

ENZYMY METABOLIZUJĄCE KSENOBIOTYKI – I i II FAZA

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Procesy metabolizmu ksenobiotyków (biotransformacji) przebiegają w trzech etapach. Jedną z głównych funkcji tych procesów jest tworzenie bardziej polarnych i dzięki temu łatwiej rozpuszczalnych w wodzie pochodnych, które szybciej mogą ulec wydaleniu z organizmu. Procesy pierwszej fazy są to głównie przemiany oksydacyjne, mające na celu wprowadzenie lub odsłonięcie grupy polarnej – głównie hydroksylowej. W fazie drugiej, zwaną również fazą biosyntezy lub sprzęgania - następuje dołączenie do metabolitu pierwotnego zaktywowanej metabolicznie cząsteczki związku endogennego (np. kwasu glukuronowego lub aminokwasu), dzięki czemu powstaje łatwo rozpuszczalny w wodzie koniugat. Teraz z kolei pojawia się problem usunięcia takiej wysoce hydrofilowej cząsteczki z komórki, ze względu na barierę, jaką stanowi lipofilna błona komórkowa. W związku z tym istnieje szereg transporterów błonowych, które w sposób aktywny, z nakładem energii usuwają ostateczne metabolity poza komórkę, skąd mogą już swobodnie docierać do krwiobiegu i zostać wydalone z moczem, żółcią lub wydychanym powietrzem. Jest to tzw. trzecia faza.

Istnieje wiele czynników wpływających na aktywność procesów detoksykacyjnych takich jak różnice międzygatunkowe, wiek, płeć, skład diety, ciąża, choroby, czy środowisko a szczególnie ekspozycja na działanie czynników szkodliwych wynikająca z miejsca zamieszkania czy wykonywanej pracy.

Do najważniejszych enzymów katalizujących reakcje pierwszej fazy metabolizmu należą cytochromy CYP450. Enzymy te stanowią superrodzinę monooksygenaz (EC 1 – Oksydoreduktazy). CYP450 występują w gładkim retikulum endoplazmatycznym komórki; niewielkie ilości znajdują się też w mitochondriach i jadrze komórkowym. Charakteryzują się specyficznością substratową i tkankową, co wiąże się z występowaniem licznych izoform poszczególnych enzymów (a więc enzymu katalizującego tę samą reakcję, ale w innej tkance lub przy udziale innego substratu). Poszczególne izoformy CYP450 oznacza się kolejno cyframi arabskimi, wskazującymi na rodzinę, do której przynależą, następnie wielką literą, oznaczającą podrodzinę i kolejną cyfrą, określającą poszczególnych członków podrodziny. Np. CYP2E1 oznacza izoformę 1 z podrodziny E, z drugiej rodziny. U człowieka występują przedstawiciele 18 rodzin CYP450. Większość izoform występuje w wątrobie (np. CYP1A1,

CYP1A2, CYP1B1), nerkach, płucach, jelicie cienkim (np. CYP3A4), łożysku (np. CYP3A7), naskórku, jądrach, nadnerczu (np. CYP11B2), jajnikach (np. CYP19), nabłonku gruczołu piersiowego, tkance mózgowej (np. CYP7B), w limfocytach i leukocytach krwiobwodowej (np. CYP3A5). Niektóre występują w tkankach całego organizmu w równym stopniu (np. CYP51). CYP450 katalizują przede wszystkim reakcje hydroksylacji, epoksydacji, dealkilacji, oksydacyjnej deaminacji i aromatyzacji. Są one zdolne do utleniania ogromnej liczby związków chemicznych o bardzo zróżnicowanej budowie, zarówno endo i egzogennych, biorąc udział w ich metabolizmie. Podstawowa funkcja cytochromów to detoksykacja licznych ksenobiotyków, w tym również wielu leków (CYP1, CYP2, CYP3) oraz hydroksylacja hormonów steroidowych (CYP7, CYP11, CYP17, CYP19, CYP21, CYP24, CYP27), kwasów tłuszczowych i eikozanoidów (CYP4, CYP5, CYP8).

Drugą ważną funkcją cytochromów jest ich udział w procesach anabolicznych. Oprócz syntezy hormonów steroidowych jak estrogeny (CYP19) czy androgeny (CYP17), enzymy te odpowiadają także za syntezę tzw. neurosteroidów, związków biorących udział w regulacji procesów poznawczych i pamięciowych (np. CYP7B, CYP17, CYP11B1). Ponadto cytochromy P450 biorą udział w aktywacji metabolicznej ksenobiotyków, czego skutkiem może być powstawanie związków toksycznych lub mutagennych.

