

Klinická biochemie II

Xenobiochemie



Xenobiotika

- Cizí látky
- Zneškodněna
 - Většina
- Aktivována
 - Kancerogenní
 - Mutagenní
 - Toxické



Eobiotika

- Tělu vlastní



Xenobiochemie

- Metabolické přeměny xenobiotik
- Farmakologie



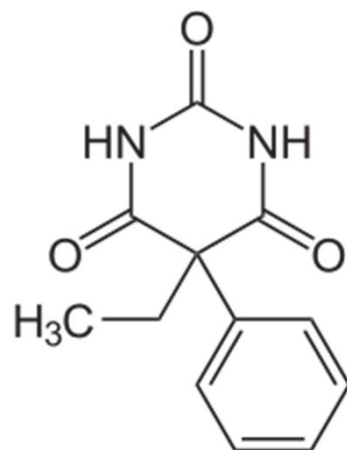
Enzymy metabolických přeměn xenobiotik

- Xenobiotika
 - Vyloučena nezměněna
 - Polární látky
 - Mění se spontánně
 - Málo
 - Biotransformace pomocí enzymů
 - Většina



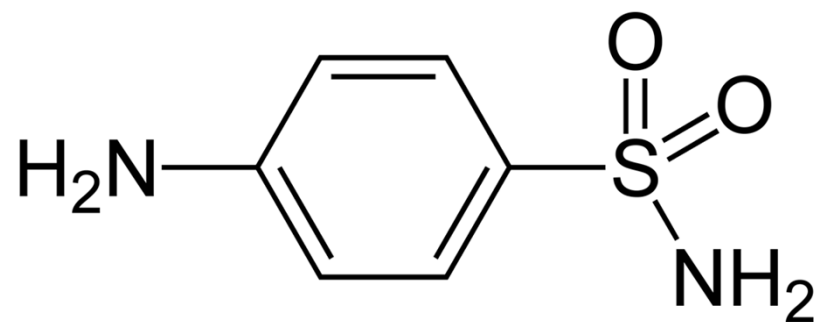
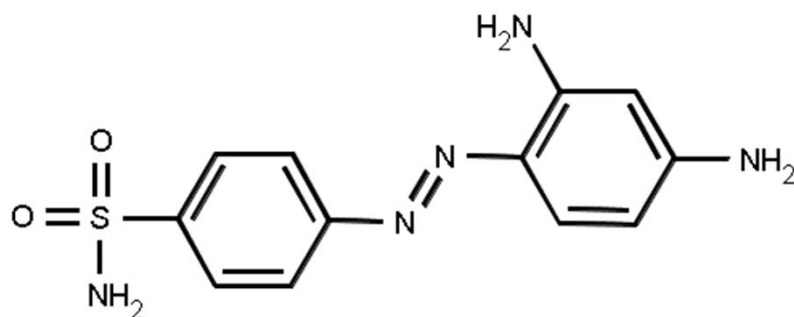
Biotransformace

- Deaktivace
 - Fenobarbital → 4-Hydroxyfenobarbital



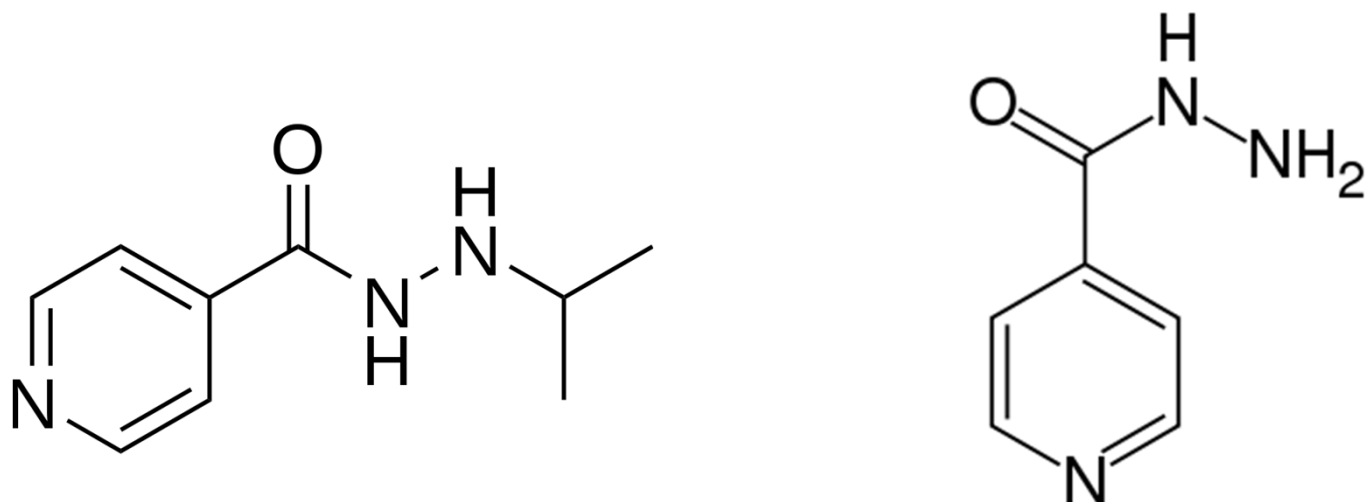
Biotransformace

- Aktivace
 - Prontosil → Sulfanilamid



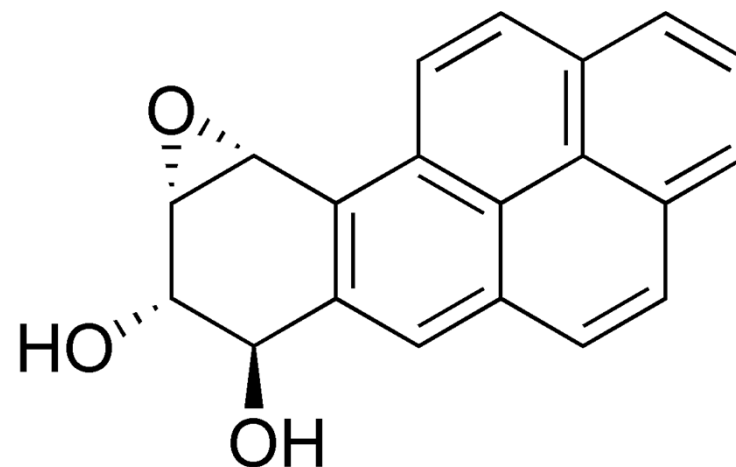
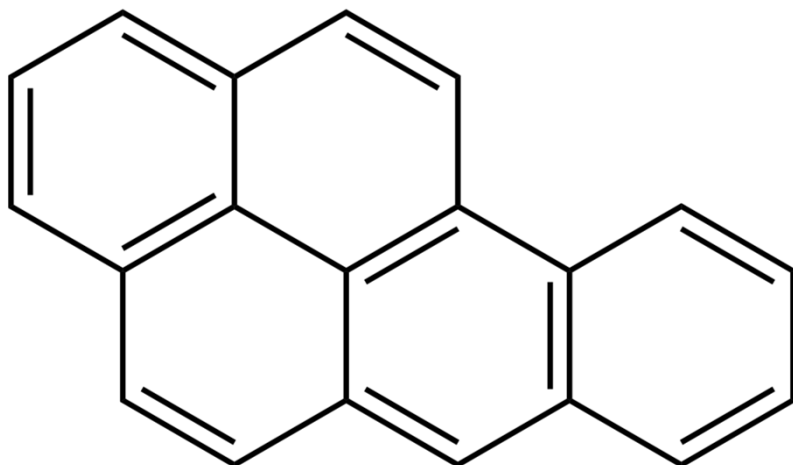
Biotransformace

