



**Univerzita Komenského v Bratislave  
Jesseniova lekárska fakulta v Martin**



# **BIOTRANSFORMÁCIA A ENZÝMY METABOLIZUJÚCE XENOBIOTIKÁ**

**Monika Kmet'ová Sivoňová**

Vysokoškolské skriptá

Martin, 2023

# **BIOTRANSFORMÁCIA A ENZÝMY METABOLIZUJÚCE XENOBIOTIKÁ**

Vysokoškolské skriptá

## **AUTOR:**

doc. Mgr. Monika Kmeťová Sivoňová, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie

## **RECENZENTI:**

prof. RNDr. Jana Muchová, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie

prof. Ing. Mária Mareková, CSc.

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej a klinickej biochémie

prof. RNDr. Peter Kaplán, CSc.

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie

Obsah vzdelávacieho materiálu neprešiel jazykovou, gramatickou a štylistickou korektúrou. Za odbornú a jazykovú stránku zodpovedá autor.

Vydavateľ: Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Vydanie: prvé

Počet strán: 116

ISBN 978-80-8187-147-4

EAN 9788081871474

## PREDHOVOR

Urbanizácia, populačný rast, industrializácia a globalizácia ovplyvňujú naše životy pozitívnym, ako aj negatívnym spôsobom. V ostatných desaťročiach rapídne narastá kontaminácia životného prostredia cudzorodými látkami, tzv. xenobiotikami a tým aj ich príjem živými organizmami. Denne sme vystavení pôsobeniu mnohých xenobiotík, ktorými sú napríklad produkty osobnej starostlivosti, potravinové aditíva, lieky, pesticídy, produkty priemyselnej výroby, polutanty a kontaminanty životného prostredia atď. Mnohé z týchto xenobiotík, resp. ich metabolity v závislosti od „dávky“ a „doby“ expozície v organizme môžu prejavovať svoje mutagénne, karcinogénne, alergické a iné účinky.

Vo všeobecnosti je preto potrebná eliminácia týchto škodlivých zlúčenín z organizmu prostredníctvom biotransformácie. Ide o enzýmovo-katalyzovaný proces chemickej modifikácie xenobiotík na rozpustnejšie a ľahšie vylúčiteľné zlúčeniny z organizmu. Biotransformačný systém u ľudí je rozsiahly, vysoko komplexný a ovplyvnený mnohými regulačnými mechanizmami. Expresia mnohých génov kódujúcich biotransformačné enzýmy je indukovaná, respektíve inhibovaná xenobiotikami. Variácie v génoch pre biotransformačné enzýmy môžu viesť k rozdielom v metabolických profiloch jednotlivcov, ale predovšetkým k zmenám pomeru medzi detoxikáciou a bioaktivitou xenobiotika.

Tento učebný text je určený širokému publiku, najmä študentom medicíny, ale aj iných študijných odborov, ako sú chémia, farmácia, biochémia a ďalšie príbuzné odbory. Všeobecným zámerom tejto publikácie je charakterizácia základných pojmov v procese biotransformácie xenobiotík a najmä detailné objasnenie úlohy biotransformačných enzýmov. Z medicínskeho hľadiska sú tu ilustrované dôsledky vplyvu génových polymorfizmov biotransformačných enzýmov na metabolizmus, biologickú dostupnosť, účinnosť (v prípade liekov), toxicitu xenobiotík a v konečnom dôsledku na náchylnosť pre vznik nádorových ochorení. V záverečnej kapitole sú uvedené príklady eliminácie vybraných xenobiotík prostredníctvom biotransformačných enzýmov. Veríme, že tento študijný materiál pomôže študentom nielen pri štúdiu nových poznatkov o úlohe biotransformačných enzýmov pri eliminácii xenobiotík, ale aj pri aplikácii získaných vedomostí v praxi.

## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

|                  |   |
|------------------|---|
| ABC transportéry | Rodina kaziет viažucich ATP                         |
| Acetyl-CoA       | Acetylkoenzým A                                     |
| ADH              | Alkoholdehydrogenáza                                |
| AhR              | Aryl-uhl'ovodíkový receptor                         |
| AKR              | Aldo-ketoreduktázy                                  |
| ALDH             | Aldehyddehydrogenáza                                |
| AO               | Aldehydoxidáza                                      |
| AP1              | Aktivátor proteínu 1                                |
| AR               | Azoreduktáza  |
| ARNT             | Jadrový translokátor aryl-uhl'ovodíkového receptora |
| BCRP             | Proteín rezistencie karcinómu prsníka               |
| cAMP             | Cyklický adenosínmonofosfát                         |
| CAR              | Konštitutívny androstánový receptor                 |
| CBR              | Karbonylreduktáza                                   |
| CDNB             | 1-chlór-2,4-dinitrobenzén                           |
| Cdx2             | Homeobox kaudálneho typu 2                          |
| CES              | Karboxylesteráza                                    |
| CNS              | Centrálny nervový systém                            |
| CNV              | Zmeny v počte kópií génu                            |
| CoA-SH           | Koenzým A   |
| COMT             | Katechol-O-metyltransferáza                         |
| FOXA1            | Forkhead Box A1                                     |
| cGMP             | Cyklický guanozínmonofosfát                         |
| GLYAT            | Glycín-N-acyltransferáza                            |
| GST              | Glutatión-S-transferáza                             |
| CYP              | Cytochróm P450                                      |
| cyt b5           | Cytochróm b5  |
| DHEAS            | Dehydroepiandrosterónsulfát                         |
| DNA              | Deoxyribonukleová kyselina                          |
| EH               | Epoxidhydroláza                                     |
| EM               | Extenzívni metabolizéri                             |
| EpFA             | Epoxy-karboxylové kyseliny                          |
| ER               | Endoplazmatické retikulum                           |
| FAD              | Flavínadenín dinukleotid                            |
| FMN              | Flavínmononukleotid                                 |
| FMO              | Monooxygenázy obsahujúce flavín                     |
| FXR              | Farnezoid X receptor                                |
| GIT              | Gastrointestinálny trakt                            |
| GR               | Glukokortikoidový receptor                          |
| GSH              | Glutatión   |
| GSR              | Konjugát glutatiónu                                 |
| GSSG             | Oxidovaný glutatión                                 |

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| HNF1 $\alpha$                 | Hepatocytový jadrový faktor 1 $\alpha$                         |
| HNF4                          | Hepatocytový jadrový faktor 4                                  |
| HNMT                          | Histamín-N-metyltransferáza                                    |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peroxid vodíka   |
| HS                            | Vysokospinový stav   |
| IM                            | Strední metabolizéri   |
| INMT                          | Indoletylamín-N-metyltransferáza                               |
| JNK1                          | c-Jun N-terminálna kináza 1                                    |
| LS                            | Nízokospinový stav   |
| LXR                           | Pečeňový X receptor  |
| MAPEG                         | S membránou asociované proteíny metabolizmu eikozanoidov a GSH |
| MAO                           | Monoaminoxidáza  |
| MATE                          | Mnoholiekové a toxíny extrudujúce proteíny                     |
| MRP                           | Proteíny mnoholiekovej rezistencie                             |
| MT                            | Metyltransferáza   |
| NAD <sup>+</sup>              | Nikotínamidadenín dinukleotid                                  |
| NADP <sup>+</sup>             | Nikotínamidadenín dinukleotidfosfát                            |
| NAT                           | N-acetyltransferáza  |
| NASH                          | Nealkoholická steatohepatitída                                 |
| NBDHEX                        | 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yltio)hexanol                 |
| NMR                           | Nukleárna magnetická rezonancia                                |
| NNMT                          | Nikotínamid-N-metyltransferáza                                 |
| OATP                          | Polypeptidy transportujúce organické anióny                    |
| OAT                           | Transportéry organických aniónov                               |
| OCT                           | Transportéry organických katiónov                              |
| OCTN                          | Transportéry organických katiónov/karnitínu                    |
| PABA                          | Kyselina <i>p</i> -aminobenzoová                               |
| PAPS                          | 3'-fosfoadenozyl-5'-fosfosulfát                                |
| PAPSS                         | 3'-fosfoadenozyl-5'-fosfosulfátsyntáza                         |
| PAS                           | Kyselina <i>p</i> -aminosalicylová                             |
| PAU                           | Polycyklické aromatické uhl'ovodíky                            |
| PCB                           | Polychlórované bifenyly  |
| PEPT                          | Transportéry oligopeptidov spriahnuté s H <sup>+</sup>         |
| P-gp                          | P-glykoproteín   |
| PM                            | Slabí metabolizéri   |
| PNMT                          | Fenyletanolamín-N-metyltransferáza                             |
| POMT                          | Fenol-O-metyltransferáza                                       |
| POR                           | NADPH-cytochróm P450 oxidoreduktáza                            |
| PPAR                          | Receptory aktivované proliferátormi peroxizómov                |
| PXR                           | Pregnánový jadrový receptor                                    |
| ROS                           | Reaktívne formy kyslíka  |
| SAM                           | S-adenozylmetionín   |
| SDR                           | Dehydrogenázy/reduktázy s krátkym reťazcom                     |
| SAH                           | S-adenozylhomocysteín  |

|            |  |
|------------|--|
| SLC        | Transportéry rozpustených látok                                |
| SNP        | Jednonukleotidové polymorfizmy                                 |
| SRS        | Rozpoznávacie miesta substrátu                                 |
| SULT       | Sulfotransferázy   |
| TMA        | Trimetylamín   |
| TRAF2      | Faktor 2 asociovaný s receptormi tumor nekrotizujúceho faktora |
| TMT        | Tiol-S-metyltransferáza  |
| TPMT       | Tiopurín-S-metyltransferáza                                    |
| UDP        | Uridín-5'-difosfát   |
| UDP-GA     | Kyselina UDP-glukurónová                                       |
| UDP-GlcNAc | Uridín-5'-difosfát N-acetylglukozamín                          |
| UGT        | UDP-glukuronyltransferáza                                      |
| URAT1      | Transportér urátov 1   |
| UM         | Ultrarýchli metabolizéri                                       |
| XDH        | Xantindehydrogenáza  |
| XO         | Xantínoxidáza  |
| XOR        | Xantínoxidoreduktáza   |

