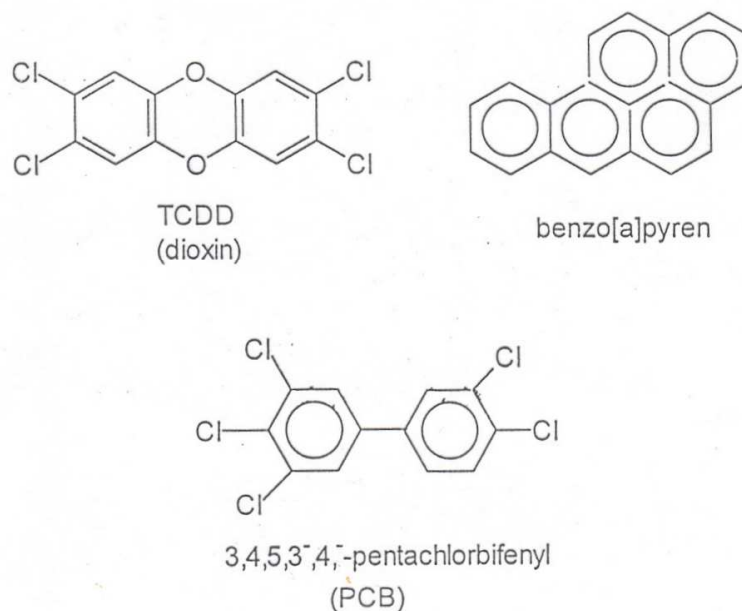




Promutageny

Během evoluce se živé organismy neustále dostávaly do styku s řadou látek, které jsou pro organismy cizí, neslouží jako zdroje energie ani nejsou prekursory pro syntézu užitečných biomolekul. Aby tyto cizí látky – xenobiotika neznamenal pro buňku oltrožení jejího vnitřního prostředí, vybudovaly organismy řadu mechanismů, kterými se xenobiotikům brání, převážně tím, že strukturu xenobiotika chemicky změní a vznikne produkt, který se snadno z organismu vyloučí.

Xenobiotika jsou látky různých chemických struktur, zpravidla lipofilního charakteru, takže snadno pronikají membránami. Jsou to léky, součásti potravin (konzervační látky, potravinářská barviva, umělá sladidla, kontaminanty půdy a vody), znečištěniny vzduchu jako výfukové plyny, kouř z cigaret a nej-různější druhy sloučenin z chemického i farmaceutického průmyslu, které vznikají i jako vedlejší produkty a objevují se v zevním prostředí. Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj eviduje ročně 1.500 nových chemických sloučenin, z nichž mnohé se dostávají do životního prostředí jako znečištěniny. Naštěstí většina z nich je pomocí obranných mechanismů buňky zneškodněna, některé však mohou znamenat nebezpečí pro zdraví lidí i živočichů. K nejznámějším patří polyhalogenované bifenylly (PCB), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a dioxiny (obr.1), které jsou v organismu aktivovány na kancerogenní, mutagenní a toxické produkty. Příklady některých:



Obr. 1. Příklady některých xenobiotik z prostředí

„Metabolism usually results in the inactivation of the parent compound, but some of the metabolites generated are more toxic (genotoxic) than the parent compound“

Příklady a rozdělení promutagenů

- **polyaromatické a heterocyklické uhlovodíky** (benzpyren, benzantracen, dimethylbenzantracen)
 - **aromatické a heterocyklické primární, sekundární a terciální aminy a azobarviva** (2-acetylaminofluoren, 2-aminofluoren, benzidin)
 - **nitroarylové a nitrofuranové sloučeniny** (furylfuramin, AF-2)
 - **nitrosaminy a nitrokarbamáty** (N-nitrosodomethylamin)
 - **allyltriaziны a dialkylhydraziny**
 - **acetamidy, thioamidy a karbamáty**
 - **některé chlorované uhlovodíky**
 - **přírodní produkty** jako cykasin, safrol, mykotoxiny, pyrrolizidinové alkaloidy)
-

Příklady promutagenů v životním prostředí

table 11.4

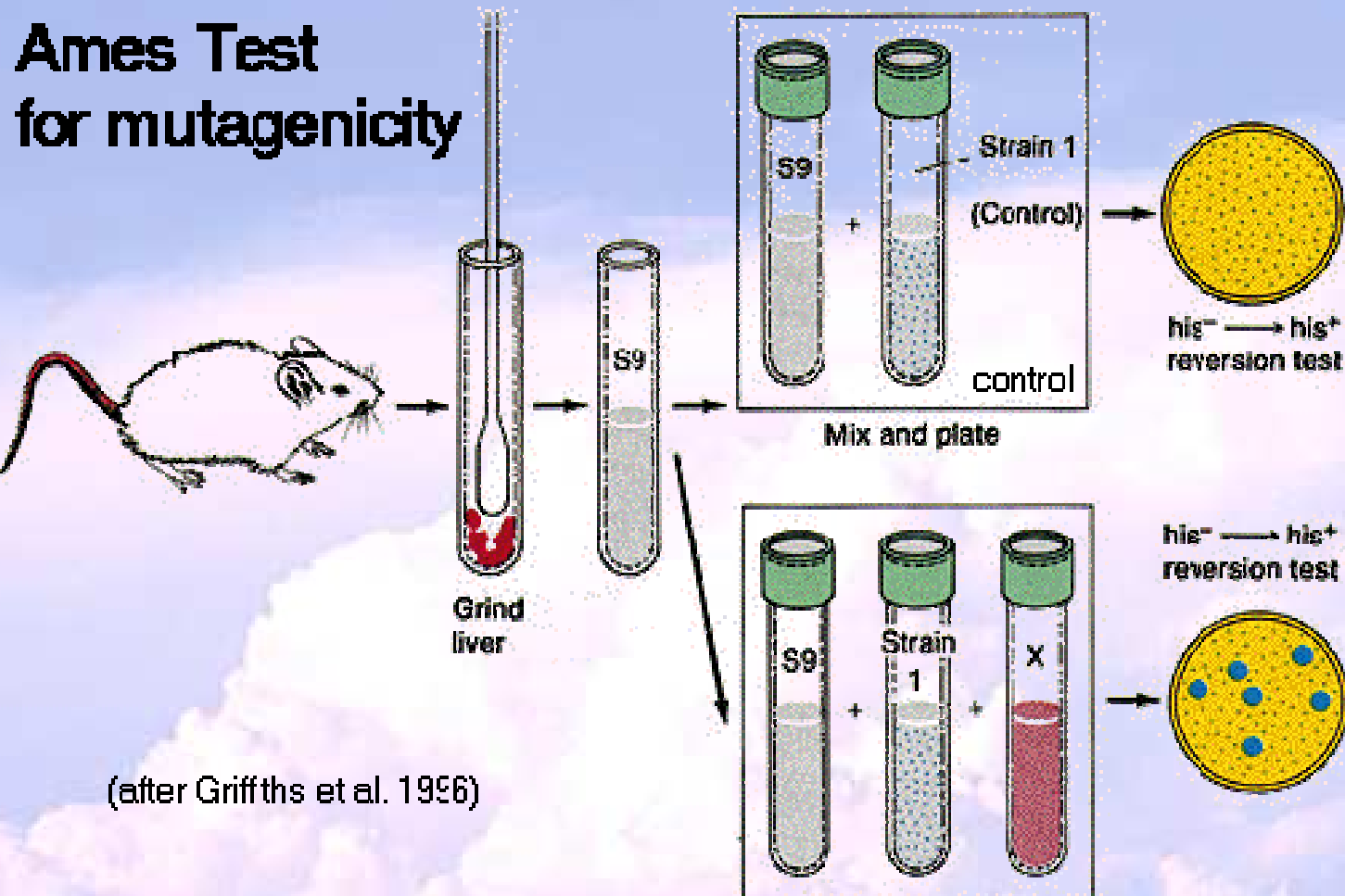
Commonly Encountered Mutagens

Mutagen	Source
Aflatoxin B	Fungi growing on peanuts and other foods
2-amino 5-nitrophenol	Hair dye components
2,4-diaminoanisole	"
2,5-diaminoanisole	"
2,4-diaminotoluene	"
p-phenylenediamine	"
Furylfuramide	Food additive
Nitrosamines	Pesticides, herbicides, cigarette smoke
Proflavine	Antiseptic in veterinary medicine
Sodium nitrite	Smoked meats
Tris (2,3-dibromopropyl phosphate)	Flame retardant in children's sleepwear

Detekce a zjišťování promutagenů

- 1. *In vitro* homogenát z jater + detekční systém** (např. Amesův test + S9 frakce)
 - 2. Hostitelem zprostředkovaná aktivace** (tzv. host mediated assay)
 - 3. Testování mutagenity tělních tekutin** (moč, krev)
 - 4. Transgenní organismy** (např. *Drosophila melanogaster* nesoucí geny pro glutathion-S-transferázu)
-

Amesův test s metabolickou aktivací (*Salmonella typhimurium*)



Plotnový test mutagenity podle Amese

Nejpoužívanější kmeny:

- **TA 98 – posunové mutace**
- **TA100 - substituce**

Provedení:

- a) bez metabolické aktivace -S9
- b) s metabolickou aktivací +S9 (homogenát z jater)

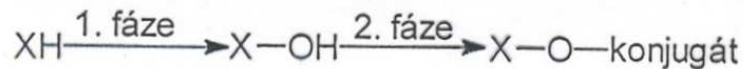
Nutno provést vždy i negativní kontrolu (kontrolní rozmezí spontánních revertant) a pozitivní kontrolu (použití známých mutagenů)