CYP2E1 stanowi zaledwie 7% aktywności wątrobowej CYP450. Specjalizuje się w metabolizmie niewielkich cząsteczek heterocyklicznych, jak np. pirydyna, czy inne aminy aromatyczne (m.in. paracetamol), a także alkoholi (etanol), ketonów (aceton) oraz fluorowcopochodnych węglowodorów, spośród których rekrutuje się wiele leków używanych w anestezjologii. Silnymi induktorami tej izoforny jest właśnie etanol i aceton, a mechanizm indukcji jest dość osobliwy, bo polegający na stabilizacji białka enzymatycznego. Utleniając niektóre związki do pochodnych chinonowych, cytochrom ten również przyczynia się do aktywacji metabolicznej i wzrostu toksyczności niektórych leków – w tym popularnego leku przeciwbólowego i przeciwgorączkowego, jakim jest paracetamol. Paracetamol, a właściwie jego metabolit – *N*-acetylo-4-benzochinoimina (NAPQI), może działać hepatotoksycznie. NAPQI jest silnym utleniaczem, reaguje z grupami tiolowymi białek (określa się to tworzeniem adduktów z białkami), w wyniku czego stają się one obiektem działania układu immunologicznego. W przypadku ciężkiego zatrucia paracetamolem mamy do czynienia z wysyceniem szlaków metabolicznych (sprzęgania z GSH, sulfatacji i glukuronidacji) i wzmożonego metabolizowania paracetamolu na drodze utleniania i powstawania NAPQI. Benzochinoimina może ulegać detoksykacji poprzez nieenzymatyczną reakcję z grupami

sulfhydrylowymi glutationu, bądź z innymi związkami zawierającymi grupę tiolową, jak metionina lub N-acetylocysteina, która jest podawana przy zatruciach paracetamolem. Całkowite zniszczenie komórek wątroby nieuchronnie prowadzi do śmierci (dawka śmiertelna paracetamolu wynosi 15-20 gramów). Badania z wykorzystaniem zwierząt zmodyfikowanych genetycznie wykazały, że wyłączenie funkcji genu CYP2E1 a także CYP1A2 wpływa na podwyższenie dawki śmiertelnej paracetamolu, co dowodzi o istotnej roli tych izoenzymów w metabolicznej intoksykacji tego leku.

Jak wspomniano już powyżej w drugiej fazie biotransformacji, zmodyfikowane podczas reakcji utleniania, redukcji lub hydrolizy ksenobiotyki, w tym chemiczne kancerogeny, a także endogenne związki niepolarne/hydrofobowe np. bilirubina ulegają biotransformacji do form bardziej polarnych umożliwiając ich wydalenie. Reakcje sprzęgania zachodzące w II fazie biotransformacji katalizują głównie enzymy klasy transferaz, a metabolitami, które biorą udział w tych reakcjach są aminokwasy, glutation, oraz aktywowane kwasy tj: octowy, siarkowy i przede wszystkim glukuronowy. Produkty sprzęgania są zazwyczaj kwasami organicznymi, które w warunkach fizjologicznych występują w formie zjonizowanej i łatwo ulegają wydaleniu z moczem lub żółcią.

Transferazy urydynodifosfoglukuronianowe (UDPGT) [E.C.2.4.1.17] są jednym z głównych detoksykacyjnych systemów odpowiedzialnych za usuwanie z ustroju utworzonych w reakcjach I fazy biotransformacji rozmaitych reaktywnych metabolitów endogennych substratów takich jak: bilirubina, kwasy żółciowe, steroidy, tyroksyna, aminy biogenne, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach. Ponadto, funkcją tych enzymów jest łączenie kwasu glukuronowego z różnymi egzogennymi związkami chemicznymi takimi jak: hydroksylowane policykliczne węglowodory aromatyczne (PWA), heterocykliczne aminy, metabolity związków pochodzenia roślinnego i wielu leków. W reakcji glukuronidacji, C₁ kwasu glukuronowego łączy się z różnego rodzaju aglikonami tworząc kwasy β-D-glukopiranozydouronowe (glukuronidy). Zwykle w reakcji uczestniczą cztery typy aglikonów: hydroksylowy (fenolowy lub alkoholowy), karboksylowy, sulfhydrylowy i aminowy. UDPGT są grupą izoenzymów o masie cząsteczkowej 50-60 kDa, zlokalizowanych głównie w siateczce endoplazmatycznej. Mimo, że wątroba jest najważniejszym miejscem glukuronidacji w organizmie człowieka, niektóre pozawątrobowe tkanki mają również zdolność wiązania związków z kwasem glukuronowym. Znalaziono, bowiem aktywność UDPGT w nerkach, płucach, przewodzie pokarmowym i w mniejszych ilościach w skórze,

śledzienie, mózgu, sercu i tarczycy. Geny UDPGT zostały nazwane w podobny sposób do genów cytochromu P450.