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Metabolizmus xenobiotík</b>   | 9  |
| 1.1. Xenobiotiká  | 9  |
| 1.2. Charakterizácia procesu biotransformácie   | 13 |
| 1.3. Faktory ovplyvňujúce metabolizmus xenobiotík   | 17 |
| 1.4. Farmakogenomika a personalizovaná terapia  | 19 |
| <b>2. Transport xenobiotík do buniek</b>  | 21 |
| 2.1. Polypeptidy transportujúce organické anióny (OATP)   | 21 |
| 2.2. Transportéry organických aniónov (OAT)   | 22 |
| 2.3. Transportéry organických kationov (OCT) a transportéry organických kationov/karnitínu (OCTN) | 23 |
| 2.4. Transportéry oligopeptidov spriahnuté s H <sup>+</sup> (PEPT)                                | 24 |
| <b>3. Enzýmy I. fázy biotransformácie</b>   | 25 |
| 3.1. Cytochróm P450 (CYP)   | 26 |
| 3.1.1. Klasifikácia a charakterizácia CYP   | 27 |
| 3.1.2. Štruktúra CYP  | 28 |
| 3.1.3. Katalytický cyklus CYP   | 30 |
| 3.1.4. Faktory ovplyvňujúce aktivitu CYP  | 33 |
| 3.1.5. Rodina CYP1  | 34 |
| 3.1.6. Rodina CYP2  | 35 |
| 3.1.7. Rodina CYP3  | 40 |
| 3.1.8. Génové polymorfizmy CYP enzýmov metabolizujúcich lieky                                     | 42 |
| 3.1.9. Genetické variácie CYP a nádorové ochorenia  | 46 |
| 3.2. Monoxygenázy obsahujúce flavín (FMO)   | 48 |
| 3.2.1. Klasifikácia a charakterizácia FMO   | 48 |
| 3.2.2. Štruktúra FMO  | 50 |
| 3.2.3. Katalytický cyklus FMO   | 51 |
| 3.2.4. Genetické variácie FMO a nádorové ochorenia  | 52 |
| 3.3. Ďalšie oxidázy podieľajúce sa na metabolizácii xenobiotík                                    | 53 |
| 3.3.1. Monoaminoxidázy  | 53 |
| 3.3.2. Peroxidázy   | 54 |
| 3.3.3. Alkoholdehydrogenázy   | 55 |
| 3.3.4. Aldehyddehydrogenázy   | 57 |
| 3.3.5. Aldehydoxidáza a xantínoxidoreduktáza  | 58 |
| 3.4. Enzýmy podieľajúce sa na redukcii xenobiotík   | 59 |
| 3.5. Enzýmy podieľajúce sa na hydrolýze xenobiotík  | 61 |
| 3.5.1. Karboxylesterázy   | 62 |
| 3.5.2. Epoxidhydrolázy  | 63 |
| <b>4. Enzýmy II. fázy biotransformácie</b>  | 65 |
| 4.1. UDP-glukuronyltransferázy (UGT)  | 66 |
| 4.1.1. Klasifikácia a charakterizácia UGT   | 66 |
| 4.1.2. Štruktúra UGT  | 69 |