Jednotlivé etapy metabolické aktivace promutagenů

1. Tranformační reakce

2. Konjugační reakce

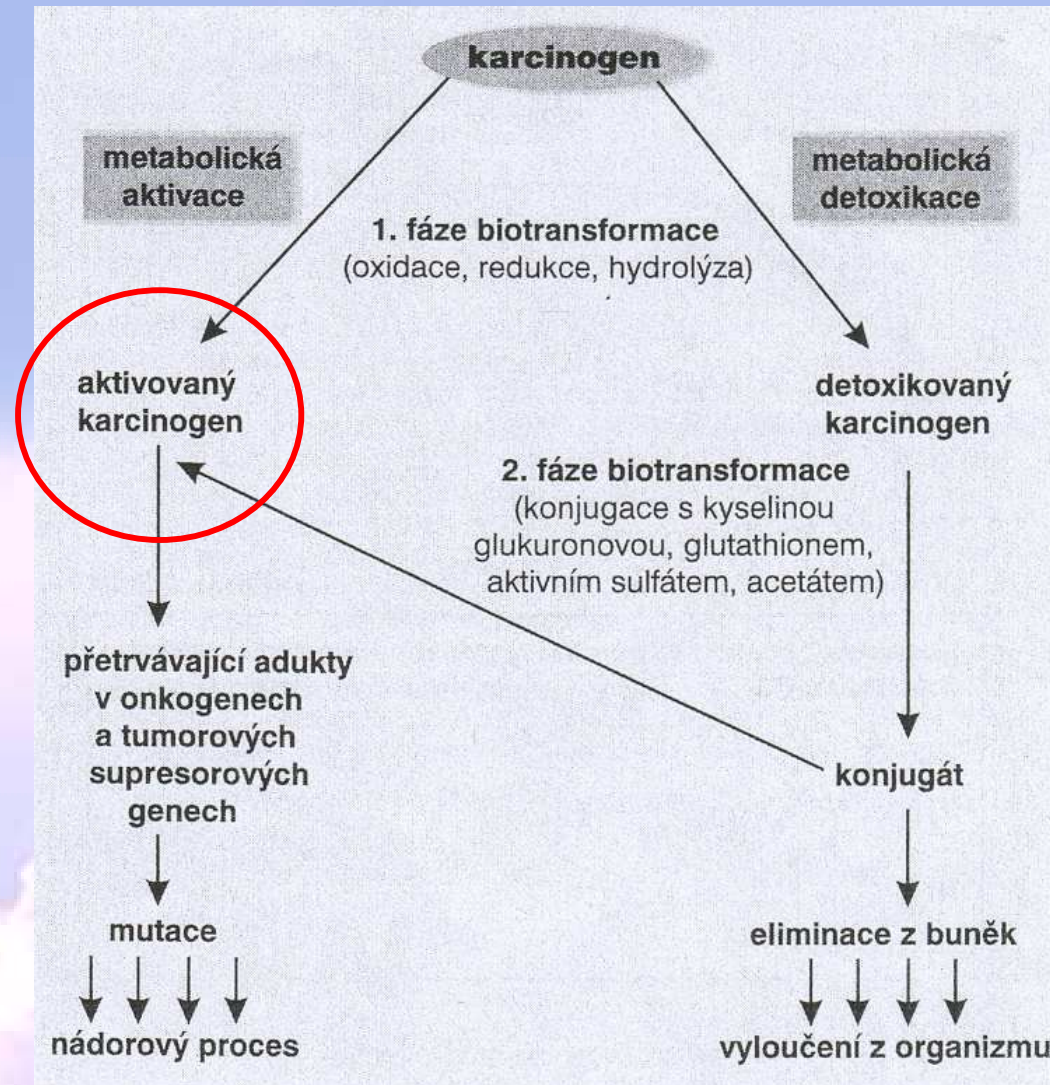
3. Procesy ukládání (jen u rostlin)



Obr. 3. Xenobiotikum X je přeměněno enzymy hydrolytickými, redukčními nebo oxidačními na polárnější metabolit X-OH, který se stává substrátem pro enzymy konjugační.

Je zvykem řadit enzymy hydrolytické, redukční a oxidační do tzv. 1. fáze metabolismu, kde vzniká polárnější produkt zavedením nebo odkrytím substituentů, které jsou schopny reagovat s konjugačními enzymy, které tvoří 2. fázi metabolismu. Vzniklý konjugát je zpravidla látka velmi polární, disociovaná v pH prostředí, není schopna se resorbovat a je proto vylučována z organismu. Je samozřejmé, že každé xenobiotikum nemusí procházet oběma fázemi. Některá mají ve své molekule skupiny schopné konjugace, nepotřebují proto 1. fázi enzymových přeměn, nebo produkty 1. fáze jsou natolik polární, že mohou být vylučovány bez konjugace.

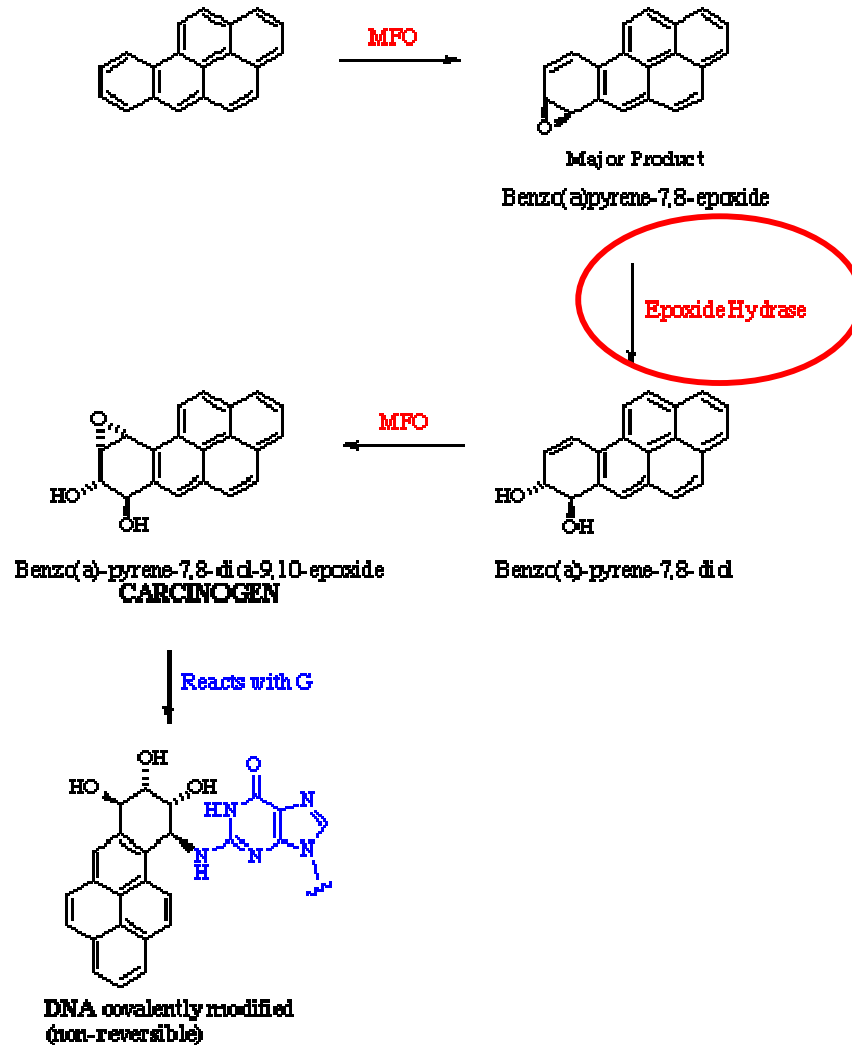
Vznik aktivních mutagenů/karcinogenů v průběhu metabolické aktivace



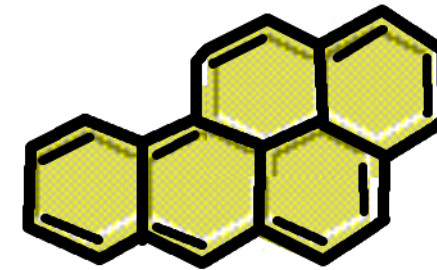
Transformační reakce

- většina enzymů je uložena v endoplazmatickém retikulu buněk
 - katalyzují vložení $-OH$, $-O$ skupiny do lipofilní molekuly prostřednictvím **hydrolytické** (arylesterázy, karboxyesterázy, acetylesterázy) **redukční, oxidativní** reakce
 - Příklad: mikrozomální **epoxydhydroláza** katalyzuje přeměnu epoxidů na dihydrodioly !!!
-

Metabolická aktivace benzpyrenu

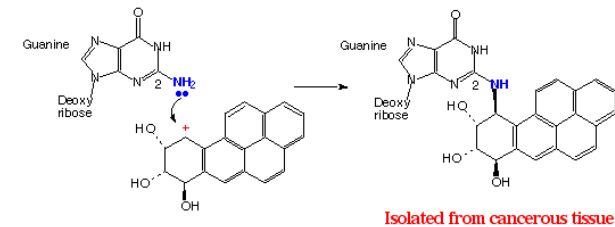


3,4 Benzpyren



Benzo[a]pyrene

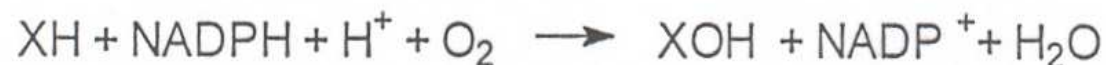
- Electrophile reacts with **guanine bases** at **N2 amino** group



Transformační reakce – oxidační enzymy

2.1.3. Oxidační enzymy

Enzymy oxidující xenobiotika tvoří početnou skupinu enzymů, z nichž největší roli hrají mikrosomální **monooxygenasy** a proto je probereme jako první. Jsou to membránové enzymy, které jsou lokalizovány na hladkém endoplasmatickém retikulu buněk různých tkání, zvláště jater, plic, ledvin, kůže, mozku, placenty a j., kde se projevují větší či menší aktivitou. Je možné říci, že většina xenobiotik je mikrosomálními monooxygenasami metabolizována a že produkty biotransformačních změn nejsou vždy látky inaktivní, jak již bylo upozorněno. Dělíme je na **monooxygenasy, které jsou závislé na cytochromu P-450 a flavinové monooxygenasy**. Pro svoji aktivitu potřebují **donor vodíku, kterým je redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH) a molekulární kyslík**. Jeden atom kyslíku inkorporují do molekuly substrátu (odtud název monooxygenasy) a druhý redukují na vodu, jak je znázorněno na následujícím schématu.



