

Xenobiochemie

Přednáška pro mediky

Prof. Dr. Sixtus Hynie, DrSc.

ÚLB, 1. LF UK v Praze

2005

Definice:

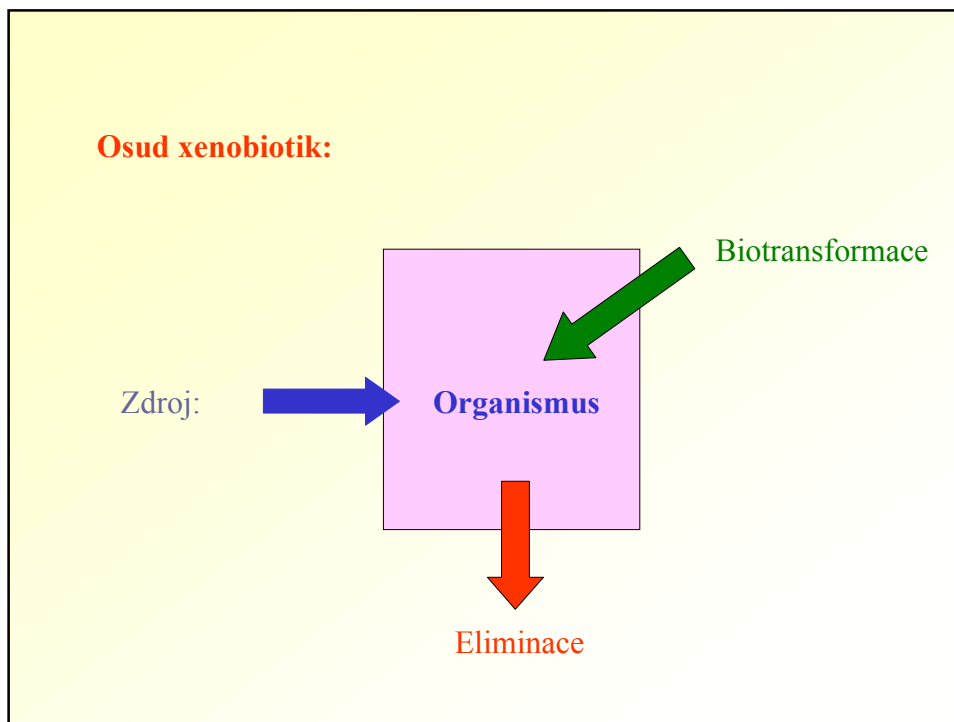
Xenobiotika - látky tělu cizí, které mají často škodlivý účinek

Původ slova podle: J. Kábrt a J. Kábrt:

Lexicon Medicum, Galen 1995:

Řecky: **xenos** = cizí; **řecky bios** = život

Latinsky: xenobioticus, a, um



Zdroj xenobiotik:

Potraviny

Látky v prostředí – přirozené

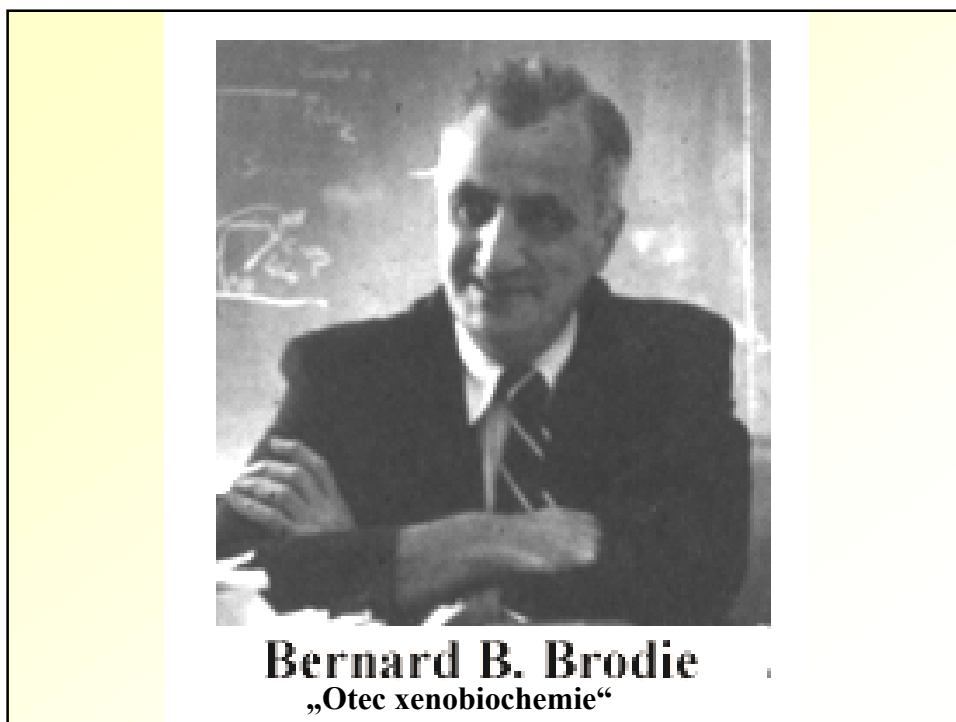
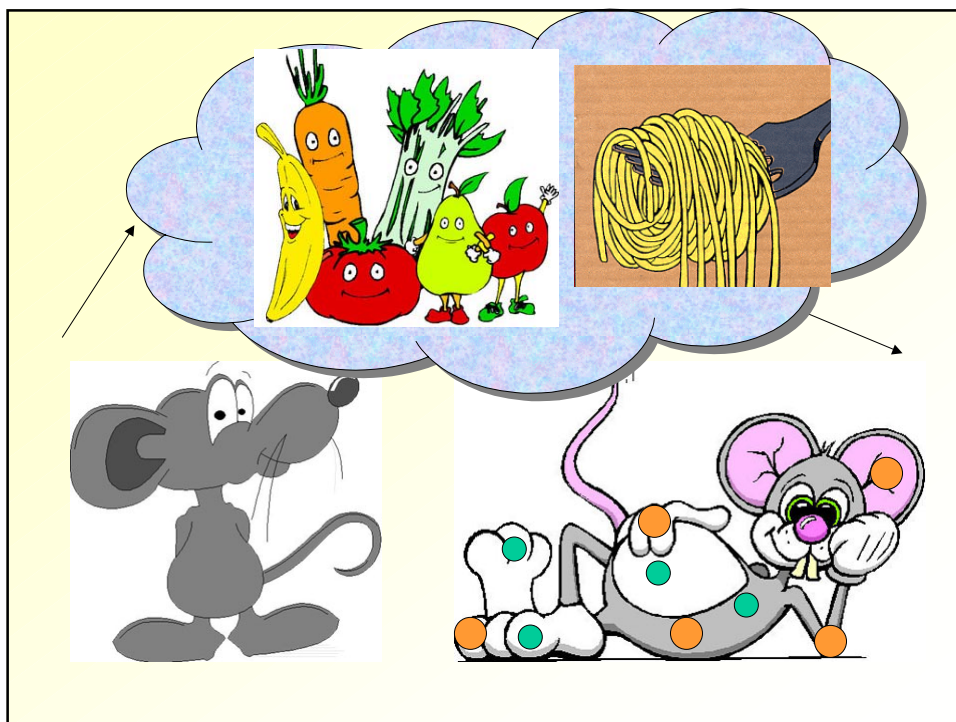
Látky pro zemědělství a průmysl (pesticidy, herbicidy, pigmenty, konzervační látky, polychlorované bifenyly)

Synteticky připravené látky pro použití lidmi, včetně léčiv

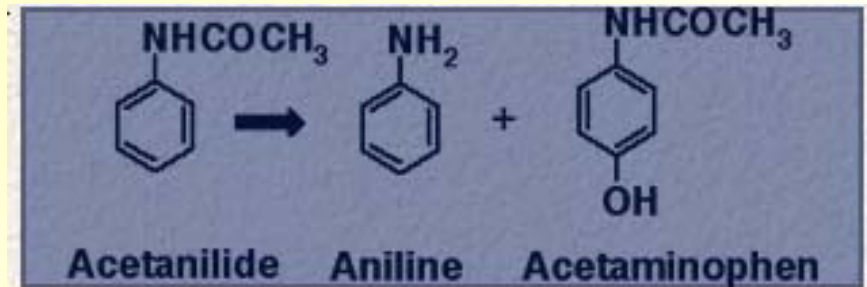
Vstup do organismu: zažívací trakt, plíce, kůže

Vyloučení z organismu: močí, stolicí, plícemi, kůží

Na biotransformaci xenobiotik se podílí přes 30 enzymů; uvádíme cytochrom P450 a konjugace, které mají největší význam.

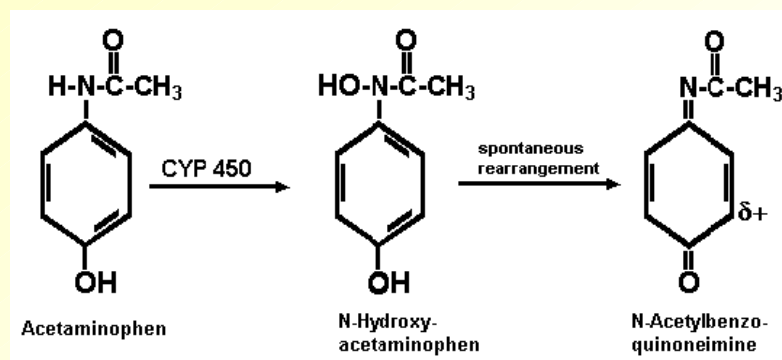


Identifikace anilinu jako toxického produktu směsných analgetik, který vedl k poškození jater a úmrtí.