U ssaków opisano 47 różnych form UDPGT. Co najmniej 20 z nich zostało zidentyfikowane i sklasyfikowane do dwóch podrodzin w oparciu o identyczność sekwencji. Podrodzina białek UDPGT1 posiada identyczną C-końcową sekwencję kodującą, podczas gdy 246 N-końcowych aminokwasów było podobne tylko w 38%. Izoenzymy z rodziny UDPGT1 katalizują reakcje glukuronidacji bilirubiny, fenoli, amin i kwasów karboksylowych. Genetyczne defekty zaobserwowane w genie UDPGT1 związane są, z hiperbilirubinemią. Podrodzina UDPGT2 została podzielona na UDPGT2A, która zawiera przynajmniej jeden wężowo specyficzny gen i UDPGT2B, która zawiera geny indukowane przez fenobarbital jak również liczne geny, które są produkowane konstytutywnie i biorą udział, w glukuronidacji endogennych sterydów i amin biogennych. Jak dotychczas rodzina UDPGT8 zawiera jeden gen kodujący enzym, który sprzęga galaktozę z ceramidem. Pozostałe 63 UDPGT nie występuje u ssaków i obejmują UDPGT1B1 z płastugi (ryba), UDPGT9, UDPGT10 i UDPGT13-UDPGT26 z *C. elegans*, UDPGT31 i UDPGT32 z wirusów i owadów, UDPGT71-UDPGT79 z drożdży, UDPGT101-102 z bakterii.

Wiadomo, że istnieją różnice zależne od płci w szybkości reakcji glukuronidacji. Doniesiono, że reakcje glukuronidacji u zwierząt są szybsze u samców niż u samic z powodu zwiększonej aktywności UDPGT.

2. CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

2.1. Ocena indukcji CYP2E1 w wątrobie szczura przez etanol

Cel

Celem ćwiczenia jest zbadanie wpływu pojenia etanolem szczurów rasy Wistar na aktywność CYP2E1 (*in vivo*).

W celu zbadania indukcji CYP2E1 pod wpływem etanolu szczury rasy Wistar zostały pojone 10% etanolem przez okres 2 miesięcy (tzw. szczury „HIGH”). Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta pojone wyłącznie wodą (szczury „LOW”). Po okresie 2 miesięcy zwierzęta zostały uśmiercone i pobrano od nich wątroby. Wątroby poddano homogenizacji w 0,25M buforze sacharozowym (pH 7.55) z dodatkiem 50mM Tris, 25mM KCl i 3mM MgCl₂, a następnie poddano wirowaniu różnicowemu w celu izolacji frakcji cytoplazmatycznej i mikrosomów. Uzyskane mikrosomy zawieszono w 0,01M buforze fosforanowym z dodatkiem 20%

glicerolu (pH 7.4). Liczebność zarówno grupy badanej, jak i kontrolnej wynosiła po 3 szczury. Szczury uzyskano dzięki uprzejmości dr hab. P. Mikołajczaka z Katedry Farmakologii UMiKM.

Zasada metody

Aktywność cytochromów P450 ocenia się na podstawie pomiarów aktywności tzw. markerów enzymatycznych. Dla CYP2E1 takim markerem jest hydrolaza p-nitrofenolu (PNPH), jako, że izoforma ta jest zdolna do przeprowadzania reakcji hydroksylacji aromatycznych pochodnych nitrowych. Produktem reakcji (rycina 1) katalizowanej przez PNPH jest 4-nitrokatechol, którego poziom można ocenić spektrokolorymetrycznie (max. absorpcji przy 546 nm). Substrat dla tej reakcji, p-nitrofenol, wykazuje bardzo niską absorbancję przy tej długości fali.



Ryc. 1. Hydroksylacja p-nitrofenolu.

Odczynniki

- bufor fosforanowy 0.1M zawierający 5 mM MgCl₂, pH 6,8
- roztwór 0.2 mM p-nitrofenolu
- 10 mM roztwór NADPH
- 0.6M roztwór HClO₄
- 10M roztwór NaOH
- mikrosomy szczura

Wykonanie

1) Przygotować następujące próby w NISKICH PROBÓWKACH szklanych wg tabeli:

Składniki reakcji	Próby szczurów pojonych etanolem (µl) (H)	Próby szczurów pojonych wodą (µl) (L)
Bufor fosforanowy + MgCl ₂	1750	1750
Substrat – p-nitrofenol	50	50
Mikrosomy	100	100
Preinkubacja w temp. 37° C przez 3 minuty		
Roztwór NADPH	100	100
Inkubacja w temp. 37° C przez 30 minut		
HClO ₄ (zatrzymanie reakcji)	500 µl	
Przełąć do plastikowych probówek, odwirować przy 2500 RPM, 15 min		
Pobrać po 1000 µl supernatantu do czystych probówek		
NaOH (wywołanie barwy)	100 µl	

2) Odczytać absorbancję względem wody przy długości fali $\lambda=546\text{nm}$

3) Aktywność PNPH w badanych frakcjach mikrosomalnych obliczyć ze wzoru:

$$\text{Akt}_{\text{PNPH}} [\text{nmol/min/mg}] = (\Delta\text{Abs} \times 12993) : (C_b \times 0,1 \times 30)$$

ΔAbs – zmiana absorbancji w czasie inkubacji (w tym wypadku = wartości odczytanej po 30 min)

C_b – stężenie białka w danej próbce w mg/ml

12993 – molowy wsp. absorpcji dla nitrokatecholu

0,1 – obj. użytej frakcji mikrosomalnej (w ml)

30 – czas inkubacji (minuty)