Obr 7. Schema aktivity monooxygenas

2.1.3.1. Mikrosomální monooxygenasy závislé na cytochromu (cytochromech) P-450

Patří k nejvíce probádaným biotransformačním enzymům. Cytochrom P-450 byl poprvé popsán Klingenbergem v roce 1948 a studován intensivně velkým počtem pracovníků v laboratořích na celém světě. Jeho význam vzrostl poznáním, že má monooxygenasovou aktivitu a je schopen metabolisovat lipofilní xenobiotika. Je to hemoprotein typu *b*, který je pevně vázán na membrány endoplasmatického retikula živočišných buněk, u bakterií je v rozpustné formě v cytosolu. P v jeho názvu znamená pigment a 450 je označení spektrálního maxima, které vykazuje cytochrom po redukci a vazbě s CO. Tato vlastnost byla využita pro stanovení jeho obsahu diferenční spektrofotometrií. Cytochrom P-450 je velmi labilní, snadno se přeměňuje v inaktivní formu, která se projeví posunem absorpčního maxima komplexu redukované formy s CO ze 450 nm na 420 nm. Z tohoto důvodu byla izolace cytochromu P-450 velmi obtížná, ale nezbytná pro pochopení mechanismu účinku. V roce 1968 bylo zjištěno, že pro enzymovou aktivitu je nutný nejen cytochrom P-450, ale i další enzym NADPH-cytochrom P-450 reduktasa a fosfolipidová frakce membrán, zvláště fosfatidylcholin. Uvedené tři součásti tvoří mikrosomální cytochromový monooxygenasový systém a zatímco první dvě mají enzymovou aktivitu, fosfatidylcholin slouží k udržení jejich nativní konformace a usnadňuje jejich vzájemné interakce.

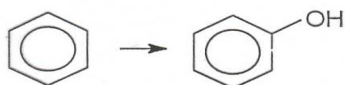
Příklady aktivace různých tříd chemických sloučenin mikrozomálními monooxygenázami

Některé typy reakcí, které jsou katalysovány mikrosomálními monooxygenasami závislými na cytochromu P-450:

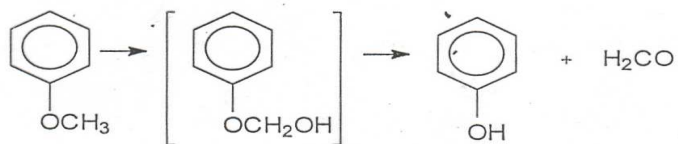
a) alifatická a alicyklická hydroxylace



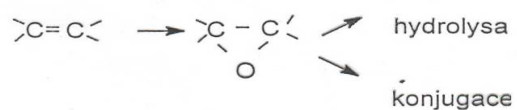
b) aromatická hydroxylace



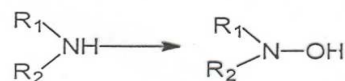
c) O- nebo N- dealkylace



d) oxidace izolované dvojné vazby



e) N-oxidace



Příklady některých chemických sloučenin aktivovaných mikrozomálními monooxygenázami

TABLE 1. Human P-450s Involved in the Activation of Some Potential Carcinogens and Toxicants

P-450 1A1	P-450 1A2	P-450 2E1	P-450 3A4
Benzo(a)pyrene and some other polycyclic hydrocarbons	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)	Benzene	Aflatoxin B ₁
	2-Amino-6-methyl-dipyrido-[1,2-a:3,2'-d]imidazole (Glu P-1)	Styrene	Aflatoxin G ₁
	2-Aminodipyrido-[1,2-a:3,2'-d]imidazole (Glu P-2)	Acrylonitrile	Sterigmatocystin
	2-Amino-3-methylimidazo-[4,5-f]quinoline (IQ)	Vinyl carbamate	7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene and some other polycyclic hydrocarbon dihydrodiols
	2-Amino-3,5-dimethylimidazo-[4,5-f]quinoline (MeIQ)	Vinyl chloride	17 β -Estradiol
	2-Amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]quinoline (MeIQx)	Vinyl bromide	6-Aminochrysene
	3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp P-2)	Ethyl carbamate	tris(2,3-Dibromopropyl)phosphate
	4-Aminobiphenyl	Trichloroethylene	Senecionine and possibly other pyrrolizidine alkaloids
	2-Naphthylamine	Carbon tetrachloride	1-Nitropyrene
	2-Aminofluorene	Chloroform	
	2-Acetylaminofluorene	Methylene chloride	
	2-Aminoanthracene	N-Nitrosodimethylamine	
	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)	N-Nitrosodiethylamine	
		1,2-Dichloropropane	

Data from Shimada *et al.* (1989a) and Guengerich and Shimada (1991).

Table 5.3. Nomenclature and chromosomal localization of human P450 genes involved in xenobiotic metabolism

Gene family	No. of genes	Chromosomal location	Regulated by
CYP1A	2	15q22–qter	Polycyclic aromatic hydrocarbons, dioxins
CYP1B	>1	–	Steroid hormones (?)
CYP2A	2 or 3	19q13.1–13.3	Pyrazole, ethanol, hormones
CYP2B	2 or 3	19q13.1–13.3	Phenobarbital, PCBs, dexamethasone
CYP2C	5–10	10q24.1–24.3	Hormones, phenobarbital
CYP2D	3 or 4	22q11.2–qter	Unknown
CYP2E	1	10	Ethanol, diabetes, starvation, solvents
CYP2F	1 or 2	19	Unknown
CYP3A	3–5	7q21.3–q22	Hormones
CYP4A	2–4	1	Phenobarbital, clofibrate, fatty acids
CYP4B	1	1p12–q34	Phenobarbital

Příklady dalších oxidoredukčních enzymů

- **Alkoholy** – alkoholdehydrogenázy (játra, ledviny, střevo, plíce)
 - **Aldehydy**- aldehyddehydrogenázy
 - **Biogenní aminy** – monoaminoxigenázy
 - **Rostliny** – peroxydázy a peroxygenázy
-

37 Etanol

Etanol, etylalkohol, C_2H_5OH , je bezbarvá kapalina s charakteristickou vůní. Při požití ve vyšší koncentraci způsobuje pálení v ústech a jícnu. Obsah etanolu v alkoholických nápojích²⁸ je v různé výši, u 12% piva²⁹ činí nejméně 15,4 g absolutního etanolu na 1/2 litru, u vína 15,8 g/200 ml, u koncentrátů o obsahu etanolu 40 % je 15,8 g/50 ml (jde o objemová procenta, proto při přepočtu je nutno vycházet z hustoty etanolu) a výjimečně i více (např. 80% rum).

37.1 Vstřebávání etanolu

Etanol se může do krevního oběhu dostat prakticky všemi cestami, tedy nejenom gastrointestinálním traktem (GIT), ale také inhalací, sliznicí močového měchýře, spojivkou či perkutánně. Cesta **inhalační**, tedy vdechování etanolových par, se dříve používala při alkoholizování experimentálních zvířat. Pro forenzní praxi nemá prakticky žádný význam. Cesta **perkutánní**, tedy neporušenou pokožkou, existuje, ale množství vstřebaného etanolu touto cestou je natolik zanedbatelné, že se v praxi také neuplatňuje.

V důsledku toho, že etylalkohol má malou molekulu a dobře se rozpouští ve vodě, velmi snadno prochází přes biologické membrány. Při pití se etanol začíná vstřebávat již sliznicí dutiny ústní. V žaludku je situace složitější a záleží na tom, zda je žaludek naplněný či prázdný. V prázdném žaludku nedochází k promíslení s potravou a etanol přichází přímo do styku s žaludeční sliznicí. Vzhledem k velké ploše a dobré vstřebávací schopnosti této sliznice prochází etanol celkem rychle cestou gastrických vén a dolní duté žíly do krevního oběhu. Část etanolu, která se vstřebala již v žaludku, se tedy v první fázi vyhne oběhu portálnímu, a tím i průchodu játry. Může tedy velmi rychle ovlivňovat CNS. Při naplněném žaludku se alkoholický nápoj částečně promísí s žaludečním obsahem a část prochází, stejně jako každá jiná tekutina, podél malého zakřivení do střeva. Promíslením s potravou nedochází k okamžitému a bezprostřednímu styku celého množství požitého etanolu s žaludeční sliznicí a jeho vstřebávání je tedy značně zpomaleno. Převážná část požitého etanolu (až 80 %) prochází do střeva, je vstřebána do portálního oběhu a dostává se přímo do jater. Časové rozdíly v rychlosti pronikání etanolu do krve z různých druhů alkoholických nápojů při různé náplni žaludku jsou uvedeny

²⁸ § 1 odst. 2 Zákona č. 37/89 Sb., o ochraně před alkoholismem a jinými toxikomaniami: Alkoholickými nápoji podle tohoto zákona jsou lihoviny, destiláty, víno, pivo a jiné nápoje, které obsahují více než 0,75 objemového procenta alkoholu.