|  |            |
|--|------------|
| 4.1.3. Katalytická aktivita UGT.....   | 70         |
| 4.1.4. Genetické variácie UGT a nádorové ochorenia.....  | 72         |
| 4.2. Glutatión-S-transferázy (GST).....  | 75         |
| 4.2.1. Klasifikácia a charakterizácia GST .....  | 76         |
| 4.2.2. Štruktúra GST.....  | 78         |
| 4.2.3. Katalytická aktivita GST .....  | 79         |
| 4.2.4. Ďalšie funkcie GST.....   | 81         |
| 4.2.5. Genetické variácie GST a nádorové ochorenia .....   | 82         |
| 4.3. Sulfotransferázy (SULT).....  | 84         |
| 4.3.1. Klasifikácia a charakterizácia SULT .....   | 84         |
| 4.3.2. Štruktúra SULT .....  | 87         |
| 4.3.3. Katalytická aktivita SULT.....  | 88         |
| 4.3.4. Genetické variácie SULT a nádorové ochorenia .....  | 89         |
| 4.4. N-acetyltransferázy (NAT).....  | 91         |
| 4.4.1. Klasifikácia a charakterizácia NAT.....   | 91         |
| 4.4.2. Štruktúra NAT .....   | 92         |
| 4.4.3. Katalytická aktivita NAT.....   | 93         |
| 4.4.4. Genetické variácie NAT a nádorové ochorenia.....  | 94         |
| 4.5. Ďalšie enzýmy II. fázy biotransformácie .....   | 97         |
| 4.5.1. Metyltransferázy .....  | 97         |
| 4.5.2. Konjugácia xenobiotík s aminokyselinami.....  | 99         |
| <b>5. Eliminácia xenobiotík a ich metabolitov z organizmu .....</b>  | <b>100</b> |
| 5.1. ABC transportéry .....  | 101        |
| 5.2. Mnoholiekové a toxíny extrudujúce proteíny (MATE) .....   | 104        |
| <b>6. Eliminácia vybraných xenobiotík a ich metabolitov prostredníctvom biotransformačných enzýmov .....</b> | <b>105</b> |
| 6.1. Biotransformácia benzo[a]pyrénu .....   | 105        |
| 6.2. Biotransformácia nikotínu.....  | 107        |
| 6.3. Biotransformácia toluénu .....  | 108        |
| 6.4. Biotransformácia acetaminofénu.....   | 109        |
| 6.5. Biotransformácia kyseliny acetylsalicylovej.....  | 110        |
| <b>7. Zoznam použitej literatúry .....</b>   | <b>111</b> |



# 1. METABOLIZMUS XENOBIOTÍK

## 1.1. XENOBIOTIKÁ

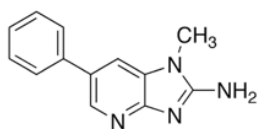
Technologický pokrok v 20. storočí viedol k syntéze mnohých zlúčenín, ktoré uľahčujú každodenný život (napr. antibiotiká, pesticídy, farbivá, prísady atď.), avšak mnohé z nich sa prirodzene nevyskytujú v životnom prostredí, alebo ich koncentrácie sú výrazne odlišné. Vzduch, voda, pôda a potraviny, ktoré sú nevyhnutné pre náš život, môžu obsahovať toxické alebo potenciálne toxické zlúčeniny, ktoré musia byť z organizmu odstránené. Tieto zlúčeniny sa označujú ako **xenobiotiká**. Výraz xenobiotikum vznikol z gréckych slov „*xenos*“, čo znamená cudzí, a „*bios*“, čo znamená život. Sú definované ako „*zlúčeniny, ktoré sa nachádzajú, ale sa nevytvárajú v organizme alebo v životnom prostredí*“. Niektoré prirodzene sa vyskytujúce zlúčeniny (endobiotiká) sa stávajú xenobiotikami, ak sú prítomné v nadmerných koncentráciách.

Rozdelenie xenobiotík:

- *exogénne* – cudzorodé látky z vonkajšieho prostredia, napríklad pesticídy, lieky, kozmetické výrobky, potravinové aditíva, produkty priemyselnej výroby, polutanty a kontaminanty životného prostredia, jadrový odpad atď.
- *endogénne* – niektoré zlúčeniny syntetizované v organizme, alebo vznikajúce v metabolických procesoch. Patria sem napríklad bilirubín, žľčové kyseliny, steroidy, eikozanoidy a niektoré karboxylové kyseliny.

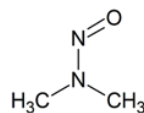
Medzi potenciálne toxické látky prítomné v potravinách, resp. vznikajúce pri tepelnej príprave jedla patria heterocyklické amíny, nitróزامíny, polycyklické aromatické uhl'ovodíky (PAU), azofarbivá, nenasýtené aldehydy a mykotoxíny. Na obrázku 1 sú uvedené štruktúrne vzorce vybraných xenobiotík.

Heterocyklické amíny sú organické zlúčeniny, ktoré obsahujú aspoň jeden heterocyklický kruh (s jedným alebo viacerými heteroatómami) a aminoskupinu. Najbežnejšie sa vyskytujúce heteroatómy sú dusík, kyslík a síra. Heterocyklické amíny vznikajú pri príprave mäsa pri vysokej teplote vyprážaním, grilovaním, opekaním atď. a najrozšírenejším z nich je 2-amino-1-metyl-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridín.



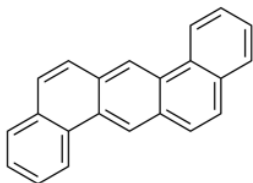
**Heterocyklický amín**

2-amino-1-metyl-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridín



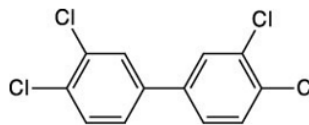
**Nitrózamín**

N-nitrózodimetylamin (NDMA)



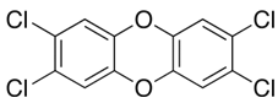
**Polycyklický aromatický uhlíkový**

Dibenzo[a,h]antracén



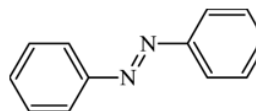
**Polychlórovaný bifenyľ**

PCB77



**Dioxín**

2,3,7,8 tetrachlórdibenzo-p-dioxín (2,3,7,8-TCDD)