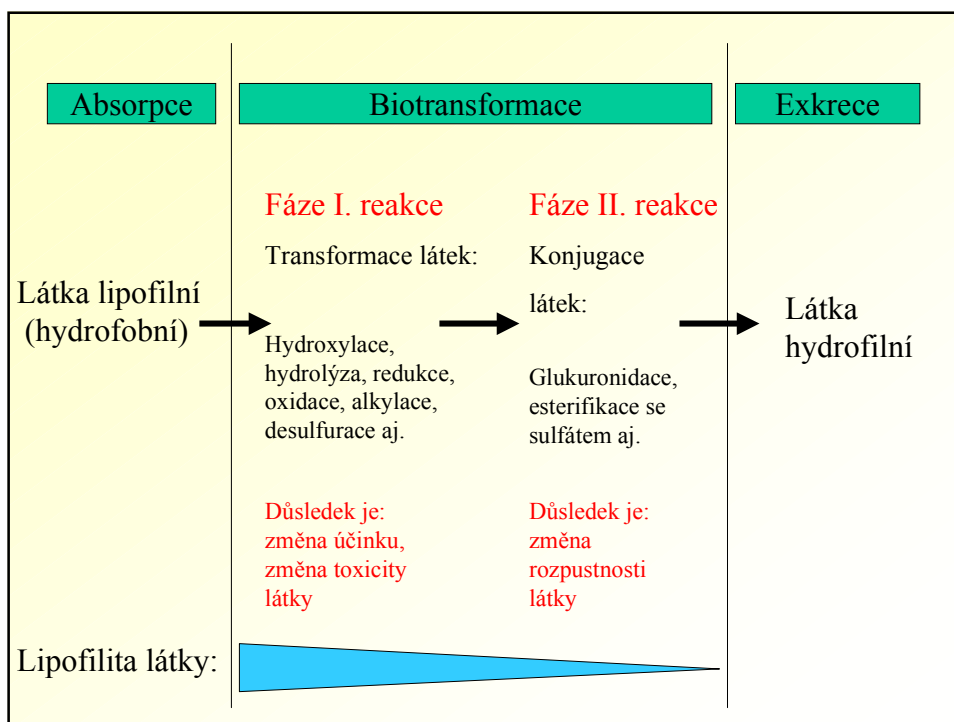
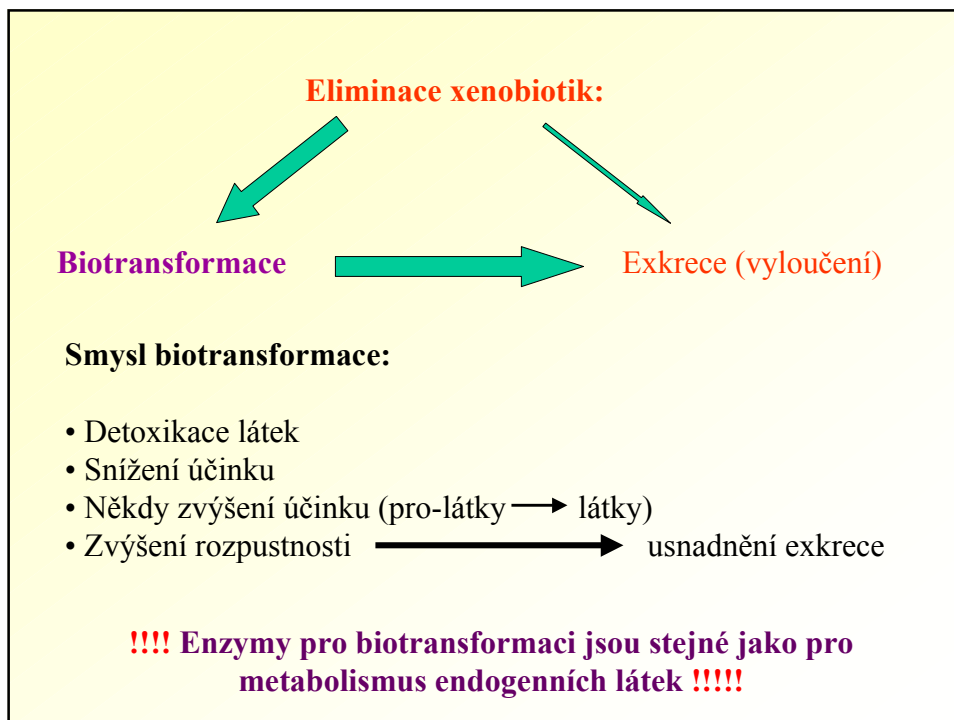


Acetaminofen byl netoxickým produktem, u něhož jsou zachovány analgeticko-antipyretické vlastnosti. V důsledku těchto nálezů byla tato látka zavedena do terapie, a u nás se užívá pod názvem paracetamol.

Malá množství acetaminofenu jsou konvertována na reaktivní metabolit N-Acetylbenzoquinoneimine



Bioaktivace acetaminofenu; za určitých okolností elektrofilní N-acetylbenzoquinone-imine reaguje s makromolekulami tkání a způsobuje nekrosu jater.



Místo biotransformace

Metabolická konverze xenobiotik je většinou **enzymatická**.