- Změna účinku
 - Iproniazid → Isoniazid
 - Antidepresivum → antituberkulotikum

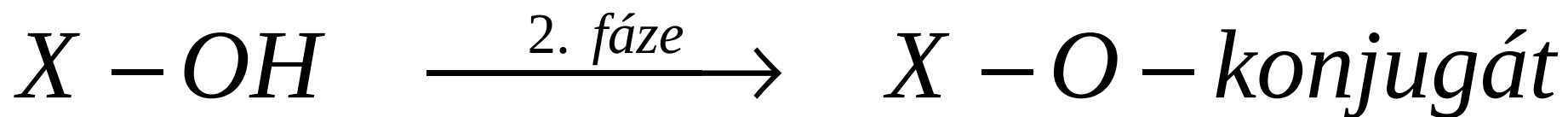
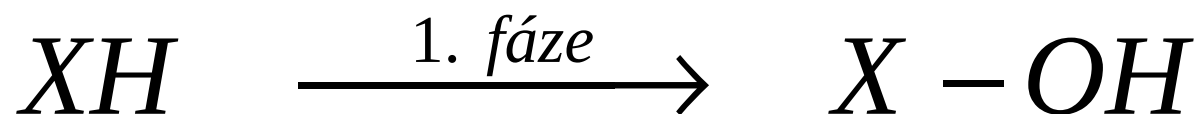


Biotransformace

- Toxikace
 - Benzpyren → Epoxid benzpyrenu



Biotransformace



Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- Hydrolytické enzymy
 - Substráty
 - Estery
 - Amidy
 - Hydroxamové kyseliny
 - Hydraziny
 - Karbamáty



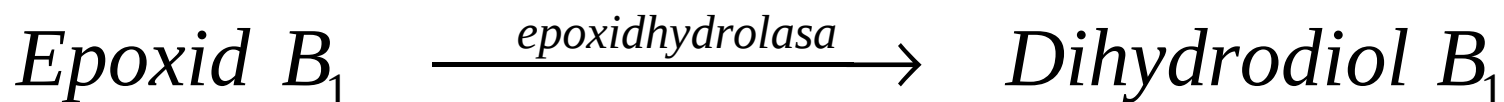
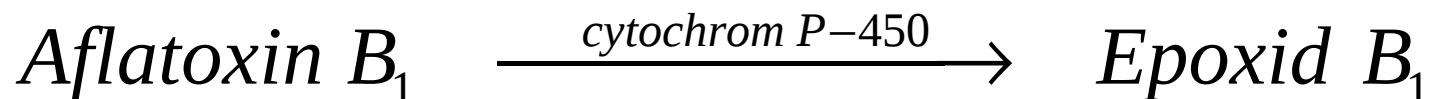
Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- Hydrolytická dehalogenace alifatických uhlovodíků
- Hydrolytické štěpení cyklických sloučenin



Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- Arylesterasy
- Karboxyesterasy
- Acetylesterasy
- Cholinesterasa
- Epoxidhydrolasa
 - Epoxid → Dihydrodioly



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



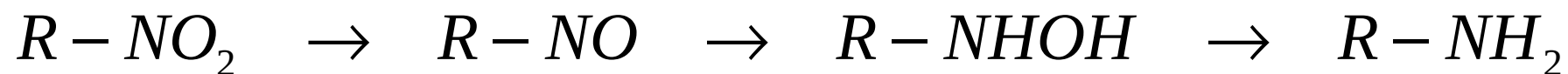
Univerzita
Pardubice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

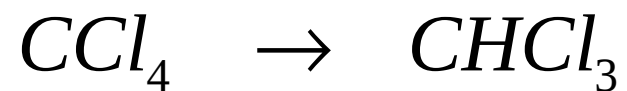
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- **Redukční enzymy**
 - Redukce
 - Karbonylových sloučenin
 - Dvojných vazeb
 - N-oxidů
 - Sulfoxidů
 - Disulfidů
 - Aromatických nitrosloučenin
 - Aromatických azosloučenin
 - Dehalogenace
 - Hydroxamových kyselin







Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- Koenzymy
 - NADPH
 - NADH
- Cytochromy P450
 - Anaerobní prostředí

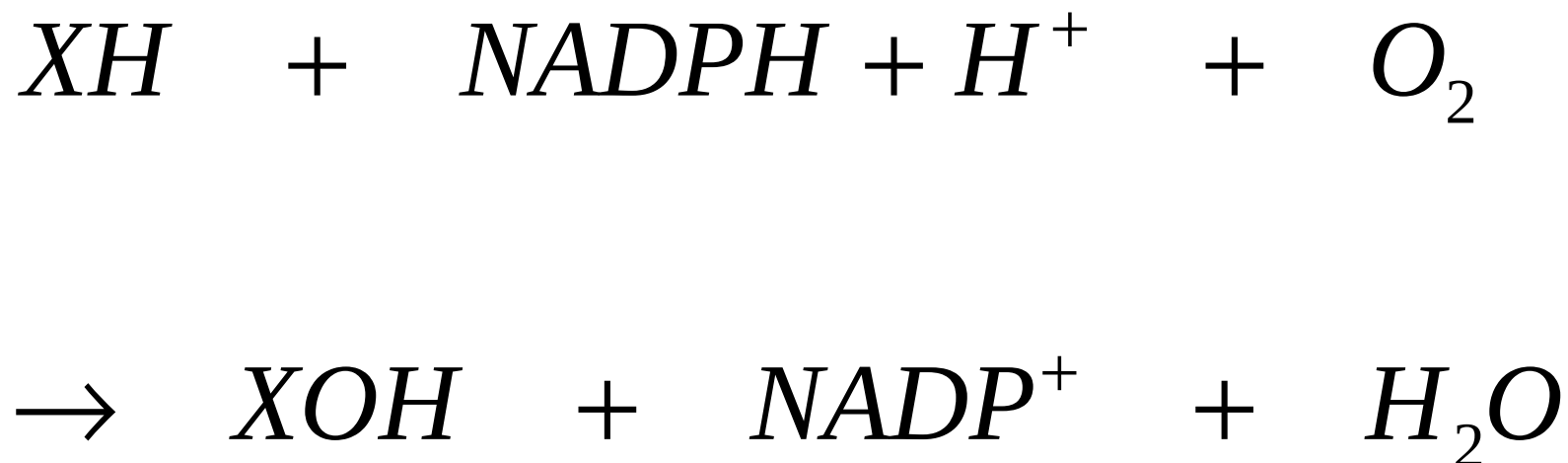


Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- **Oxidační enzymy**
 - Největší roli hrají mikrosomální monooxygenasy
 - Membránové enzymy lokalizované na hladkém ER