²⁹ Procentnost piva udává procento pevných látek v mladíně, s obsahem etanolu souvisí jen nepřímo.

v tabulce znázorňující časový úsek, za který je skončeno vstřebávání etanolu do krevního oběhu z GIT (tab. 56). Nápoje obsahující CO_2 a teplé alkoholické nápoje se vstřebávají rychleji. Do krevního oběhu se nevstřebá veškerý vypitý etanol. Je tedy nutné vždy rozlišovat mezi množstvím etanolu *požitého* a množstvím etanolu *vstřebaného*. Tento rozdíl se nazývá **vstřebávací deficit etanolu** a činí u koncentrátů a vína průměrně 10 %. U piva do zkonsumovaného množství 5 piv (2,5 l) činí 10 %, při požití 6–10 piv (3–5 l) 20 % a při požití 11 piv a více až 30 %

Tab. 56. Trvání vstřebávací - resorpční fáze požívání etanolu

Náplň žaludku	Koncentráty a víno	Pivo
na lačno	do 30 minut	do 60 minut
lehká náplň	do 60 minut	do 90 minut
střední náplň	do 90 minut	do 120 minut
nadměrná náplň	do 120 minut	do 150 minut

37.2 Metabolismus etanolu

Znalost metabolismu etanolu je klíčem k porozumění biochemickým, klinickým a forenzně patomorfologickým procesům při alkoholismu. Etanol může být syntetizován endogenně ve stopovém množství bakteriální fermentací ve střevě, ale jde o zcela zanedbatelné množství. Zástupci rodu *Candida* mohou endogenně syntetizovat ve střevě množství etanolu zapříčiňující koncentraci etanolu v krvi většinou nepřesahující řádově tisíce g/kg. Hlavní množství etanolu tedy přichází do gastrointestinálního traktu, ze kterého je absorbováno, exogenně. Ze vstřebaného etanolu se přibližně 2–10 % vyloučí dechem a močí, zbytek se metabolizuje, převážně v játrech. Proto je rychlost poklesu hladiny etanolu v krvi při jejich poškození zpomalena. Predominantní úloha jater při metabolismu etanolu je přímo prokázána i u jedinců s porto-kaválním shuntem. Extrahepatický metabolismus etanolu je zanedbatelný. Hepatocyt obsahuje tři hlavní cesty pro metabolizaci etanolu a každá z nich je vázána na rozdílné subcelulární struktury.

ADH (alkoholdehydrogenáza) oxiduje 2/3–3/4 vstřebaného etanolu, je vázána na cytozol nebo rozpustné frakce v buňce a její aktivita se s chronickou konzumací nezvyšuje.

MEOS (mikrozomální etanol oxidující systém) oxiduje 1/4–1/3 vstřebaného etanolu, je lokalizovaný na endoplazmatickém retikulu a jeho aktivita se s chronickou konzumací zvyšuje 2–3x.

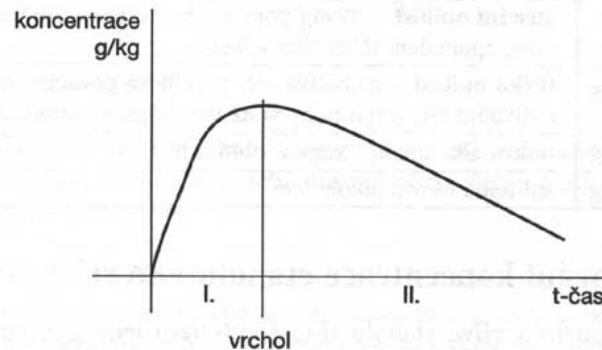
Kataláza oxiduje maximálně 2 % vstřebaného množství etanolu, lokalizovaná je na peroxizomech a její aktivita se s chronickou konzumací nezvyšuje.

Metabolitem etanolu je acetaldehyd, z něhož za přispění aldehyddehydrogenázy vzniká acetát a dále přes Szentgyorgyiho-Krebsův cyklus trikarboxylových kyselin v konečné fázi H_2O a CO_2 . Oxidace etanolu na acetaldehyd je poměrně rychlý proces. Některá léčiva (např. Disulfiram) mají schopnost inhibovat aktivitu aldehyddehydrogenázy, a tím výrazně zvyšovat obsah acetaldehydu v krvi.

Pravidelní pijáci alkoholických nápojů jsou schopni tolerovat vyšší množství etanolu hlavně z důvodů adaptace jejich CNS. Navíc se u nich v důsledku zvýšené aktivity MEOS zrychluje metabolizace etanolu.

37.3 Odbourávání a vylučování etanolu

Vstřebaný etanol se odbourává především v játrech. Jakkoliv jsou v tomto procesu individuální rozdíly, bylo stanoveno jisté biologické rozmezí v rychlosti poklesu koncentrace etanolu v krvi. Prakticky není spolehlivý způsob, jak tuto rychlost podstatně nebo účinně zvýšit. Metabolismus etanolu začíná prakticky okamžitě s jeho požitím. Rychlost vstřebávání etanolu je vyšší než rychlost vylučování. Proto v resorpční (vstřebávací) fázi jeho koncentrace v krvi stoupá. Po jednorázovém napití (obr. 107) je vzestup křivky v podstatě pravidelný (na obrázku označeno I.). Při opakovaném pití vzhled vzestupné části křivky záleží nejen na množství a koncentraci alkoholického nápoje, ale i na frekvenci konzumace jednotlivých dávek. Po skončení pití ještě po nějakou dobu hladina etanolu v krvi stoupá. Tato doba závisí na druhu alkoholického nápoje (pivo, víno a destiláty) a na náplni žaludku, jak je detailně uvedeno v tabulce 56. Po dosažení vrcholu počíná hladina etanolu v krvi klesat (sestupná část křivky na obrázku označená II.), a to rychlostí 0,12–0,2 g/kg za 1 hodinu (tzv. faktor β_{60}) až k hladině nulové.



Obr. 107. Křivka vývoje koncentrace etanolu v krvi po jednorázovém napití
I. – fáze vstřebávací (resorpce)
II. – fáze vylučovací (eliminace)

Odbourávání alkoholu

- **Pivo** (muž 75 kg) - 1 dvanáctka - 2 hodiny 3 minuty
1 desítka - 1 hodina 37 minut
2 dvanáctky - 4 hodiny 7 minut
4 dvanáctky - 8 hodin 13 minut
8 dvanáctek - 16 hodin 26 minut
10 dvanáctek - 20 hodin 32 minut

Víno (muž 80 kg) - 2 deci - 2 hodiny 40 minut
- 4 dcl - 5 hodin 20 minut
- litr - 13 hodin 20 minut
- litr a půl - 19 hodin 40 minut

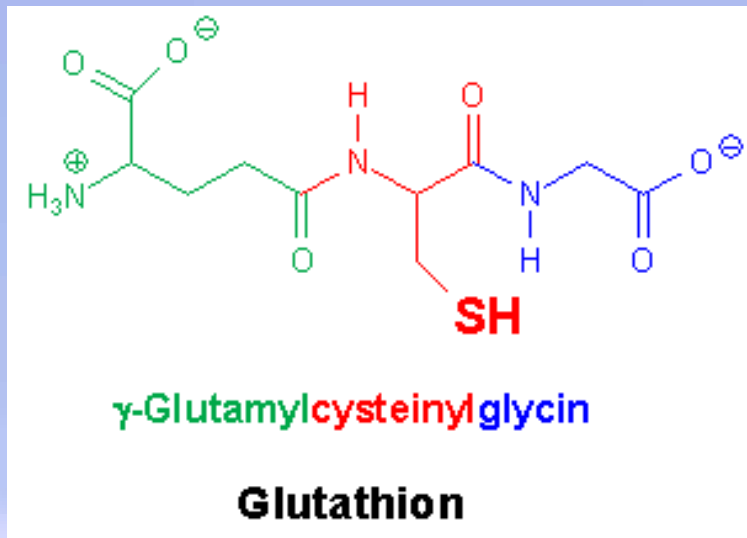
Destiláty (muž 80 kg) - 1 panák(0.05l) - 2 hodiny 12 minut
- 2 panáky - 4 hodiny 24 minut
- 4 panáky - 8 hodin 48 minut
- 6 panáků - 13 hodin 12 minut
- 8 panáků - 17 hodin 36 minut
- 10 panáků - 22 hodin

- **Ženské tělo raguje na alkoholické nápoje jinak - rozdíl v krevní hladně při stejném množství vypitého alkoholu:**
 - **Tělo ženy alkohol jinak přijímá než u muže: ženské tělo obsahuje více tuku, do kterého alkohol neprostupuje.** Má tak v těle "méně místa" a způsobuje rychleji opilost. Rovněž dětské tělo je velmi citlivé (díky malé hmotnosti) na množství alkoholu a rychle vede k opilosti a ev. smrti.
 -
-