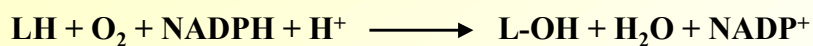
- Většina těchto reakcí probíhá v **játrech** (ale i v ledvinách, plicích, kůži a GIT).
- Metabolismus látek v buňkách probíhá většinou ve strukturách zvaných **endoplazmatické retikulum a cytozol**, ale jsou i další místa, jako mitochondrie, plazmatické membrány aj.
- Jako **mikrosomy** označujeme částice, které vznikají při degradaci endoplazmatického retikula; izolujeme je frakcionací.
- **Reakce Fáze I probíhají enzymovými systémy v mikrosomech.**
- **Konjugační reakce Fáze II většinou probíhají v cytozolu.**

Cytochrom P450 monooxygenázový systém (CYP)

- Hlavní enzymový systém účastníci se na reakcích Fáze I.
- Obsahuje **hem** jako redox-aktivní koenzym.
- Jméno odvozeno z nálezu, že redukovaná forma enzymu váže CO a v tomto komplexu vykazuje největší absorpci při 450 nm.
- Existuje **více než 100 izoform** Cytochrom P450 izozymů.
- Kromě degradace xenobiotik se tyto enzymy podílejí na mnoha metabolických procesech endogenních substancí.
- Nomenklatura izoform bude uvedena níže.
- Specifickým rysem tohoto systému je indukovatelnost aktivity.

Funkce Cyt P450 systému

Hlavní funkcí Cyt P450 je zabudovat atom kyslíku do substrátu lipofilní molekuly (L) a převést ho na polární sloučeninu (lépe rozpustná a schopná eliminace).



Nejdůležitější funkcí skupiny hemu je přeměna molekulárního kyslíku na velice reaktivní atomovou formu.

P450 reduktáza má za úkol dodat elektrony k aktivaci kyslíku (odebírání je z NADPH).

Box

Oxidace = odnětí e nebo H

Redukce = přidání e nebo H

Kyslík je univerzálním akceptorem e neboli oxiduje jinou látku.

Cyt P450 monooxygenázový systém

= přenos jednoho atomu kyslíku

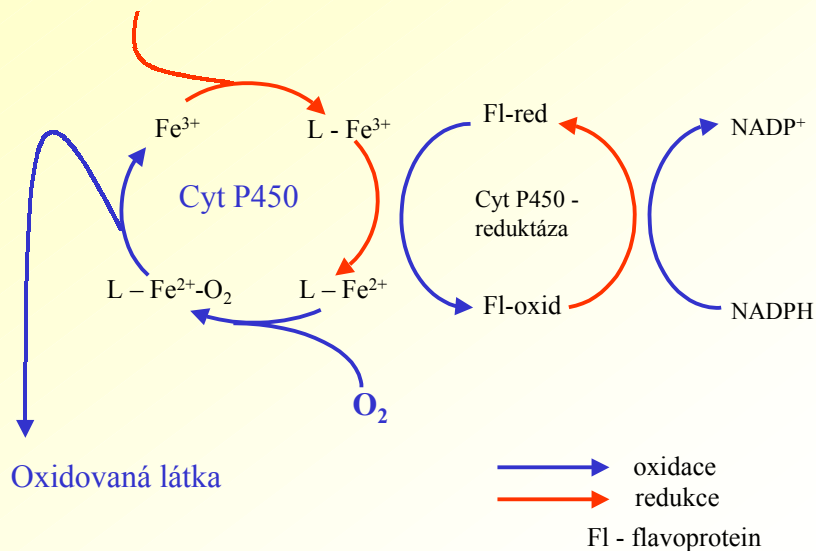
Oxidativní reakce katalyzované tímto systémem vyžadují:

- Cyt P450 hemoprotein
- NADPH-cyt P450 reduktázu
- NADPH
- Molekulární kyslík

Mnohastupňová reakce je schématicky znázorněna na následujícím obrázku.