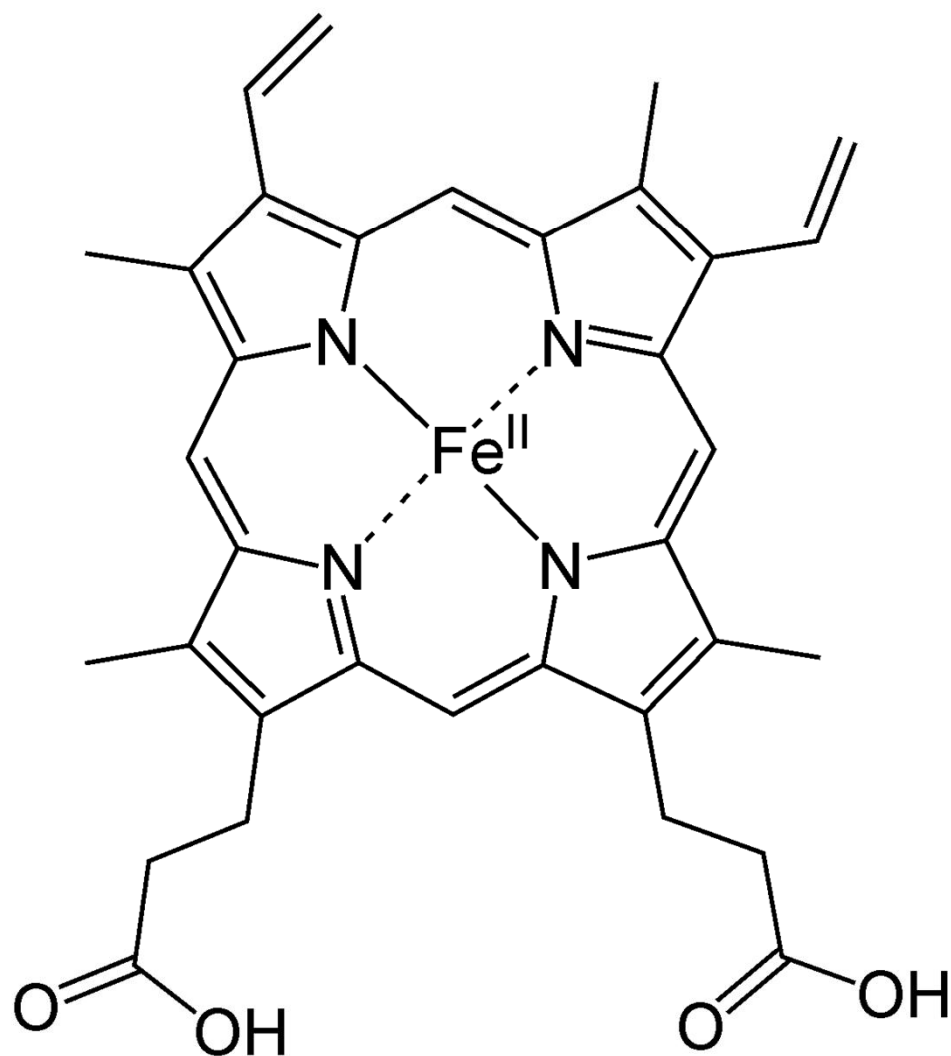
Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

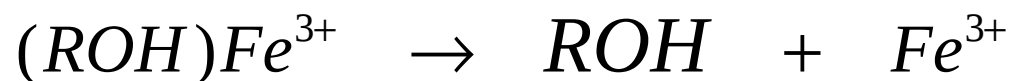
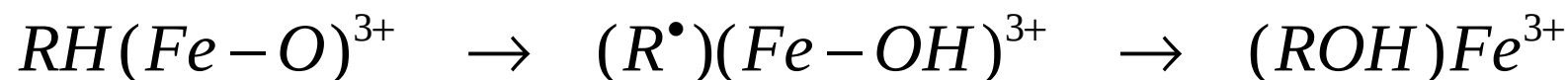
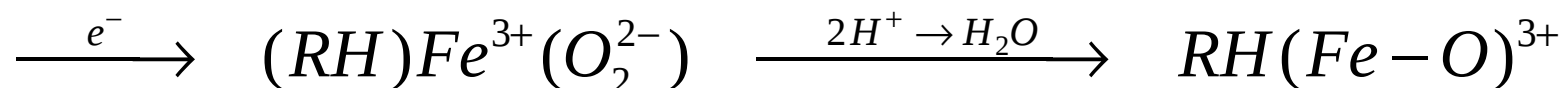
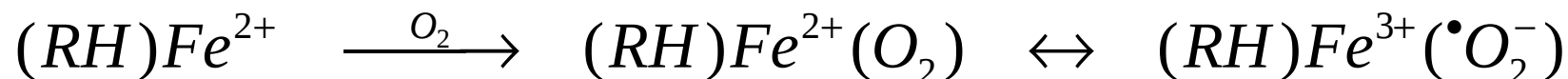
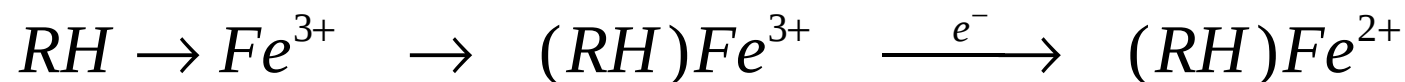
– Aktivita monooxygenas



Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- **Mikrosomální monooxygenasy závislé na cytochromech P450**
 - 1948: Klingenberg
 - Hemoprotein typu b
 - P: pigment
 - 450: maximum, kde absorbuje cytochrom po redukci a vazbě s CO
 - NADPH-cytochrom P450-reduktasa
 - Fosfatidylcholin





Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- Dvouelektronová oxidace
- Povaha reaktivního oxidantu zatím neobjasněna
- Prostetická skupina
 - Fe-protoporfyrin IX
 - 5. ligand: síra cysteinu
 - 6. ligand: navázaný kyslík

Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

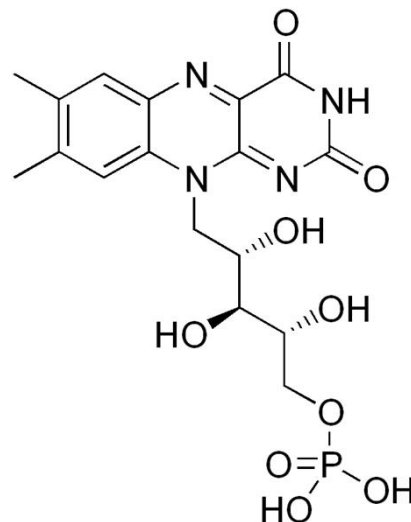
- Alifatická a alicyklická hydroxylace
- Aromatická hydroxylace
- O- a N- dealkylace
- Oxidace izolované dvojné vazby
- N-oxidace
- Sulfoxidace
- Deaminace
- Desulfurace

Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- Substrátová specifita a mnohotnost forem P450
 - Nadrodina enzymů
 - CYP 1A1
 - CYP:
 - » CYP1, CYP2, ... označení genů
 - » A-H . . . 8 podrodin enzymových proteinů
 - » CYP 1A1, CYP 1A2, ... individuální formy
- Sekvenční podobnost:
 - » Rodiny: obsahují enzymy s větší než 39% sekvenční podobnosti
 - » Podrodiny: větší než 59%

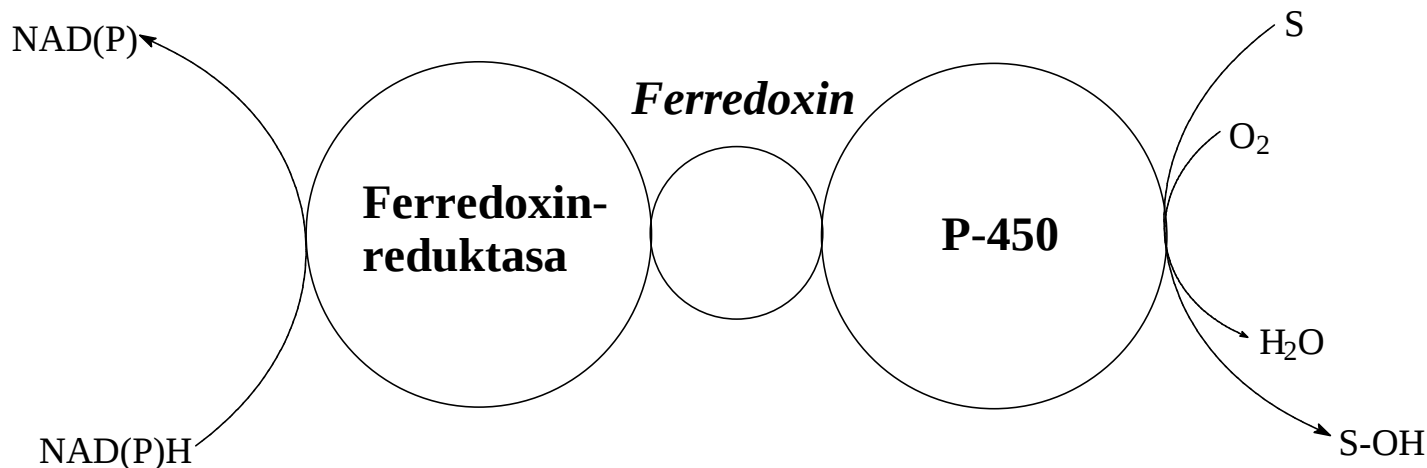
Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- NADPH-cytochrom-P450-reduktasa
 - Akceptor elektronů z NADPH
 - Přenos na komplex **Substrát-P-450(Fe³⁺)**
 - FAD
 - Akceptor elektronu z NADPH a donor pro FMN
 - FMN
 - Redukuje P450



Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- Mitochondriální monooxygenasy závislé na cytochromech P450
 - Metabolismus sterolů
 - Flavinová NADPH-dehydrogenasa (Ferredoxinreduktasa)



Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- Cytochromy P450 mikroorganismů
 - Rozpustné
 - Jejich izolace je tak snadnější

Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

– Flavinové mikrosomální monooxygenasy (FMO)

- 1964: Ziegler
- Afinita ke sloučeninám obsahující N, S, P
- Koenzymem je FAD
 - Redukován NADPH
- FADH reaguje s O_2
 - Nejdůležitějším meziproduktem je hydroperoxid flavinu (ten reaguje se substrátem)

» **K aktivaci O_2 dochází bez účasti substrátu !**



Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- **Flavinové mikrosomální monooxygenasy (FMO)**
 - Substrátová specifita a mnohotnost forem FMO
 - Substráty s nukleofilním centrem
 - » Mnoho xenobiotik také nukleofily
 - » Více než 1 náboj v molekule substrátu blokuje aktivitu FMO



Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- **Flavinové mikrosomální monooxygenasy (FMO)**
 - Oxidace primárních, sekundárních a terciárních aminů
 - Oxidace sulfidů a sulfoxidů
 - Oxidace thiolů, sulfenových kyselin, disulfidů
 - Oxidace thioamidů
 - Oxidace thiokarbamidů

Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- **Jiné oxidoredukční enzymy**
 - Alkoholdehydrogenasy
 - Alkohol → Aldehyd → Karboxylová kyselina
 - Koenzymem je NADH



Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- **Jiné oxidoredukční enzymy**
 - Aldehyddehydrogenasy
 - Aldehydy → Karboxylové kyseliny
 - Meziproduktem je thiopoloacetal

Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- **Jiné oxidoredukční enzymy**
 - Biotransformace formaldehydu
 - Není oxidován na kyselinu mravenčí !
 - Formaldehyddehydrogenasa
 - Katalyzuje tvorbu aduktu s GSH
 - » Ten oxidován na formylthioester

Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- **Jiné oxidoredukční enzymy**

- Monoaminoxidasy

- Biotransformace biogenních aminů, dalších alkyl- a arylaminů



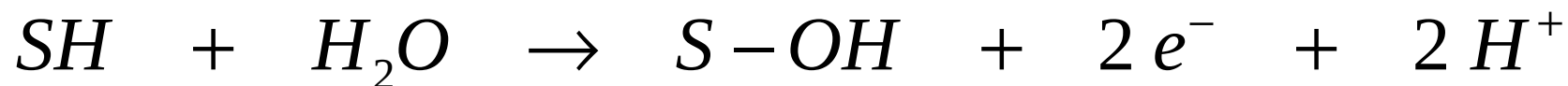
- Aldehydy mohou být dále oxidovány na odpovídající KK

Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- **Jiné oxidoredukční enzymy**

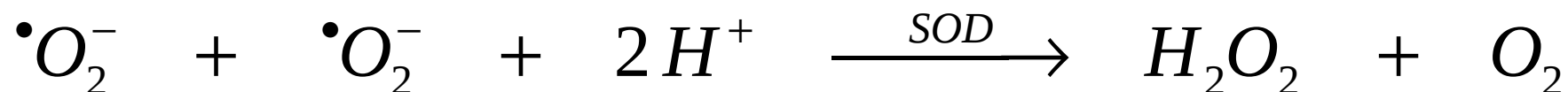
- Xanthinoxidasa, aldehydoxidasa

- Metaloflavoproteiny
- Substráty jsou nikotin, pyrimidiny, puriny, xanthiny, theofylin, kofein, ...



Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- Jiné oxidoredukční enzymy
 - Superoxiddismutasy



Enzymy 1. fáze metabolismu xenobiotik

- **Jiné oxidoredukční enzymy**
 - Glutathionperoxidasy

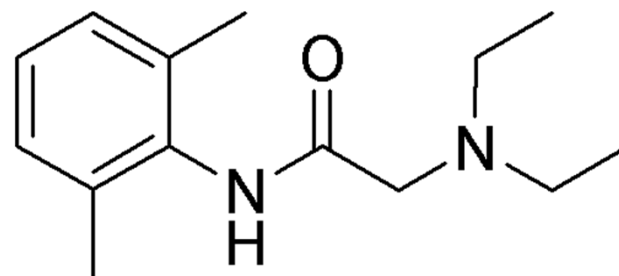
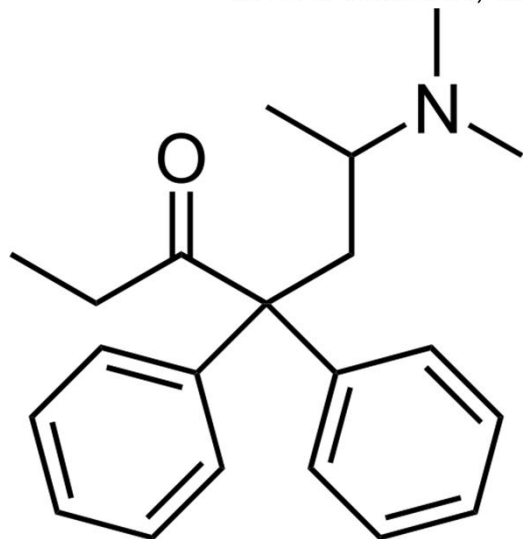


Jiné biotransformační přeměny

- **Cyklizace**

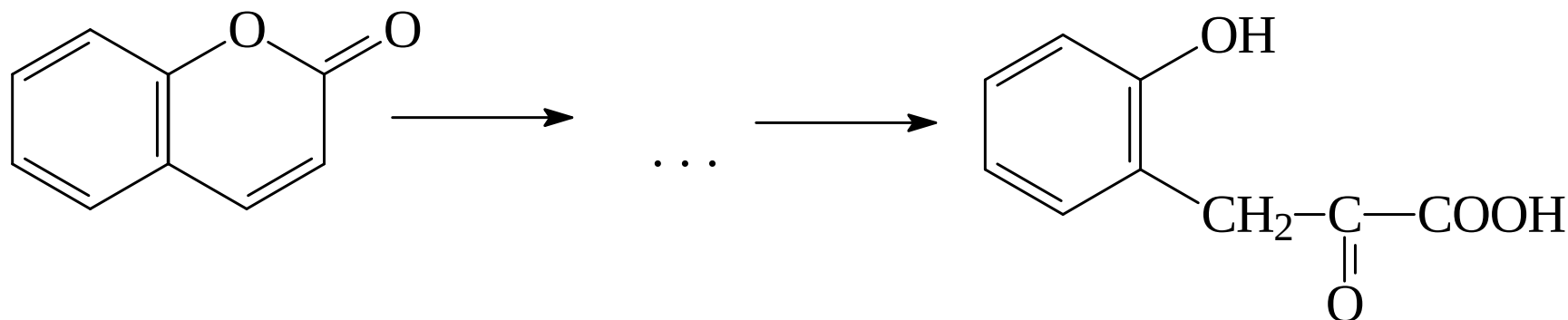
- Cyklizace nebo vytvoření nového jádra odštěpením molekuly vody

- Methadon, lidokain



Jiné biotransformační přeměny

- Štěpení jader a řetězců
 - Azobenzeny
 - Dithiokarbamáty
 - Sloučeniny obsahující v molekule organicky vázaný kov
 - Přeměna kumarinu



Enzymy 2. fáze metabolismu xenobiotik

- Reakce syntetické
- Konjugace s endogenními činidly
 - Produkty metabolismu buňky
 - Kyselina glukuronová
 - Aktivní sulfát
 - Aktivní Met
 - Aminokyseliny
 - Aktivace buď konjugačního činidla nebo substrátu



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Univerzita
Pardubice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Enzymy 2. fáze metabolismu xenobiotik

- **Konjugační reakce**
- **Glukuronidace**
 - Nejčastější konjugační reakce
 - Enzym:
 - UDP-glukosiduronáttransferasa
 - Membrána hladkého a drsného ER
 - Přenos kyseliny glukuronové z UDP-glukuronátu na nukleofilní akceptor
 - Hydroxyl, karboxyl, -SH, -NH₂

Enzymy 2. fáze metabolismu xenobiotik

- **Glukuronidace**
 - O-, N-, S- a C- glukuronidace
 - Mnohotnost forem
 - Různé isoenzymy

Enzymy 2. fáze metabolismu xenobiotik

- **Sulfátová konjugace**
 - Metabolizovány
 - Alkoholy, fenoly, hydroxylaminy, alicyklické steroidy, arylaminy
 - Konjugační činidlo:
 - 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS)
 - ATP + anorganický sulfát

Enzymy 2. fáze metabolismu xenobiotik

- **Sulfátová konjugace**
 - Sulfotransferasy
 - Arylsulfotransferasy
 - Fenoly, katecholaminy, organické hydroxylaminy
 - Hydroxysteroidsulfotransferasy
 - Hydroxysteroidy, primární a sekundární alkoholy
 - Estronsulfotransferasy

Enzymy 2. fáze metabolismu xenobiotik

- **N-, O-, S- Methylace**
 - N-, O- a S- Methyltransferasy
 - S-Adenosylmethionin
 - Koenzym
 - Metabolismus endogenních biogenních aminů
 - D, Histamin, A, NA
 - S-Methyltransferasy
 - Detoxikace thiopurinů, thiopyrimidinů, thiolů

Enzymy 2. fáze metabolismu xenobiotik

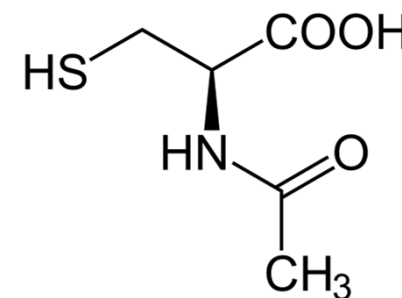
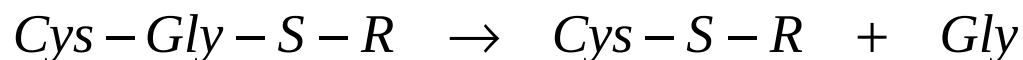
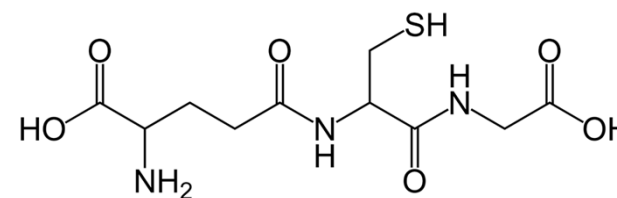
- **N-, O-, S- Methylace**
 - Fyziologické thioly nemethylovány
 - Silně disociovány

Enzymy 2. fáze metabolismu xenobiotik

- Konjugace s glutathionem**

- Silné nukleofilní činidlo
- GSH-S-transferasa
- Konjugáty dále transformovány γ -glutamyltranspeptidasy

→ kyselina merkapturonová



Enzymy 2. fáze metabolismu xenobiotik

- **Acetylace**
 - Acetylace –OH a –SH skupin výlučně u xenobiotik
 - Acetylace:
 - Cholinu na Ach
 - Co-A na Acetyl-CoA
 - Xenobiotické substráty: aminy
 - Arylaminy, alifatické aminy, hydraziny, sulfonamidy
 - Acetyltransferasa
 - Acetyl-CoA → aktivní konjugační činidlo
 - Dědičný polymorfismus při acetylaci arylaminů a hydrazinů → viz dále