Konjugační reakce

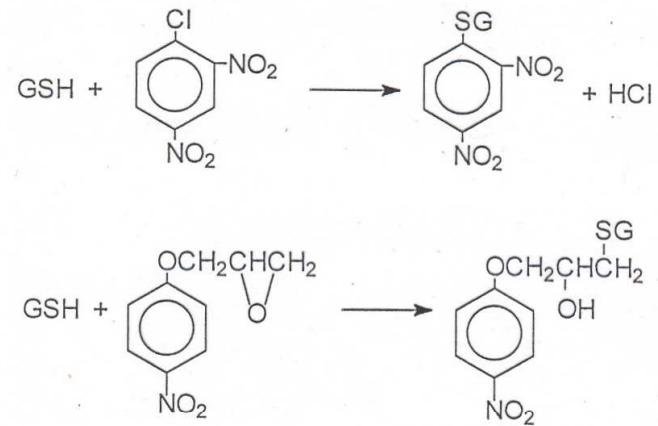
- slouží ke konjugaci s endogenními konjugačními činidly, jimiž jsou produkty metabolismu buňky (**např. kyselina glukuronová, aktivní sulfát, aktivní methionin, aminokyseliny** atd.) a následnému **vyloučení** z organismu
 - reakce jsou zprostředkovány řadou enzymů (transferázami **např. glutathion S-transferáza (GSTs), sulfotransferáza, N-acetyltransferáza, UDP-glukuronyl transferázou** aj.)
 - **genetický polymorfismus !!!**
-

Konjugace s glutathionem



GST (glutathion S transferáza) – katalyzuje reakci glutathionu s celou řadou organických sloučenin:

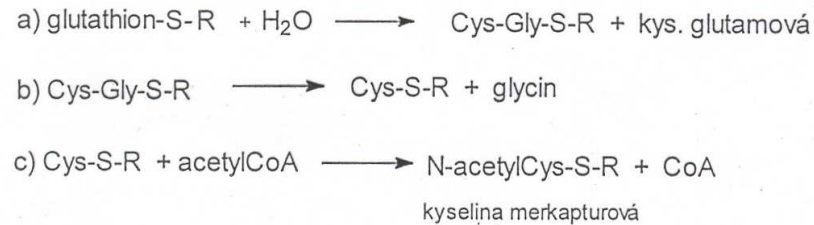
- eliminace vysoce reaktivních sloučenin
 - zvyšuje solubilitu lipofilních sloučenin
 - zvýšená exprese izoenzymů GST v nádorech – rezistence k chemoterapeutikům !!!
 - 4 hlavní skupiny cytosolické GST– alfa, mu, pí, theta – kódována řadou genů – **polymorfní výskyt alel** (např. GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4)
-



Obr. 21. Schema konjugace s glutathionem

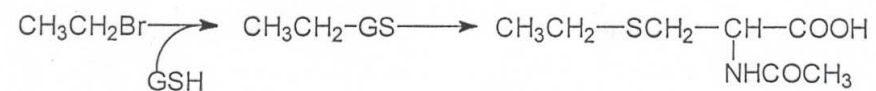
Na rozdíl od jiných konjugátů, nejsou konjugáty s GSH konečným produktem biotransformace. Účinkem γ -glutamyl-transpeptidasy je konjugát dále transformován:

Glutathion S-konjugát je přeměněn na merkapturovou kyselinu několika postupnými kroky: nejprve je odštěpen glutamát, v dalším stupni glycin a zbývá cystein S-konjugát, který acetyltransferasou je acetylován a vzniká příslušná merkapturová kyselina (jak ukazuje následující schema):



R.....konjugovaný zbytek xenobiotika

Obr. 22. Přeměna GS-konjugátu



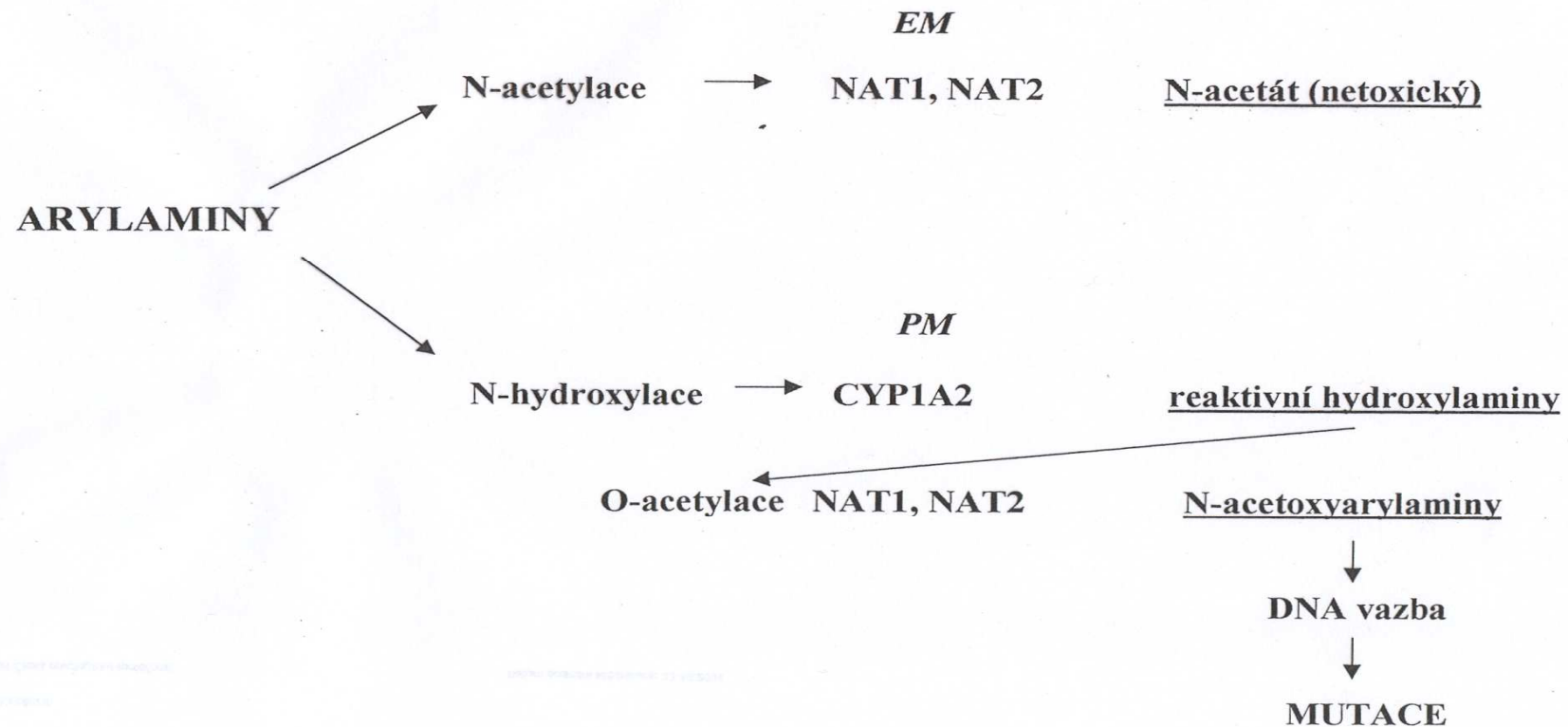
N-acetyltransferáza (NAT)

- katalyzuje přenos **acetátu** z acetyl CoA na primární aminovou a hydrazinovou skupinu – vytváří acetamidy a hydrazidy
- klinicky prokázána v populaci existence „**rychlých - EM**“ a „**pomalých - PM**“ acetylátorů
- výskyt polymorfních lokusů NAT1 a NAT2 – rozdílná citlivost k mutagenům – PM (5 – 20% Asiatů, 50% Afroameričanů, 65% bělochů, **90% populací u Středozemního moře**)

Např. pomalí acetylátóři (rr)– výskyt **nádorů moč. měchýře**, poškození jater, rychlí acetylátóři (RR, Rr) – vyšší četnost **nádorů konečníku**