**Azofarbivo**

**Obrázok 1** Štruktúrne vzorce vybraných xenobiotík

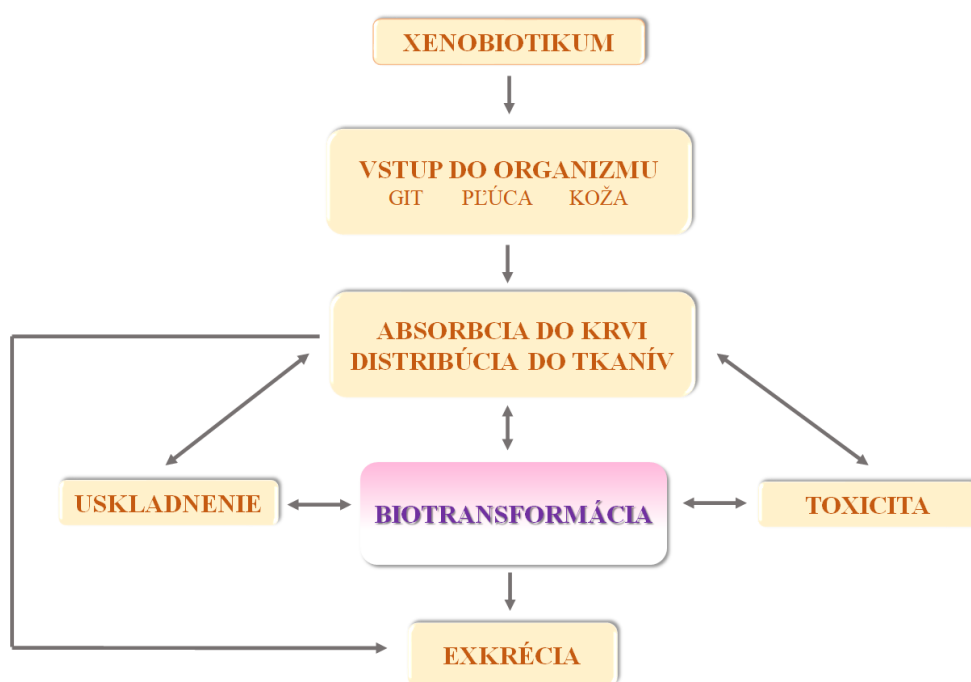
Nitrózamíny vznikajú reakciou medzi dusičnanmi alebo dusitanmi a amínmi. Nitrózamíny a/alebo ich prekursori sú prítomné v niektorých potravinách (napr. hubách, fermentovaných a údených rybách, údenom mäse, slanine atď.), alkoholických nápojoch, kozmetike a v cigaretovom dyme. Nitrózamíny sa môžu tvoriť aj v ústach alebo v žalúdku, ak potravinu obsahuje dusitany alebo dusičnany, ktoré sa pri kyslom pH v ústach alebo v žalúdku môžu zlúčiť s amínmi za vzniku nitrózamínov.

PAU predstavujú veľkú skupinu rôznorodých organických zlúčenín, ktoré obsahujú dva alebo viac kondenzovaných aromatických kruhov. PAU vykazujú svoje toxické vlastnosti po metabolickej premene na chemicky aktívne medziprodukty. PAU vznikajú v dôsledku nedokonalého spaľovania materiálov obsahujúcich uhlík, ako je drevo, uhlie, ropa, plyn alebo biomasa. Vytvárajú sa tiež vo výfukových plynch automobilov, údených alebo grilovaných potravinách a sú prítomné v cigaretovom dyme a v tabakových výrobkoch. Hlavné PAU vznikajúce pri príprave jedla sú benzo[a]pyrén a dibenzo[a,h]antracén.

Cigaretový dym obsahuje rôzne toxické látky, ako sú nitrózamíny, nikotín, benzo[a]pyrén a ďalšie PAU. Ľudia sú tiež vystavení pôsobeniu prchavých organických rozpúšťadiel (najmä

benzénu a fenolu), ktoré sú prítomné v bežne používaných výrobkoch v domácnosti, ako sú čistiace prostriedky, farby, pesticídy atď. PAU, dioxíny a polychlórované bifenyly (PCB), ktorých pôsobeniu sú ľudia vystavení, vznikajú pri priemyselnom spaľovaní v rafinériách, spaľovniach a v uhoľných zariadeniach.

Koncentrácia xenobiotika v mieste jeho pôsobenia závisí od dávky, spôsobu vstupu do organizmu, rýchlosti a rozsahu absorpcie, jeho distribúcie v organizme a v tkanivách, biotransformácie a vylúčenia z organizmu (Obr. 2).