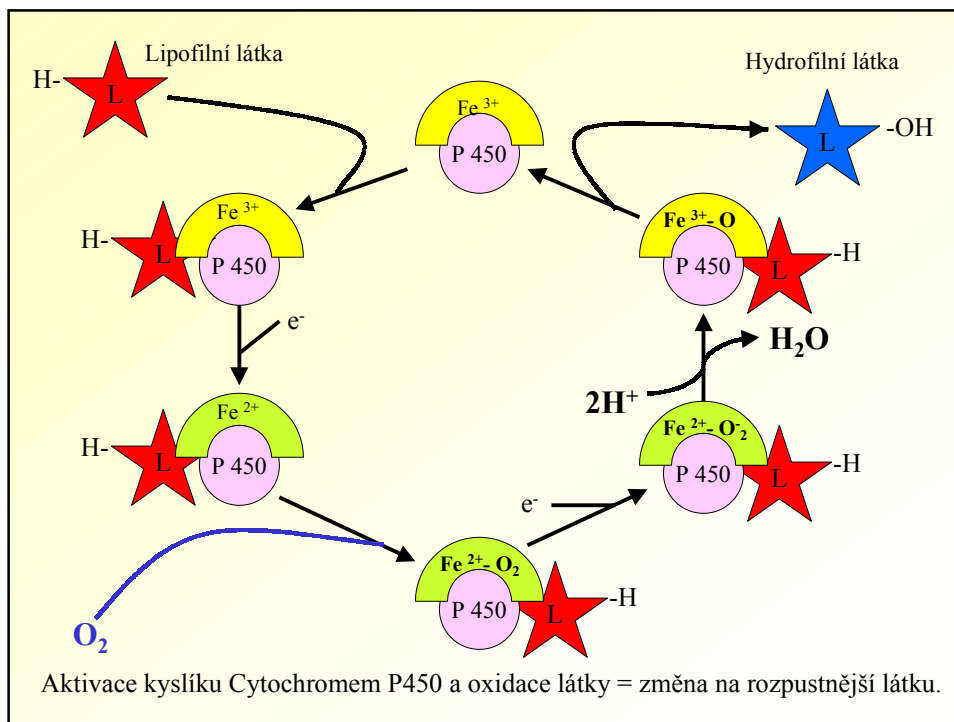
Mikrosomální monooxygenázový systém

Xenobiotický substrát (látka = L)



Reakční mechanismus

- V klidovém stavu je v hemu železo trojmocné – látka se naváže blízko hemu.
- Přenos elektronu z FADH_2 redukuje železo na dvojmocné, které je schopno vázat O_2 .
- Přenos druhého elektronu a změna valence železa redukuje navázaný O_2 na peroxid.
- Hydroxylový ion je rozložen v tomto intermediárním stavu. Příjem protonu dá vznik H_2O a reaktivní formě kyslíku. V tomto radikálu je železo formálně čtyřmocné.
- Aktivovaný kyslíkový atom vstupuje do C-H vazby substrátu a tím vytváří OH skupinu.
- Disociací produktu se enzym vrací do původního stavu.



Struktura cytochromu P450

Cyt P450 genová rodina se v průběhu evoluce tak modifikovala, že je schopna metabolizovat nejrozličnější xenobiotika.

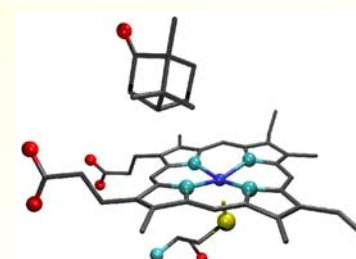
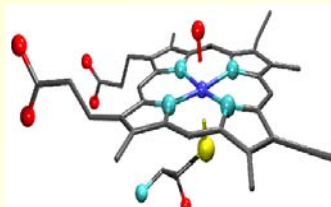
Cyt P450 enzymy obsahují hem; jsou vázány na membrány hladkého endoplazmatického retikula.

Funkční jednotku tvoří zhruba 10 molekul Cyt P450 (oxidáza) na 1 molekulu NADPH-Cyt P450 reduktázy. Flavoproteinová reduktáza obsahuje ekvimolární množství flavin mononukleotidu a flavin adenin dinukleotidu (zdroj jednoho nebo dvou elektronů nutných pro oxidační reakci).

Molekulární biologie odhalila na základě podobnosti sekvencí individuálních proteinů existenci 12 genových rodin cyt P450. Geny pro cyt P450 se označují jako *CYP 1 až 3*.

Struktura P 450: biochemická zbraň organismu

- “Složení zbraně”



Mechanismus reakce monooxygenázového systému P450

Xenobiotický substrát (látká = L) reaguje s oxidovaným Fe (Fe^{3+}) a vytváří komplex P450-L.

Cyt P450 reduktáza přijme elektron z NADPH a redukuje oxidovaný komplex P450-L

Redukovaný (Fe^{2+}) P450-L reaguje s molekulárním kyslíkem. Další elektron je poskytnut z NADPH a vytvoří se aktivovaný kyslíkový radikál.

V konečném stupni jeden atom kyslíku je uvolněn jako H_2O a druhý atom kyslíku je přenesen k substrátu.

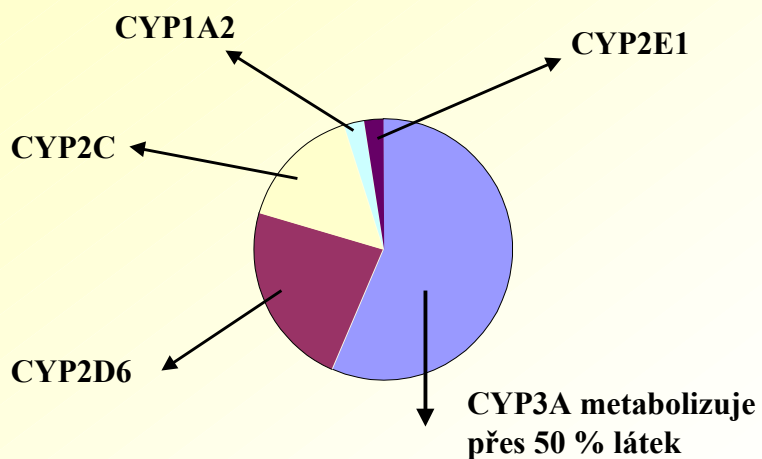
Mezi reakce zprostředkované oxidativní biotransformací monooxygenázou cyt P450 patří:

- N-dealkylace, O-dealkylace
- Alifatická a aromatická hydroxylace
- N- a S-oxidace. Deaminace
- Existuje i řada redukčních reakcí, které jsou katalyzovány cyt P450.