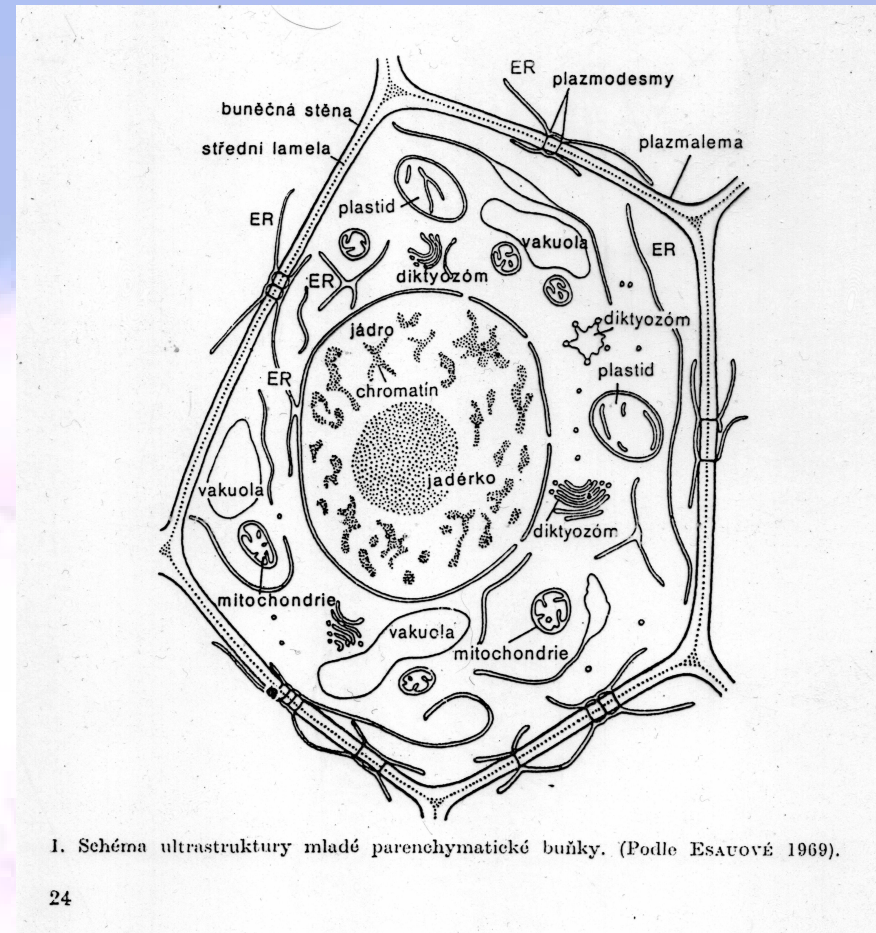
Acetylace u EM a PM

N-ACETYLTRANSFERÁZA

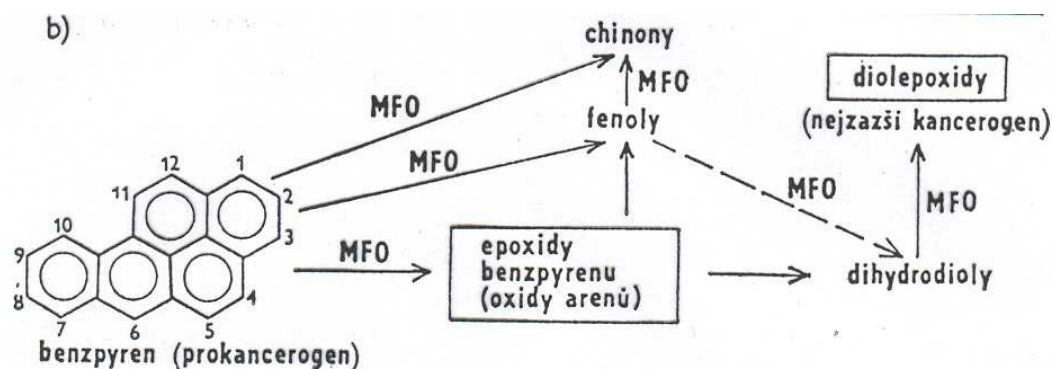
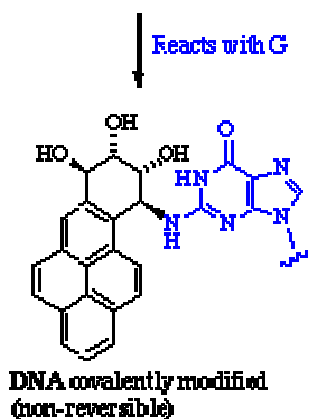
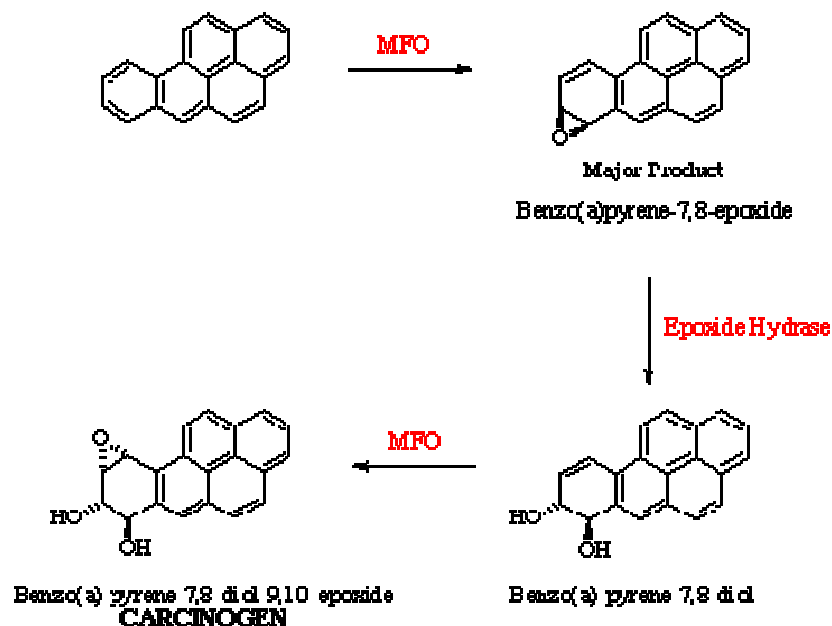


Procesy ukládání - rostliny

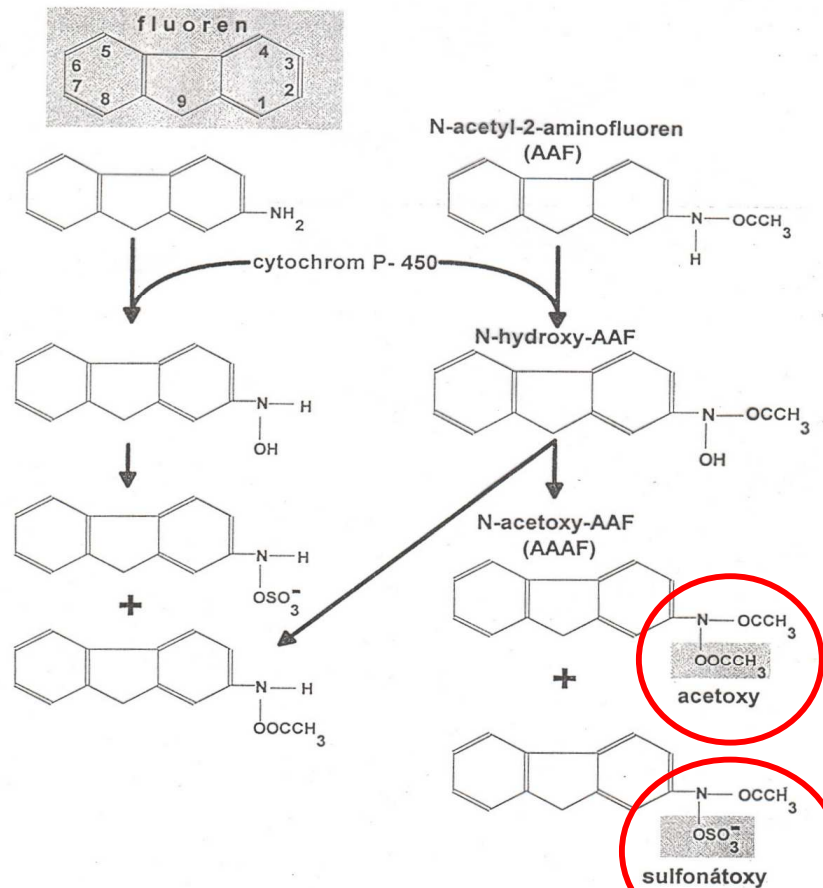
- export chemických látek do vakuol a mezibuněčného prostoru, zabudování do ligninu
- možnost uchovávat zabudovaná xenobiotika v ligninu – riziko pro živočichy a člověka



Příklady metabolické aktivace promutagenů - benzpyren

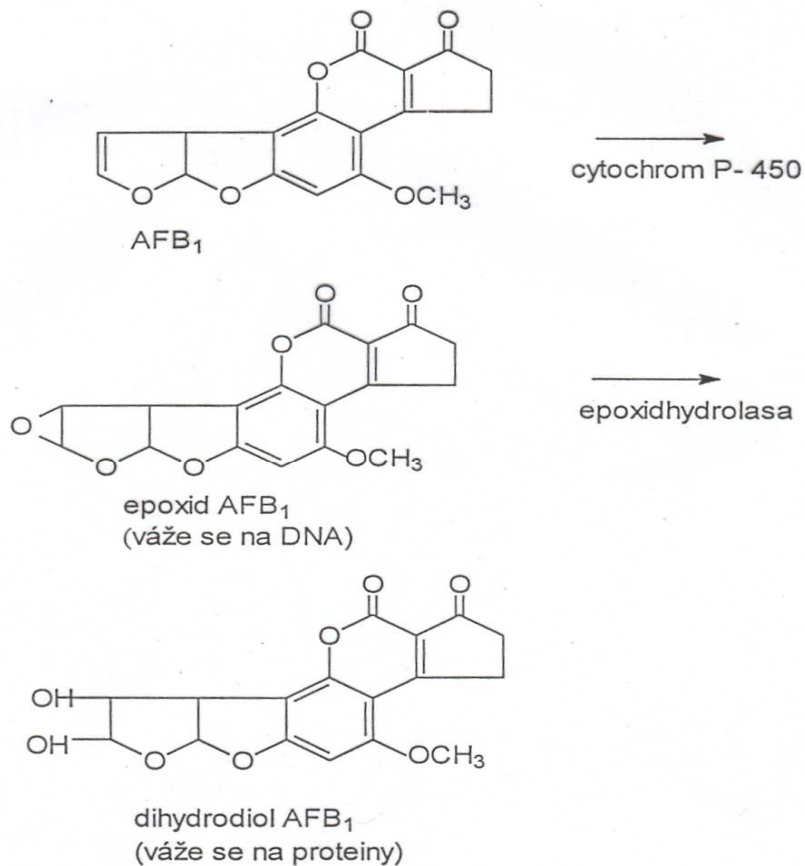


Příklady metabolické aktivace promutagenů – aromatické aminy



Obr. 379
Vznik nejbližšího (N-hydroxy-AAF) a nejzáššího (N-acetoxy-AAF)
kancerogenu AAF metabolickou aktivací