**Obrázok 2** Absorbcia, distribúcia, biotransformácia a exkrécia xenobiotík

Pozn. Gastrointestinálny trakt, GIT

Najdôležitejšie miesto absorpcie xenobiotík je gastrointestinálny trakt (GIT), aj keď ich vstup do organizmu sa tiež uskutočňuje prostredníctvom kože a dýchacích ciest (najmä v prípade prchavých zlúčenín, prachových častíc, aerosólov atď.). Bez ohľadu na miesto absorpcie, xenobiotiká musia prechádzať cez bunkové membrány, aby vstúpili do systémovej cirkulácie, ako aj do intersticiálnej a transcelulárnej tekutiny.

Mnohé xenobiotiká sú slabé kyseliny alebo zásady. Nízke pH v žalúdku podporuje absorpciu slabých kyselín. Slabé zásady sú ionizované a teda nedochádza k ich absorpcii zo žalúdka. Xenobiotiká pri transporte z lúmenu čreva do krvného obehu musia prechádzať črevným epitelom, bazálnou membránou a endotelom kapilár. Tento transport nie je špeciálny,

ale využívajú sa rovnaké transportné mechanizmy ako pri vstrebávaní živín. Existuje päť možných spôsobov transportu xenobiotík cez črevo:

- *Pasívna difúzia* – je hlavným procesom absorpcie xenobiotík. Tento proces nie je saturateľný a je priamo úmerný koncentračnému gradientu. Ak sú koncentrácie xenobiotika rovnaké na obidvoch stranách membrány, pohyb cez membránu sa zastaví. Slabé kyseliny a zásady sa absorbujú ľahko a úplne ionizované silné kyseliny a zásady sú absorbované ťažšie.
- *Aktívny transport* – vyžaduje energiu na transport substrátov proti koncentračnému alebo elektrochemickému gradientu. Uplatňuje sa u vysoko polárnych alebo nabitých xenobiotík.
- *Pinocytóza* – z membrány sa vytvorí vezikula, ktorá obsahuje xenobiotikum. V bunke dochádza k uvoľneniu obsahu vezikuly.
- *Filtrácia cez „póry“* – transport lipofilných a hydrofilných xenobiotík s molekulovou hmotnosťou nižšou ako 100 Da.
- *Prostredníctvom lymfy* – absorpcia environmentálnych toxických chemikálií a ich distribúcia v tkanivách bez toho, aby boli transformované pečeňou (napr. dichlór-difenyltrichlórétán, benzo[a]pyrén a 3-metylcholantén).

Xenobiotiká absorbované zo žalúdka/tenkého čreva sa dostávajú portálnym obehom priamo do pečene. Pečeň je najdôležitejším miestom metabolizácie xenobiotík, má schopnosť ľahko extrahovať xenobiotiká z portálneho obehu. Mnohé z nich metabolizuje skôr, ako sa uskladnia v tkanivách, vylúčia do žlče alebo uvoľnia do systémovej cirkulácie. Xenobiotiká, najmä lieky, môžu byť pred vstupom do systémovej cirkulácie podrobené „efektu prvého prechodu (first pass metabolism)“, ktorý slúži na zníženie „biologickej dostupnosti“ xenobiotika/lieku. V pečeni **metabolizácia (biotransformácia, detoxikácia)** xenobiotika zahŕňa jeho funkcionalizáciu a/alebo konjugáciu katalyzovanú biotransformačnými enzýmami za vzniku rôznych metabolitov, ktoré sa ľahšie odstraňujú z buniek, tkanív a sú vylúčené z organizmu najmä prostredníctvom moča, žlče, stolice a menej cez vydychovaný vzduch, pot, materské mlieko atď. Bez účinnej detoxikácie a následnej exkrécie sa však mnohé xenobiotiká môžu hromadiť v tkanivách, ktoré môžu slúžiť ako rezervoár a predlžovať ich toxicitu, alebo v prípade liekov ich terapeutický účinok. Distribúcia xenobiotík do rôznych tkanív je ovplyvnená tkanivovou hemodynamikou, pasívnou difúziou cez lipidové membrány, prítomnosťou aktívnych transportných systémov podieľajúcich sa na transporte daného xenobiotika a na ich väzbe na proteíny krvi (albumín a niektoré globulíny) a tkanív.

Okrem tejto najbežnejšej cesty eliminácie xenobiotík prostredníctvom biotransformačných enzýmov, môžu byť xenobiotiká eliminované nezmenené (hydrofilné zlúčeniny močom a lipofilné prostredníctvom žlče a stolice); môžu byť zadržané v organizme nezmenené (napr. olovo a kadmium), alebo môžu prejsť spontánnou transformáciou.