Klasifikace enzymů patřících mezi cyt P450

Existuje přes 1000 izoform cyt P450, u 50 z nich prokázána funkčnost u člověka.

Geny pro cyt P450 se dělí do několika **rodin** a **podrodin** podle podobnosti sekvence aminokyselin ve vytvářených enzymech; Označují se zkratkou **CYP**.



Proporce xenobiotik metabolizovaných hlavními cyt P450.

Přehled cyt P450 u člověka:

4 rodiny zodpovědné především za **metabolismus xenobiotik**
6 rodin **metabolizujících steroidy a žlučové kyseliny**

CYP3A4 se podílí na biotransformaci většiny látek – zajímavé je, že je exprimován i extrahepatálně.
Jeho exprese v GIT umožňuje rozložení farmak ve střevech, dříve než se dostanou do oběhu (snížení biologické dostupnosti).

Aktivace karcinogenů - Cyp1A1a2, Cyp 2A6, Cyp2B1 a Cyp2E1

Konjugace (Fáze II) probíhá většinou v cytoplasmě, ale nejdůležitější konjugační reakce glukuronidace probíhá působením mikrosomálních enzymů

Hydrolytické enzymy

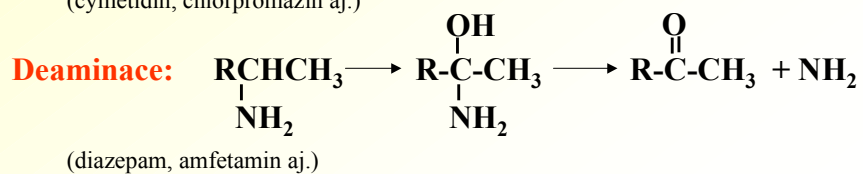
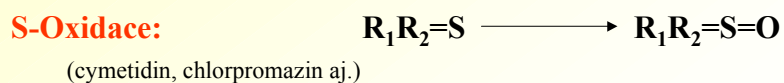
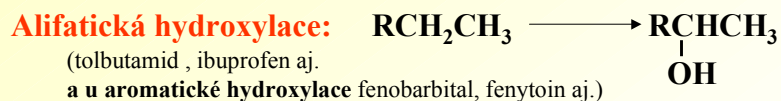
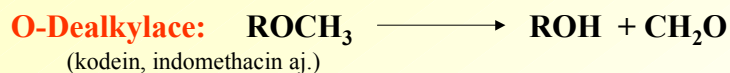
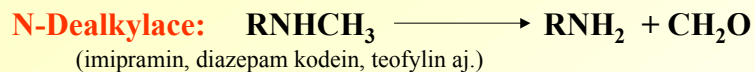
Bylo identifikováno mnoho **nespecifických esteráz a amidáz** v endoplazmatickém retikulu jater, střeva a dalších tkání.

Alkoholové a aminové skupiny vzniklé na xenobiotikách po působení hydrolytických enzymů jsou vhodnými substráty pro konjugační reakce.

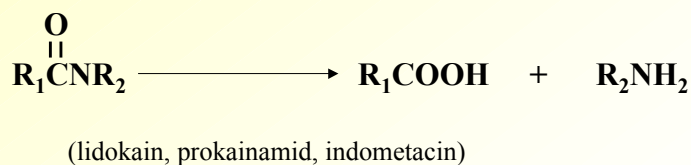
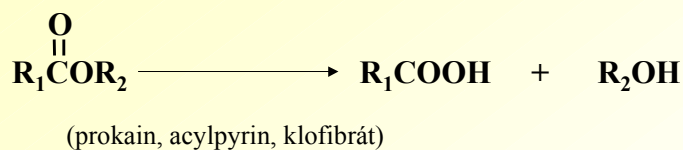
Na endoplazmatickém retikulu je v blízkosti cyt P450 umístěna epoxidhydroláza, která má detoxikační úlohu; hydrolyzuje reaktivní kyslíkové radikály vzniklé působením cyt P450.

Na endoplazmatickém retikulu je také enzym rozkládající ethanol, MEOS (mikrosomální ethanolová oxidáza).

Příklady oxidačních reakcí:



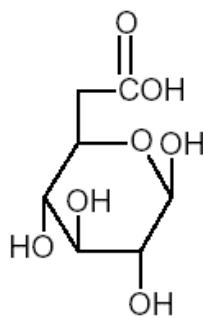
Příklady hydrolytických reakcí:



Konjugační reakce:

- Konjugační reakce (Fáze II biotransformace) vyžadují dodávku energie.
- Glukuronidace je nejdůležitější reakcí (co se týká kvantity) - působením mikrosomálních enzymů.
- Další konjugační reakce:
 - Konjugace s kys. sírovou (sulfatace)
 - Acetylace
 - Konjugace s glycinem
 - Konjugace s glutathionem
 - Methylace

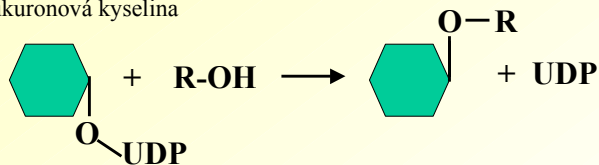
Kyselina glukuronová



Příklady konjugačních reakcí:

Glukuronidace:

UDP-glukuronová kyselina

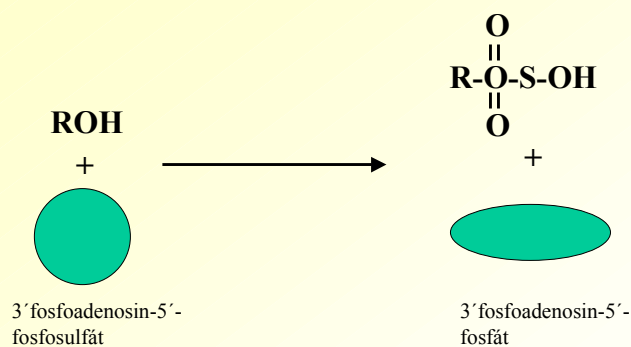


(paracetamol, morfin, diazepam)

Enzym: UDP-glukuronosyltransferáza

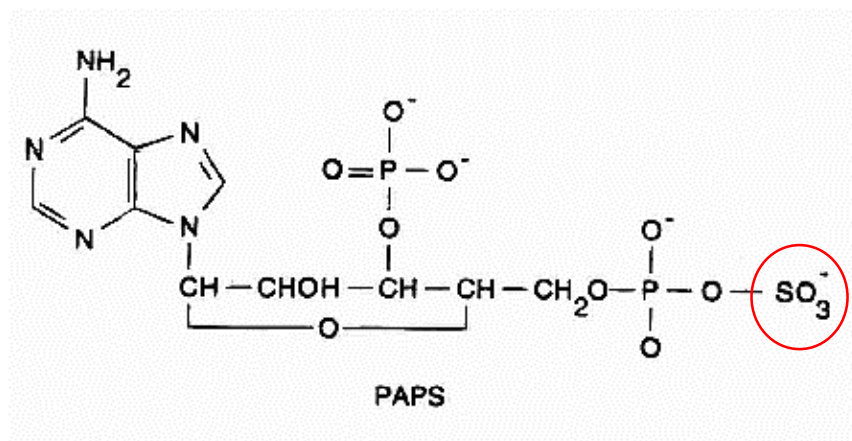
(játra, střevo, ledviny, mozek a kůže)

Sulfatace:

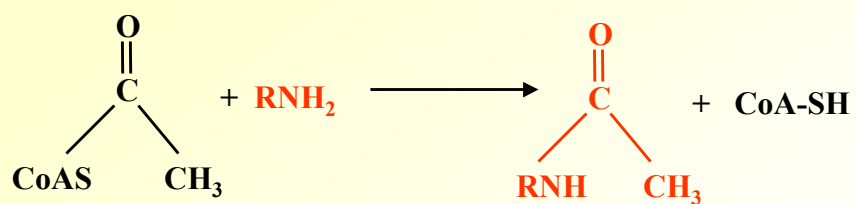


(Přenos sulfátu z donoru na OH skupiny fenolů i alifatických alkoholů, např. u paracetamolu, steroidů, methylidy.)

Fosfoadenosin fosfosulfát (PAPS)



Acetylace:



Acetyl-koenzym A

(sulfonamidy, isoniazid, dapson, klonazepan)

Acetylované látky (aminy) bývají méně rozpustné než mateřské látky.

Konjugace s glutathionem:

Konjugace elektrofilních metabolitů xenobiotik s tripeptidovým glutathionem představuje hlavní detoxikační cestu xenobiotik a karcinogenů.

Enzym: glutathion-S-transferáza (ve všech tkáních)

Další osud látek:

Konjugáty s glutathionem jsou rozloženy na cysteinové deriváty a poté jsou acetylovány v ledvinách; poskytují N-acetylcysteinové konjugáty.

Faktory ovlivňující biotransformaci xenobiotik:

- Polymorfismus oxidačních a konjugačních reakcí
- Environmentální faktory (inhibice grapefruitovou šťávou)
- Nemoci, stav organismu, léčiva

Indukce:

Indukce bývá specifická pro určitý typ CYP.

Zvýšená syntéza Cyt P450 → zvýšená biotransformace.

(U látek, kde metabolismus vede ke zvýšené tvorbě reaktivních radikálů dochází ke zvýšení toxicity látek.)