Enzymy 2. fáze metabolismu xenobiotik

- **Acetylace**
 - Acetylace:
 - Přenos acetylu z Acetyl-CoA na enzym
 - Acetylace enzymu
 - Acetylace substrátu a regenerace enzymu

Enzymy 2. fáze metabolismu xenobiotik

- **Konjugace s AA nebo cukry**

- Substráty:

- Kyseliny rostlinného původu

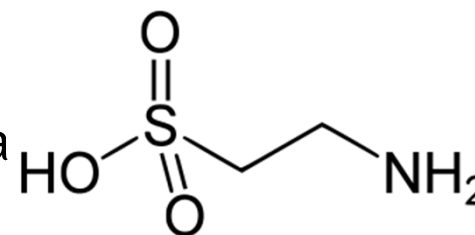
- Kyseliny s menší a střední Mr → konjugace s AA

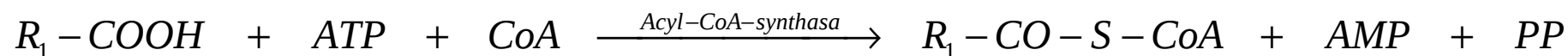
- Větší molekuly → glykosidy

- Žlučové kyseliny

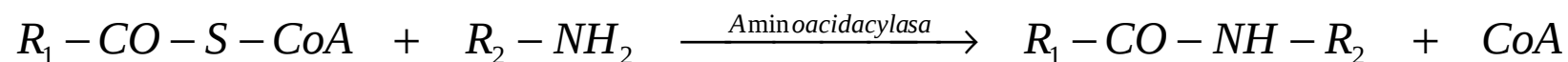
- Taurin, Gly

- Acyl-CoA-synthasa, aminoacidacylasa





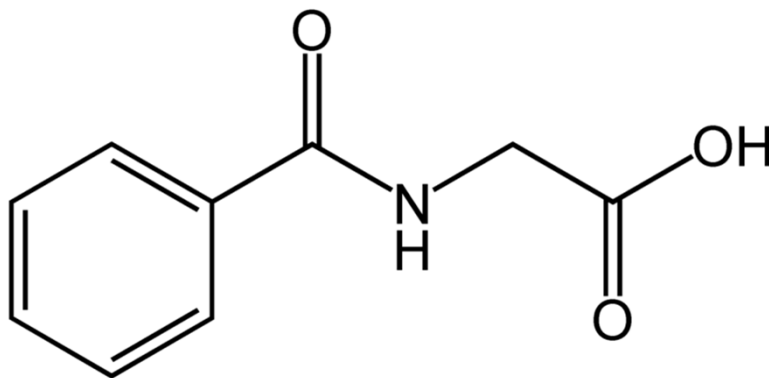
Reverzibilní reakce

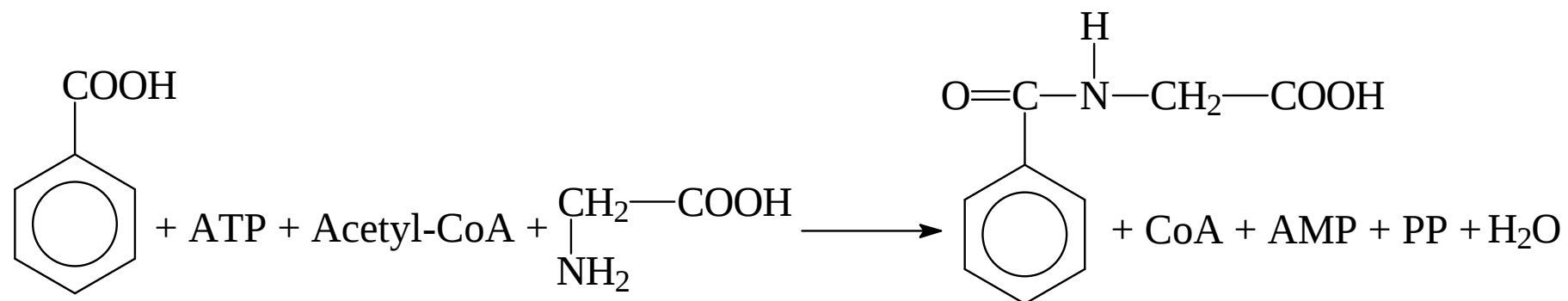


Ireverzibilní reakce

Enzymy 2. fáze metabolismu xenobiotik

- **Konjugace s AA nebo cukry**
 - Konjugace kyseliny benzoové s Gly → kyselina hippurová
 - Míra krevního průtoku ledvinami
 - Test na toluen





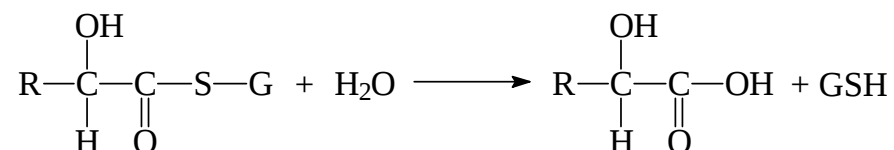
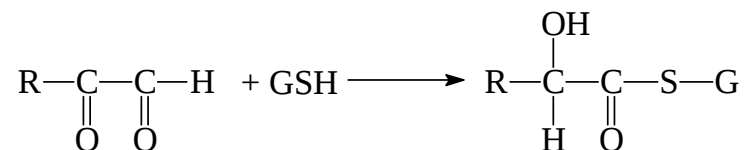
Enzymy 2. fáze metabolismu xenobiotik

- **Rhonadasa**
 - Katalyzuje přeměnu kyanidu na rhodanid



Enzymy 2. fáze metabolismu xenobiotik

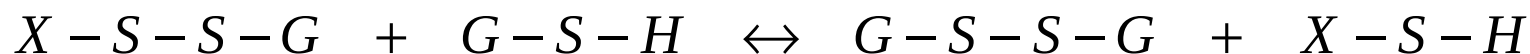
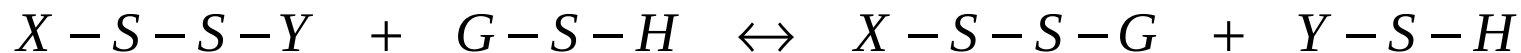
- Konjugační reakce, které nejsou tak rozšířeny
- Glyoxylasy
 - Glyoxylasa I, glyoxylasa II



- Účastní se proliferace buněk
 - Detoxikují 2-oxoaldehydy
 - » Ty inhibují buněčný růst