Příklady metabolické aktivace promutagenů - aflatoxiny

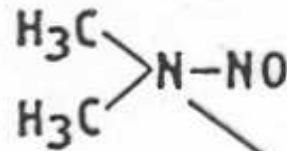


Obr. 5. Tvorba dihydrodiolu aflatoxinu AFB₁ aktivitou epoxidhydrolasy

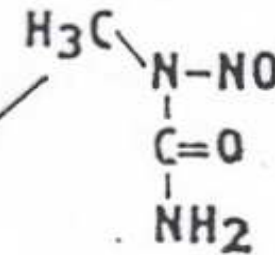
Příklady metabolické aktivace promutagenů - dimetylnitrozamin

c)

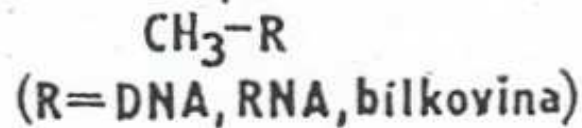
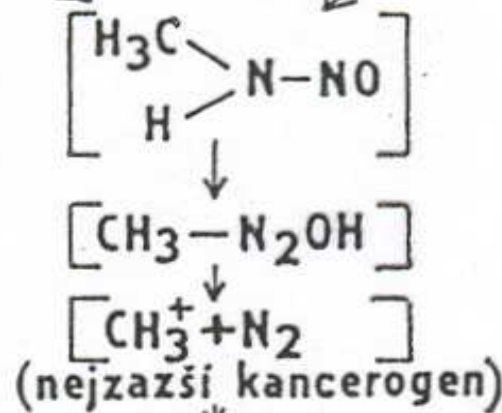
dimetylnitrozamin
(prokancerogen)



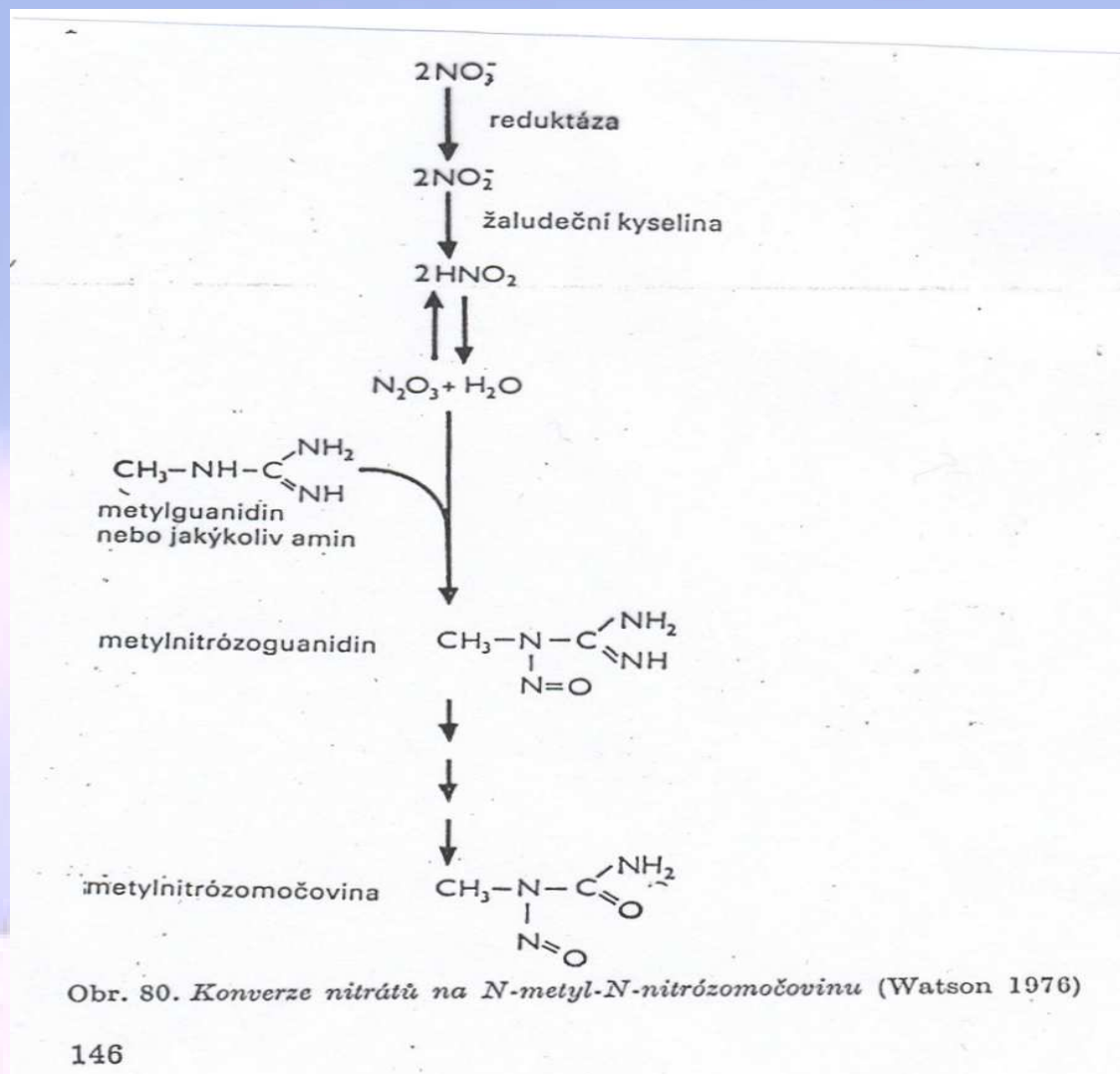
N-metyl-N-nitrozomočovina
(prokancerogen)



MFO



Příklady metabolické aktivace promutagenů - dusičnany



Rostlinné promutageny

- **látky mutagenní** pro některé rostlinné druhy, ale **nemutagenní** pro savce či jiné organismy



Detekce:

- in vitro*** - pomocí metabolické aktivace za účasti rostlinných mikrozomálních enzymů (tzv. S-1 frakce)
např. (promutagen + S-1 frakce (extrakt z listů, hlíz rostlin) + testovací systém
 - in vivo*** – zvýšení frekvence mutací u rostlin po aplikaci promutagenu (např. chromozomové aberace, genové mutace) → **testy na detekci mutací u rostlin**
-

Rostlinné promutageny - příklady

Tyto promutageny nevykazují mutagenní aktivitu při použití Amesova testu s metabolickou aktivací (homogenát z jater), ale jsou aktivovány rostlinným metabolismem !!!

- a) maleinhydrazid a jeho soli**
 - b) atrazin a jiné s-triaziny**
 - c) 1,2 – dibromethan**
 - d) azid sodný**
-

Různé typy rostlin mohou aktivovat různé promutageny !!!!

TABLE 3
MUTAGENIC ACTIVITY OF PROMUTAGENS IN VARIOUS PLANT IN VIVO ASSAYS

Assay	Endpoint	Mutagenic	Nonmutagenic
Arabidopsis	p.m.	NDMA, NMEA, NMBA, NMBeA, BaP \pm , benzidine, aflatoxins	NDEA, NDBA, NMPA, NP, NM, 2-AAF, EtOH, azide, MH
Tradescantia	p.m.	NDMA, NDEA, FDB, BaP \pm , vinylchloride, diallate, MH, DMBA \pm , atrazine	Azide, simazine
Barley	mn.	BaP, EDB, azide, MH	Benzidine, atrazine, NDEA
	p.m.	Azide, atrazine \pm , simazine \pm , EDB, MH	NDMA
	c.a.	NDMA \pm , NDEA \pm , NDBA \pm , atrazine \pm , simazine \pm , EDB	
Soybean	p.m.	NDMA, AF-2, EDB, azide	BaP
Maize	waxy	Atrazine, simazine, cyanazine	Irocyanazine, alochlor, propachlor
	Yg ₂	AF-2	Azide
<i>N. tabacum</i>	p.m.	NDMA, NDEA, MH	
<i>Vicia faba</i>	c.a.	NMPa, 2-AAF, aflatoxin, EtOH, AF-2, atrazine, simazine, MH, pyrroliz. alkal.	NDMA, NDEA
<i>Allium cepa</i>	c.a.	Benzidine, aflatoxin, pyrroliz. alkal., styrene, EtOH, cycasin	EDB, BaP

Abbreviations: \pm , both positive and negative results were published; c.a., chromosomal aberrations; mn., micronuclei in pollen tetrads; p.m., point mutations; pyrroliz. alkal., pyrrolizidine alkaloids.

Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních reakcí organismu

- **mezidruhové rozdíly** (nízké aktivity některých enzymů, jiné cesty zpracování substrátu)
- **vnitrodruhové rozdíly** (endogenní vlivy – polymorfismus, exogenní vlivy – **dieta, hladovění**)
- **pohlaví** (pohlavně ovlivněné izoformy enzymů)
- **věk** (ve stáří klesá celkové množství P450 závislých monooxygenáz, postupný úbytek buněk ER)
- **genetické faktory**

Fenotypová variabilita v metabolismu mnoha významných chemických látek je důsledkem geneticky determinovaných rozdílů v **aktivitě metabolizačních enzymů**. Genetickou podstatou této variability je **polymorfismus** alel genů podmiňujících zpracování a přeměny chemických látek v lidském organismu

Table 5.1. Some enzymes involved in drug metabolism in man

Phase I: functionalization reactions	Phase II: conjugation reactions
<i>P450 monooxygenases</i>	<i>Glutathione S-transferases</i>
<i>Flavoprotein monooxygenases</i>	<i>N-acetyl transferases</i>
Monoamine oxidases	<i>N-acyl transferases</i>
<i>Alcohol dehydrogenases</i>	<i>UDP-glucuronyl transferases</i>
<i>Aldehyde dehydrogenases</i>	<i>Sulphotransferases</i>
<i>Arylesterases</i>	<i>Methyl transferases</i>
<i>Cholinesterases</i>	<i>Epoxide hydrolases</i>
<i>Epoxide hydrolases</i>	
Amidases	
Nitroreductases	

Enzymes in italic have been shown to, or are thought to, exhibit genetic polymorphism in man.