Niektoré xenobiotiká, lieky/liečivá (napr. morfín, imipramín) a niektoré endogénne látky (napr. žľčové kyseliny, bilirubín) môžu byť recyklované pomocou enterohepatálneho obehu. Tento proces zahŕňa biliárnu exkréciu materskej zlúčeniny alebo metabolitu a ich následnú intestinálnu reabsorpciu. Črevný mikrobióm hrá ústrednú úlohu vo fenoméne enterohepatálnej recyklácie. Napríklad, ak je liek vylučovaný ako glukuronid, intestinálna hydrolýza konjugátu črevnými baktériami umožňuje reabsorpciu materskej zlúčeniny do obehu. Enterohepatálna recyklácia teda ovplyvní farmakokinetické charakteristiky lieku, čo vedie k zníženiu klírensu, dlhšiemu polčasu a v konečnom dôsledku k predĺženiu jeho účinkov. Transportéry lokalizované v bazolaterálnej membráne črevných buniek môžu uľahčiť transport lieku do portálneho obehu po tom, ako sa liek reabsorbuje v čreve.

## 1.2. CHARAKTERIZÁCIA PROCESU BIOTRANSFORMÁCIE

Hypotéza o premene xenobiotík na látky rozpustné vo vode a vylučované močom bola prvýkrát vyslovená na konci 18. storočia. Vedci zbierali moč rôznych zvierat a charakterizáciou zlúčenín prítomných v moči sa snažili pochopiť, ako sú rôzne xenobiotiká odstraňované z organizmu. Jedným z prvých metabolitov, ktorý bol identifikovaný v moči bola kyselina hippurová v roku 1773. Jednoznačný dôkaz o jej syntéze podal nemecký chemik Wilhelm Keller, ktorý užil dávku kyseliny benzoovej a preukázal priamy vzťah medzi požitím kyseliny benzoovej a následne v moči vylúčenou kyselinou hippurovou.

Viac ako 100 rokov po tomto pozorovaní sa pokračovalo v identifikácii rôznych metabolitov, boli identifikované konjugačné reakcie a konjugačné činidlá, ako sú kyselina glukurónová, sulfát, glycín, glutamín, taurín, ornitín a glutatión. Napriek tomu, že konjugačné reakcie objasnili otázku „*Ako sa vo vode nerozpustná zlúčenina premieňa na látku, ktorá je vylučovaná močom?*“, vyvolalo to ďalšiu otázku. Vo všetkých konjugačných reakciách sa vyžaduje, aby xenobiotikum malo schopnosť reagovať s konjugačným činidlom, t.j. mať aktívne centrum alebo „funkčnú“ skupinu, ktorá reaguje s konjugačným činidlom. Čo však so zlúčeninami, ktoré nemajú takúto funkčnú skupinu?

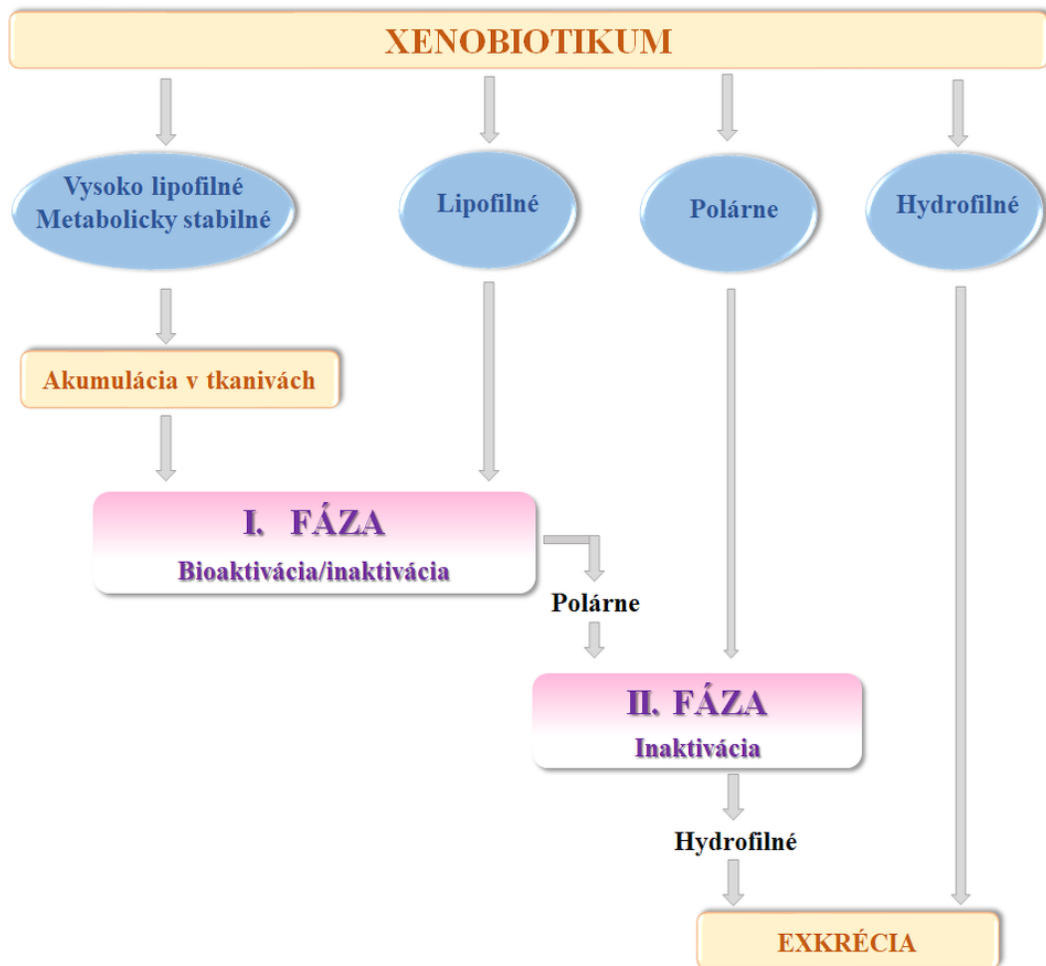
Vo svojej prelomovej monografii z roku 1947 *Detoxikačné mechanizmy*, biochemik R. T. Williams definoval oblasť detoxikácie. Williams navrhol, že tieto nereaktívne zlúčeniny môžu byť biotransformované v dvoch fázach, a to vo fáze I, ktorá využíva kyslík na tvorbu reaktívneho miesta a fáze II, pri ktorej naviazaním konjugačného činidla na reaktívne miesto vzniká vo vode rozpustná zlúčenina, ľahšie vylúčiteľná z organizmu močom.

