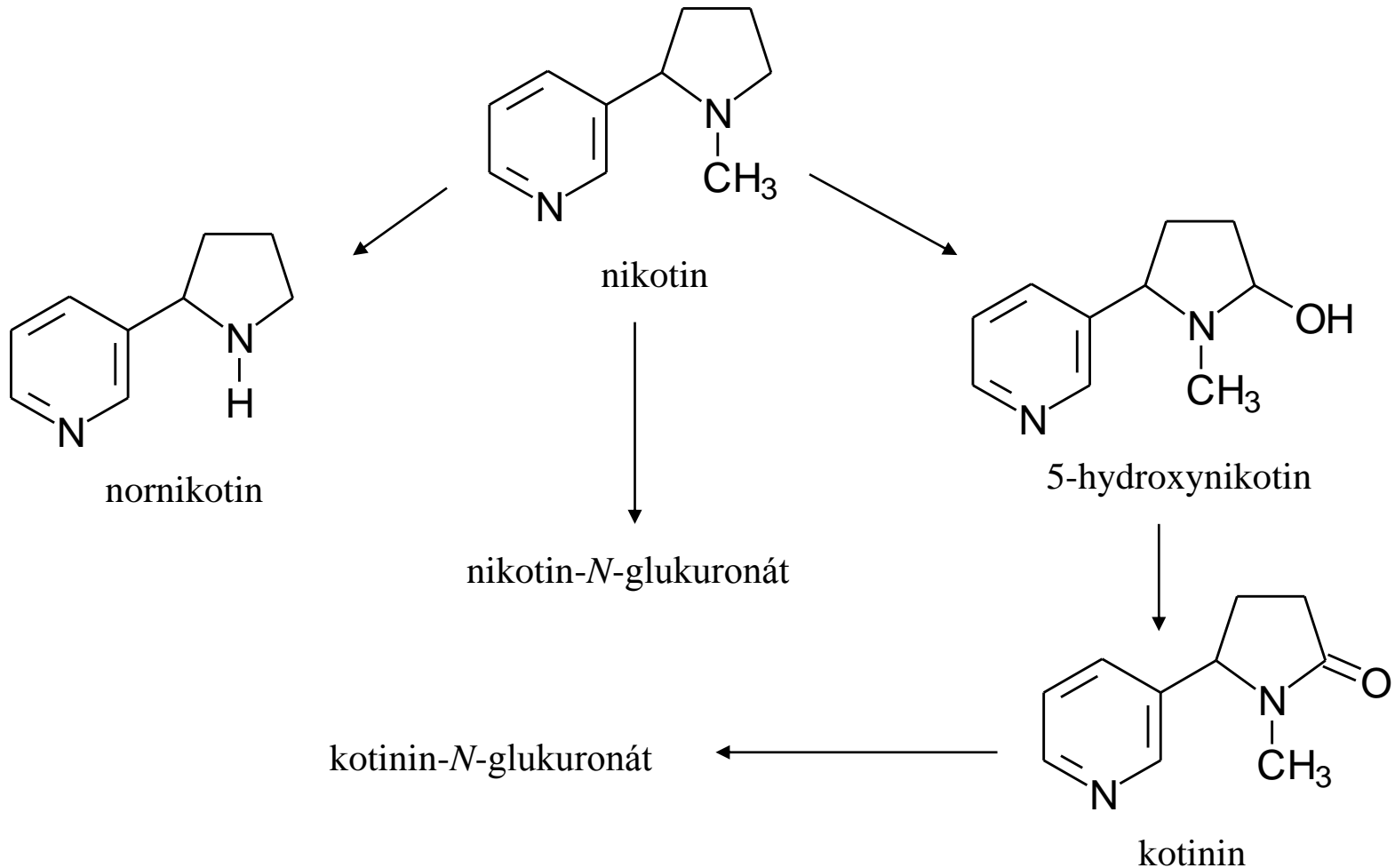
nikotin částečně destiluje a přechází do kouře (aerosolu),

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  $\text{SCN}^-$  vzniká biotransformací  $\text{CN}^-$  (síra pochází z katabolismu cysteinu)  
reakcí s  $\text{Fe}^{3+}$  ionty  $\rightarrow$  červený komplex