Hlavní induktory:

- barbituráty, warfarin, chlorpromazin, karbamazepin, glukokortikoidy (CYP3A4)
- isoniazid, chronický ethanol (CYP2E1)
- kouř tabáku
- polycyklické aromatické hydrokarbony (CYP1A)

Inhibitory biotransformace:

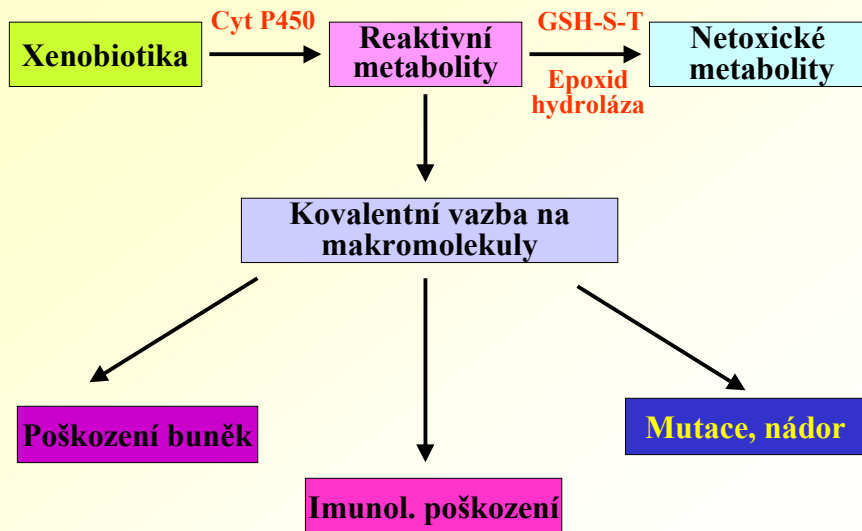
- Inhibice biotransformace zvyšuje mateřské látky a jejich účinek.
- Zvyšuje se také toxicita.
- Kompetitivní účinky několika látek mění účinek jedné látky.
- Cymetidin a ketokonazol inhibují oxidativní metabolismus tvorbou pevného komplexu s hemem v Cyt P450.
- Vazba některých látek může destruovat hem (např. syntetické steroidy).

Genetický polymorfismus:

- Rozdíly v biotransformaci xenobiotik jsou dány geneticky.
- Rozdíly mohou být tak výrazné, že došlo k dělení populace, např. na rychlé a pomalé acetylátory.
- U pomalu metabolizujících jedinců dochází k častějším nežádoucím reakcím.
- Odchyly v biotransformačních schopnostech lze testovat podáním vzorových látek a sledováním jejich biotransformace.
- Molekulárně-biologické metody jsou schopny odhalit stupeň exprese daného genu.

(Byla např. prokázána asociace mezi pomalou acetylací a výskytem karcinomu žlučníku, nebo rychlou acetylací a kolorektálním karcinomem.)

Biotransformace xenobiotik a možné poškození buněk

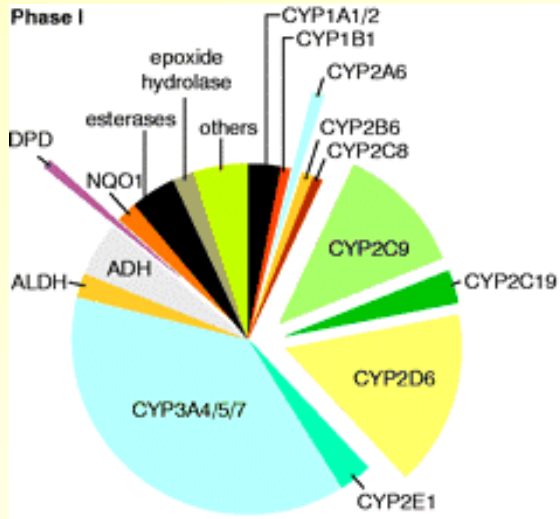


Souhrn

- Xenobiotika jsou látky tělu cizí, je jich přes 200000, a patří mezi ně přídavky do potravin, znečišťující látky, toxiny, farmaka aj.
- Jsou metabolizovány asi 30 enzymovými pochody, ale hlavní jsou dva systémy, které působí ve dvou fázích.
- Fáze 1 využívá monooxygenázovou hydroxylaci, která mění toxicitu a účinky xenobiotik. Jsou to mikrosomální enzymy označované jako cytochrom P450.
- Fáze 2 je konjugační, kdy připojení látky vyžaduje energii, a vzniklý produkt je hydrofilní, což usnadňuje jeho exkreci.
- Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují metabolismus xenobiotik; je to především polymorfismus, indukce a inhibice enzymů.

PHASE I ENZYMES

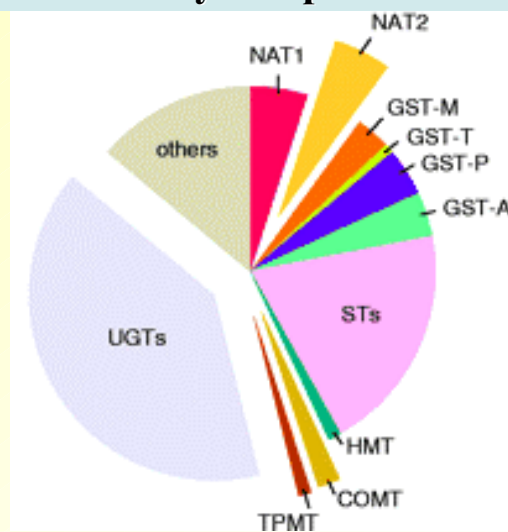
how many compounds do they metabolize?



From: Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286:487-491, 1999.

PHASE II ENZYMES

how many compounds do they metabolize?



From: Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286:487-491, 1999.

Acetaminophen Metabolism