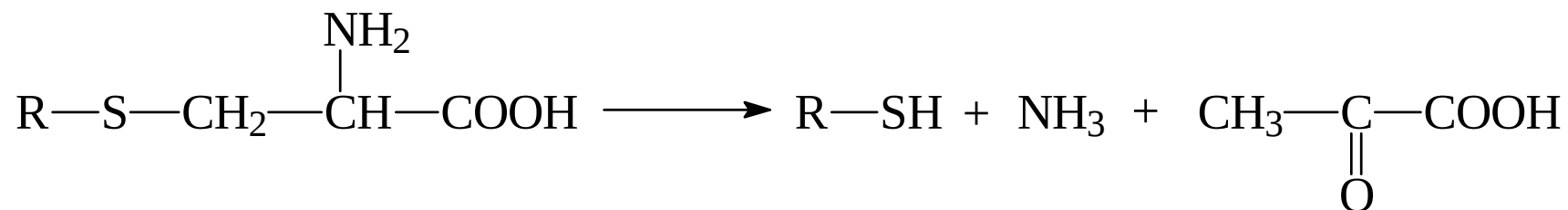
Enzymy 2. fáze metabolismu xenobiotik

- Konjugační reakce, které nejsou tak rozšířeny
- Thiotransferasy
 - Sloučeniny s -S-S- vazbami



Enzymy 2. fáze metabolismu xenobiotik

- Konjugační reakce, které nejsou tak rozšířeny
- β -Thiolasa
 - Štěpení vazeb –S-C- v molekule konjugátu s Cys
 - Kofaktor: pyridoxalfosfát



Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů

- **Mezidruhové rozdíly**

- Příklady:

- N-hydroxylace alifatických aminů je velmi nízká u potkanů
 - N-hydroxylace arylacetamidů je velmi nízká u morčat
 - N-acetylce arylaminů chybí u psů
 - Glukuronidace chybí u koček, lvů, rysů
 - Sulfátová konjugace chybí u prasat



Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů

- **Vnitrodruhové rozdíly, dieta**
 - Cukry
 - Glukosa *in vivo* → prodloužení hypnotických účinků barbiturátů
 - Proč ?
 - Lipidy
 - Fosfolipidy nezbytné pro aktivitu mikrosomálních monooxygenas
 - Proteiny
 - Snížený přísun proteinů → snížená aktivita oxidačních enzymů



Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů

- **Sex difference**

- Hladovění u samců → snížení aktivity biotransformačních enzymů
 - Testosteron ?
- Morfin, kodein: 2 až 3krát rychleji metabolizovány samci oproti samicím
 - Opět testosteron
 - K_M oxidačních enzymů samic je podstatně vyšší v porovnání s K_M samců
- Enzymy závislé na androgenech méně odolné nepříznivým podmínkám



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Univerzita
Pardubice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů

- **Věk**
 - Ve stáří snížené celkové množství cytochromu P450
 - Postupný úbytek hladkého ER
 - Zatím nenalezena závislost mezi věkem a snížené aktivity konjugčních enzymů



Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů

- **Genetické faktory**

- Individuální citlivost vůči některým xenobiotikům
- Vznik různých onemocnění vyvolaných farmaky
- Větší riziko vzniku nádorových onemocnění
 - 2 fenotypy
 - Extensive metabolizer (EM)
 - Poor metabolizer (PM)



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Univerzita
Pardubice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů

- **Genetické faktory**

- Podstatou je **mutace genu** odpovědného enzymu
 - Objasněno u 3 typů genetického polymorfismu
 - U cytochromu-P450 2D6
 - » Typ CYP 2D6 debrisochinového polymorfismu
 - U cytochromu-P450 2C8
 - » Typ CYP 2C8 mefenytoinového polymorfismu
 - U N-acetyltransferasy

Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů

- **Genetické faktory**

- Polymorfismus acetylace isoniazidu

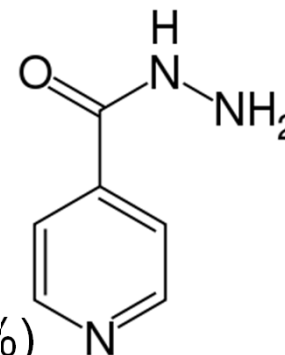
- PM:

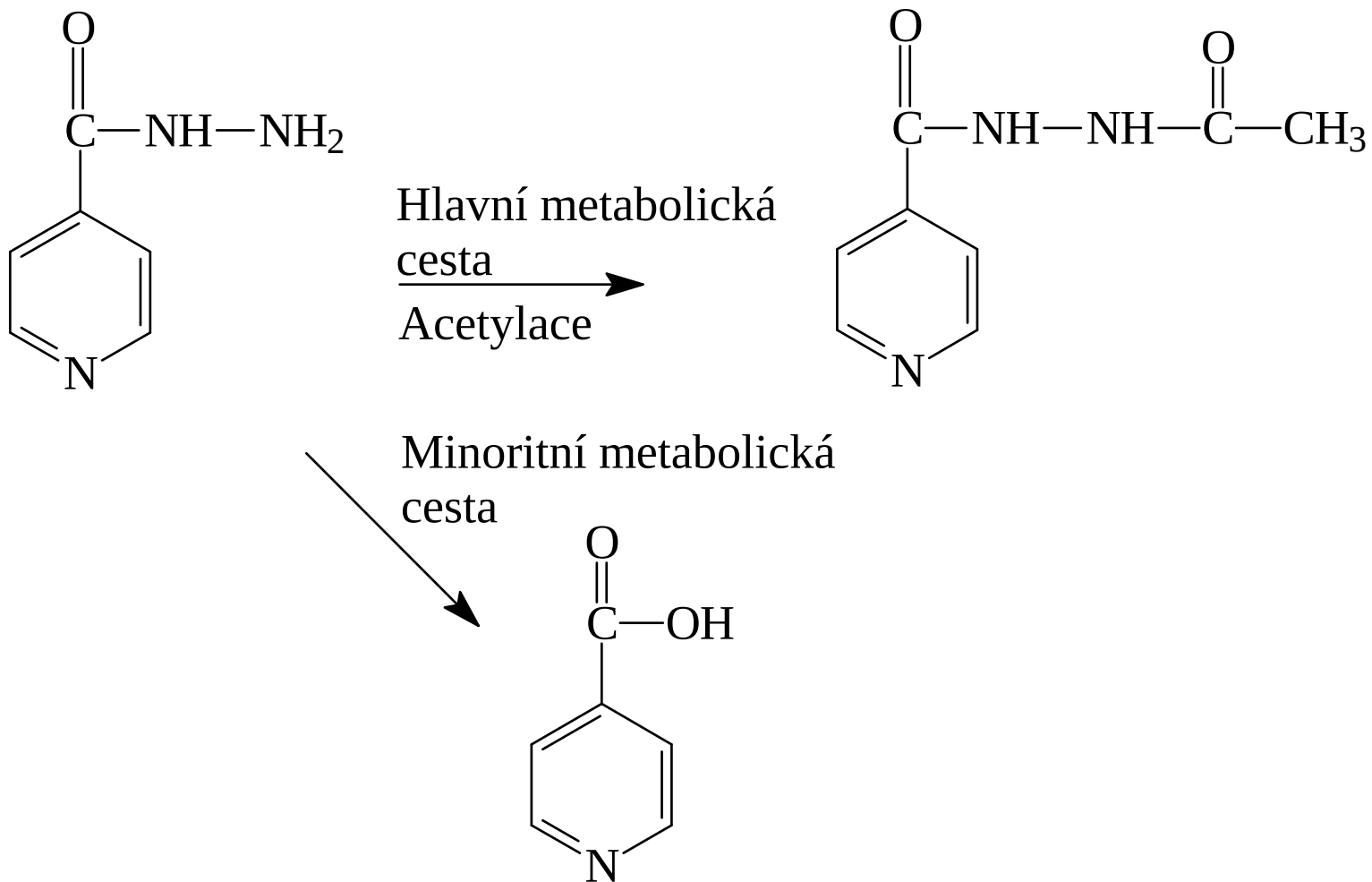
- Nejvíce arabská populace (90%)