## 2. nikotin v moči

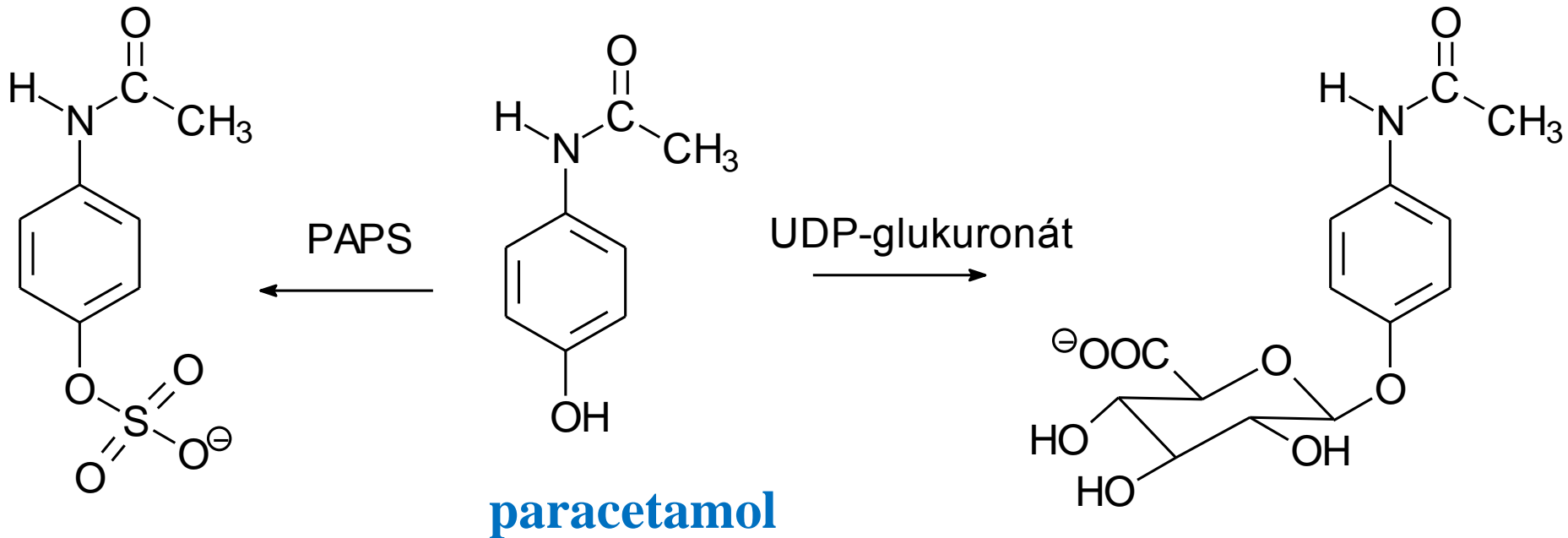
## 3. minoritní alkaloidy tabáku a metabolity nikotinu v moči (kotlinin, nornikotin, anatabin, anabasin)

# Biotransformace vybraných léčiv

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

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

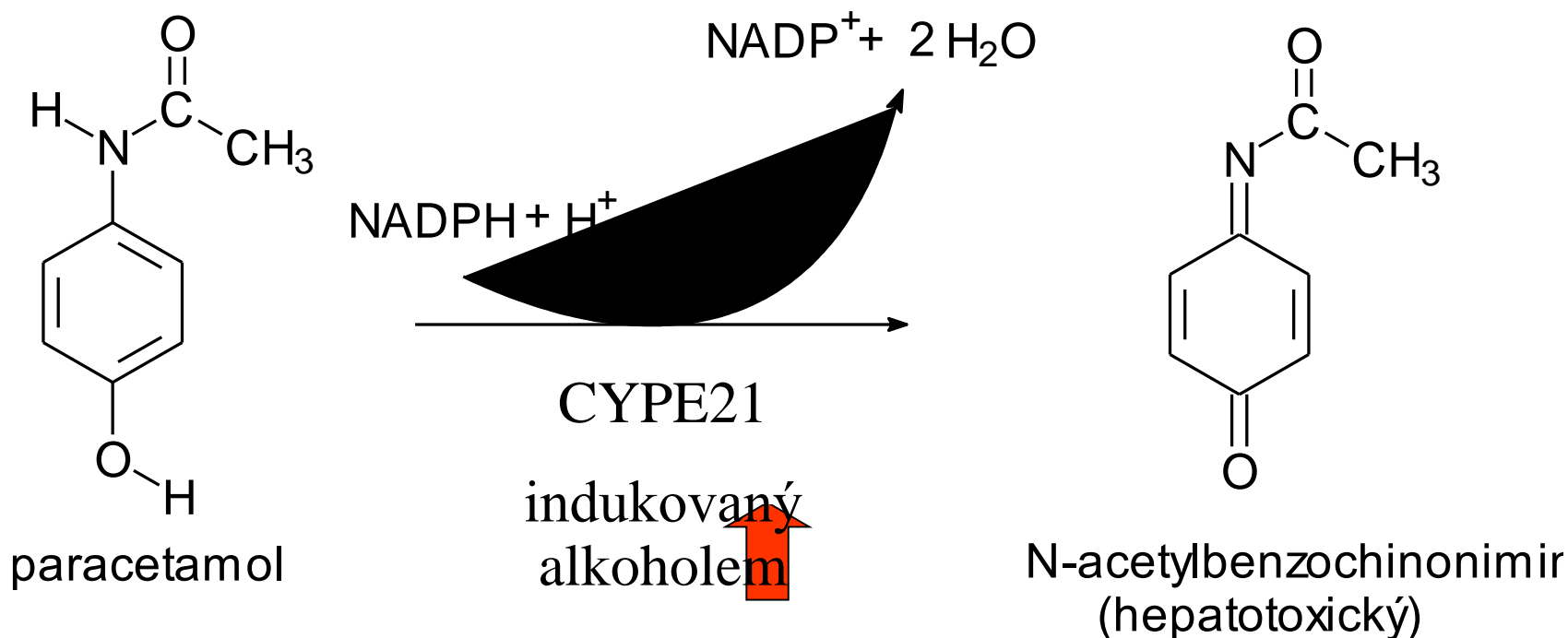
# Hlavní dráha biotransformace paracetamolu je konjugace