The existence of multiple alleles at loci which encode drug-metabolizing enzymes can result in differential susceptibilities of individuals within a population to the mutagenic or carcinogenic effects of drugs or environmental chemicals. For example, the ability to metabolize the antihypertensive drug debrisoquine to its 4-OH metabolite shows a bimodal distribution within the population (Figure 5.1), which has been shown to result from the polymorphic expression of the cytochrome P450 gene active in its metabolism, *CYP2D6* (Mahgoub *et al.*, 1977). The majority of individuals (extensive metabolizers, EM) have at least one intact copy of the *CYP2D6* gene and can metabolize debrisoquine efficiently, resulting in most, if not all of the administered drug being converted to its primary (4-OH) metabolite. The metabolic ratio for debrisoquine (i.e. the ratio of the concentration of unchanged drug to the concentration of the 4-OH metabolite) is therefore low. Individuals with a mutated, inactive form of *CYP2D6* (poor metabolizers, PM), are unable to metabolize the drug, and have a correspondingly high metabolic ratio.

Poymorfismus alel genu CYP2D6

Table 5.4. Alleles at the human *CYP2D6* gene locus

Allele	<i>Xba</i> I RFLP	Mutation	Functional significance
<i>CYP2D6 wt</i>	29 kb	–	Wild-type allele
<i>CYP2D6-A</i>	29 kb	A2637 deletion (exon 5)	Inactive
<i>CYP2D6-B</i>	29, 44, 9 + 16 kb	G→A (intron 3/exon 4)	Inactive
<i>CTP2D6-C</i>	29 kb	Lys 281 deletion	Decreased activity
<i>CYP2D6-Ch1</i>	29, 44 kb	–	Decreased activity
<i>CYP2D6-D</i>	11.5, 13 kb	Gene deletion	Inactive
<i>CYP2D6-E</i>	29 kb	–	Inactive
<i>CYP2D6-F</i>	29 kb	–	Inactive
<i>CYP2D6-G</i>	29 kb	–	Inactive
<i>CYP2D6-J</i>	29, 44 kb	C→T (exon 1) G→C (exon 9)	Decreased activity
<i>CYP2D6-L</i>	29 kb	–	Wild-type activity
<i>CYP2D6-L2</i>	42 kb	Gene amplification	Increased activity
<i>CYP2D6-L12</i>	175 kb	–	Increased activity
<i>CYP2D6-T</i>	–	Base deletion T ¹⁷⁹⁵ , exon 3	Inactive
<i>CYP2D6-W</i>	29, 44 kb	–	Decreased activity

Bimodální distribuce genu CYP2D6 v populaci

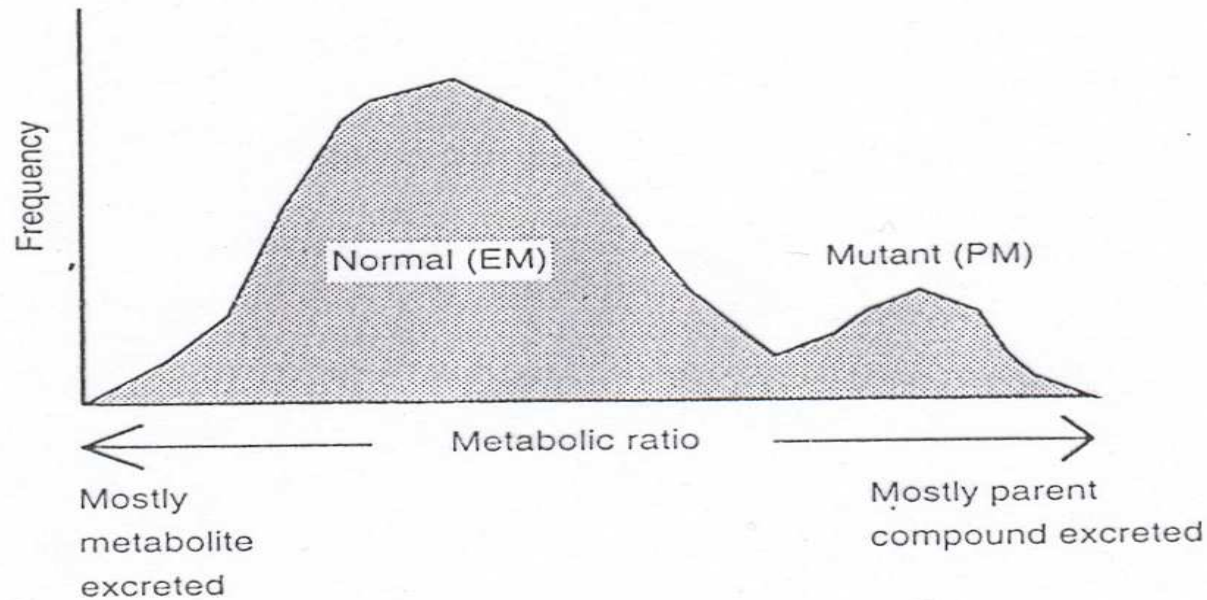


Figure 5.1. Bimodal distribution of drug clearance by CYP2D6 in a population study.

Polymorfismus genu CYP2D6 a výskyt nádorů

vyšší riziko u PM !!!

Table 5.6. Distribution of *CYP2D6* alleles in cancer and PD patients (Wolf *et al.*, 1992)

Patients	No. of samples	Genotype ^a			% MA ^b	χ^2	<i>p</i> <
		%EM	%H	%PM			
Random controls	720	66.1	29.6	4.3	19.1	—	—
Emphysema	151	61.6	35.1	3.3	20.9	2.35	0.50
All cancers	1759	63.4	31.6	5.0	20.8	6.38	0.05*
Lung cancer ^c	361	64.8	31.6	3.6	19.4	0.96	0.90
Breast cancer	437	66.8	29.3	3.9	18.5	0.22	0.90
Colon cancer	115	63.8	29.6	6.9	21.7	2.88	0.50
Leukaemia ^d	312	65.7	26.9	7.4	30.8	7.65	0.02*
Teratoma ^e	169	65.7	30.8	3.5	18.9	0.32	0.90
Melanoma	127	54.3	39.4	6.3	26.0	7.91	0.02*
Bladder cancer	184	53.8	41.8	4.4	25.3	13.50	0.005*
Prostate cancer	54	59.2	31.5	9.3	25.0	3.62	0.5
Parkinson's disease	229	60.7	27.5	11.9	—	22.3	0.0001*

^a EM, extensive metabolizer; H, heterozygous; PM, poor metabolizer.

^b Mutant allele frequency.

^c 145 squamous cells carcinomas, 74 adenocarcinomas, 52 small cell lung cancers, 90 other lung cancers.

^d 141 acute myeloid, 117 chronic myeloid, 37 myelodysplastic syndrome, 17 other leukaemias.

^e Data from teratocarcinoma and seminoma patients.

* Statistically significant.

Kouření a zhoubné bujení

Kouření – 30 % úmrtnost na rakovinu

Hlavní proud tabákového kouře (vdechovaný):

4-aminobifenyly, arzen, benzen, benzidiny, benzpyreny, beryllium, kadmium, chrom, 2-naftylamin, nitrosaminy, polonium, **PAU**, vinylchlorid

Vedlejší proud tabákového kouře (vydechovaný): koncentrace karcinogenů mnohonásobně vyšší !

Metabolickou aktivaci karcinogenů přítomných v tabákovém kouři může ovlivňovat **genetický polymorfismus** genů pro enzymy cytochromů P450 (CYP1A1, CYP2D6) a genů pro enzym glutathion-S-transferázu, **arylhydroxylázu** →

- **pomalí metabolizátoři (PM)**
- **extenzivní metabolizátoři (EM)**



NK=nekuřáci, EXK=bývalí kuřáci, K=kuřáci

NÁDOR	NK	EXK	K(CIG/DEN)				DÝMKA DOUTNÍK
			1-9	10-19	20-39	>40	
Plíce	1,0	5,0	4,6	11,5	22,4	30,0	7,0
Hltan	1,0	2,5	2,5	5,4	9,9	13,0	3,5
Jícen	1,0	2,0	1,8	3,4	5,9	7,7	3,0
Hrtan	1,0	2,0	1,6	2,9	4,9	6,3	3,5
Ústa a jazyk	1,0	2,0	1,6	2,9	4,9	6,3	3,5
Slinivka břišní	1,0	1,0	1,2	1,6	2,1	2,5	1,0
Močový měchýř	1,0	1,5	1,5	2,5	4,0	5,0	1,5
Ledviny	1,0	1,0	1,2	1,5	1,9	2,2	1,0

Tab. 1: Relativní riziko nádorů, které mají kauzální vztah ke kouření

Poymorfismus enzymů GST a kouření

- GST – podílí se např. na biotransformaci aflatoxinu B1, PAH aj.
 - nositelé nulové alely GSTM1(homozygoti 40-50 % bělošské populace)- vyšší pravděpodobnost **vzniku nádoru plic u kuřáků !!!**
-