- Nejnižší u Eskymáků a Japonců (5-10%)

- Přítomnost homozygotních alel (r/r)

- Hepatitidy, neurotoxické poruchy, karcinom močového měchýře

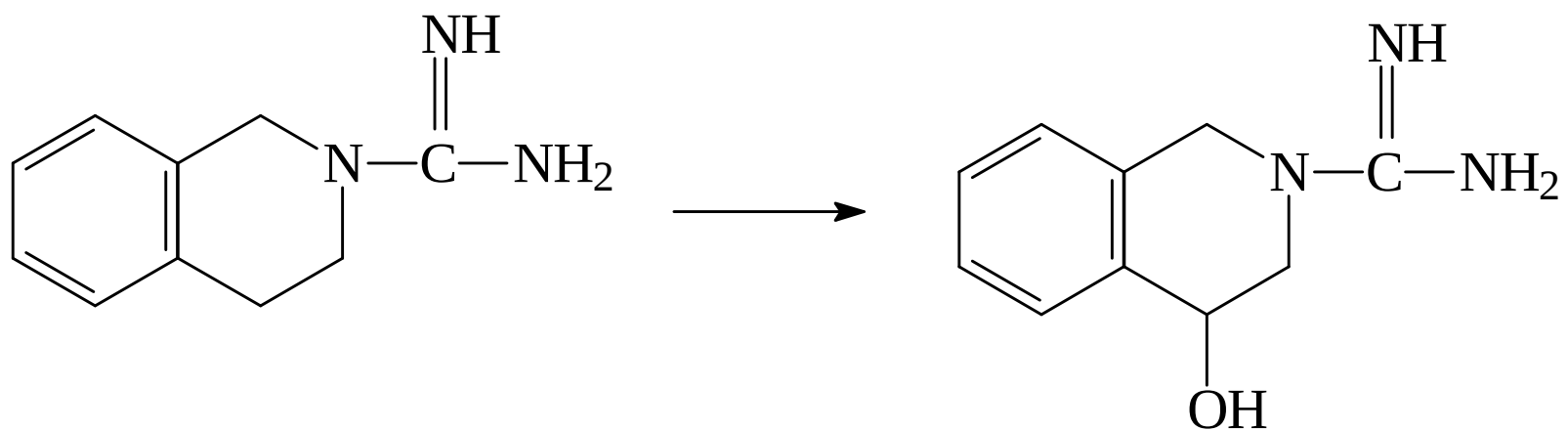




Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů

- **Genetické faktory**
 - Polymorfismus debrisočinu
 - Blokátor β -adrenergických receptorů
 - Léčba hypertenze
 - PM:
 - Závratě, hypotenze





Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů

- **Genetické faktory**
 - Polymorfismus AH (Ah) lokusu
 - Vztah k indukčnímu mechanismu xenobiotik

Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů

- **Genetické faktory**

- Indukce

- Vývoj a diferenciaci buněk
 - Regulace klíčových enzymů
 - Zásah do účinků hormonů
 - Ochrana před kumulací a toxicitou xenobiotik

- Enzymová indukce:

- Zvýšení syntézy m-RNA, po které následuje syntéza specifického enzymu



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Univerzita
Pardubice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů

- **Genetické faktory**

- Indukce

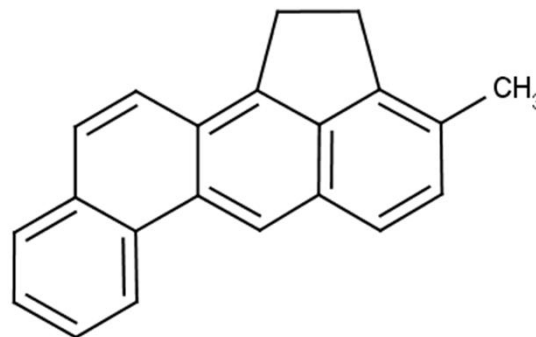
- Indukce probíhá v podmínkách *in vivo* po podání induktoru
 - Jednotlivé induktory zvyšují aktivitu určitých forem enzymů
 - Další změny nastávající po podání induktoru:
 - Zmnožení membrán hladkého ER
 - Zvětšení počtu i velikosti hepatocytů
 - Zvýšení obsahu r-RNA v ribosomech
 - Zvýšení stability ribosomů



Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů

- **Genetické faktory**

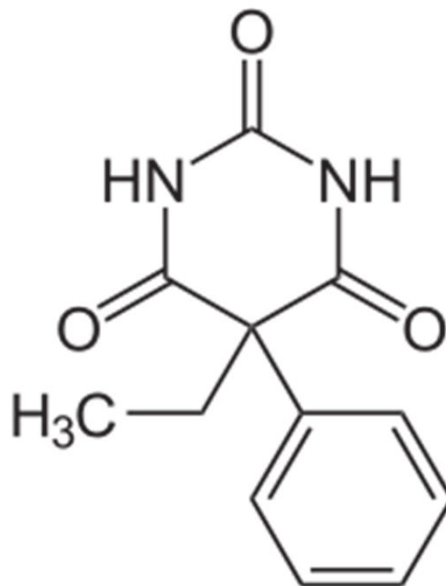
- Induktory typu methylcholanthrenu
 - Afinita k substrátům typu PAH
 - Odpovědný za syntézu izoformy P-450, jejichž působením vznikají reaktivní produkty
 - Toxicita
 - Kancerogenita
 - Mutagenita



Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů

- **Genetické faktory**

- Induktory typu fenobarbitalu
 - Syntéza isoform P450, které většinou detoxikují a deaktivují



Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů

- **Genetické faktory**
 - Mechanismus indukce PAH
 - Prochází buněčnou membránou
 - V cytosolu vazba na Ah receptor → jádro → syntéza příslušného enzymu
 - Mechanismus indukce fenobarbitalem
 - Indukce ne tak výrazná jako u PAH
 - Nedokázána receptorová BK



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Univerzita
Pardubice

Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů

- **Genetické faktory**
 - Induktor musí splňovat:
 - Velká lipofilita
 - Schopnost akumulace
 - Málo se metabolizuje



Biotransformační enzymy placenty a plodu

- Kontergan
- Lipofilní xenobiotika
 - Přeměna na polárnější látky a hromadění ve tkáních plodu
- Enzymy placenty
 - Benzpyrenhydroxylasa
 - Kuřáčky
- Enzymy plodu
 - 8. týden těhotenství: mikrosomální monooxygenasy
 - Konjugace UDP-glukuronovou kyselinou nízká