**paracetamol**

*N*-(4-hydroxyfenyl)acetamid

# Vedlejší dráha biotransformace paracetamolu vede k hepatotoxickému chinoniminu



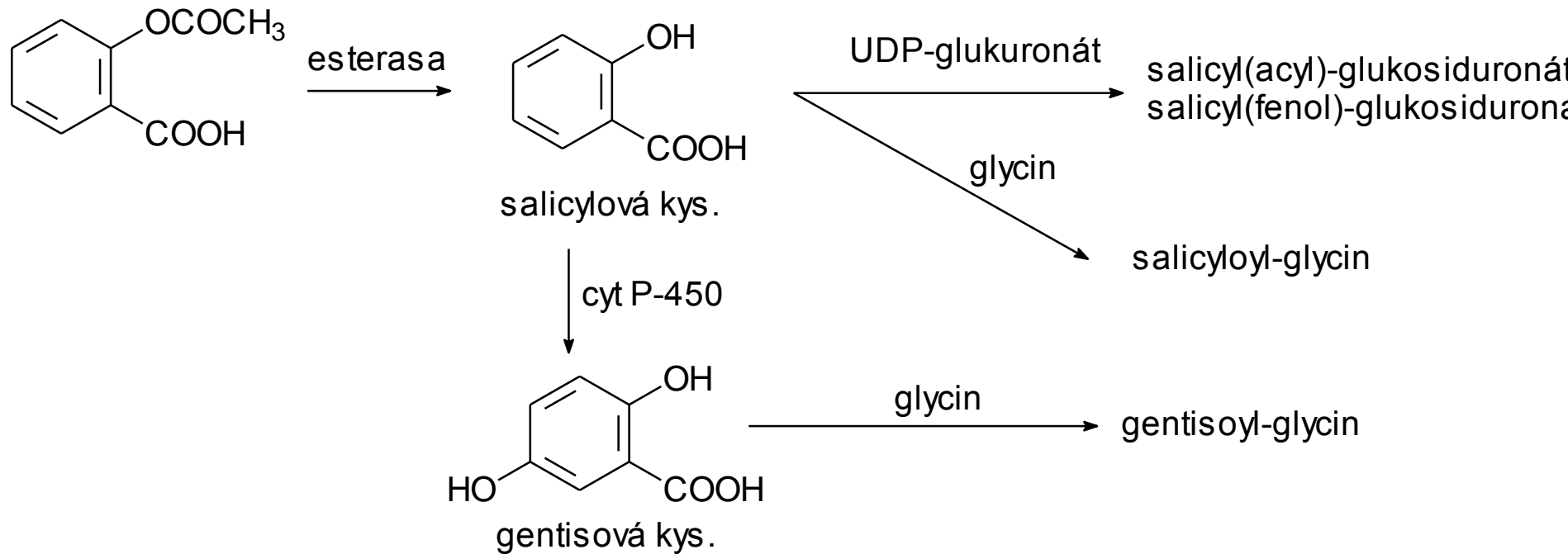
☠ nebezpečí při předávkování

☠ u alkoholiků je větší část paracetamolu metabolizována na chinonimin

váže se na buněčné proteiny - nekróza



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