Hlavným problémom pri identifikácii, kvantifikácii a eliminácii xenobiotík sú ich fyzikálno-chemické vlastnosti, ako je nízka molekulová hmotnosť, ionizovateľnosť, rozpustnosť vo vode, lipofilita, polarita a prchavosť. Väčšina xenobiotík sú lipofilné zlúčeniny, ktoré sú veľmi málo, resp. nerozpustné vo vode a preto musia byť v organizme metabolizované na rozpustnejšie a ľahšie vylúčiteľné zlúčeniny. Tento proces sa označuje ako **biotransformácia**, ktorej cieľom je *premena xenobiotika na neúčinný metabolit, ktorý sa ľahšie eliminuje z organizmu*.

Proces konverzie xenobiotík prostredníctvom biotransformácie prebieha v dvoch fázach, fáze I a fáze II (Obr. 3):

- **V I. fáze biotransformácie (funkcionalizácia)** dochádza k zavedeniu vodíka alebo novej funkčnej skupiny (napr. -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, -COOH) do xenobiotika. Patria sem jednoduché reakcie, ako je oxidácia, redukcia a hydrolýza. Najvýznamnejším enzýmom tejto fázy je cytochróm P450 (Tab. 1). Funkcionalizácia mierne zvyšuje rozpustnosť materskej zlúčeniny a otvára cestu pre II. fázu biotransformácie.
- **V II. fáze biotransformácie (konjugácia)** dochádza k reakcii funkčných skupín látok z metabolismu I. fázy s endogénnym substrátom (napr. kyselinou glukurónovou, glutatiónom alebo sulfátom) za vzniku konjugátu, pričom sa zvýši jeho rozpustnosť vo vode, čím sa uľahčí jeho exkrécia z organizmu najmä prostredníctvom moča alebo žlče. Patrí sem glukuronidácia, sulfonácia, metylácia, acetylácia, konjugácia s aminokyselinami (ako je glycín, kyselina glutámová a taurín), a konjugácia s glutatiónom (GSH). Konjugačná reakcia (okrem metylácie a acetylácie) výrazne zvyšuje rozpustnosť cudzorodej zlúčeniny vo vode. Najvýznamnejšie enzýmy tejto fázy sú UDP-glukuronyltransferáza, glutatión-S-transferáza, sulfotransferáza, N-acetyltransferáza a metyltransferáza (Tab. 1).

V závislosti od fyzikálno-chemických vlastností môže byť xenobiotikum metabolizované v obidvoch fázach biotransformácie (lipofilné), alebo len v jednej z fáz (xenobiotikum obsahujúce polárnu skupinu), poprípade môže byť vylúčené z organizmu v nezmenenej forme (hydrofilné).



**Obrázok 3** Všeobecný proces biotransformácie s reakciami I. a II. fázy. Biotransformácia je proces, pri ktorom dochádza k premene hydrofóbnych substrátov na hydrofilné molekuly, ktoré sa ľahšie eliminujú z organizmu žľouchou alebo močom. Niektoré vysoko lipofilné látky (napr. PCB, ditiotritol) nie sú vhodným substrátom pre biotransformačné enzýmy, preto dochádza v organizme k ich akumulácii, najmä v tukovom tkanive.

**Tabuľka 1** Biotransformačné reakcie, enzýmy a ich bunková lokalizácia, hlavné pečeňové izoformy enzýmov

| Reakcia           | Enzým  | Kofaktor                          | Lokalizácia v bunke                | Hlavné pečeňové izoformy   |
|-------------------|--|-----------------------------------|------------------------------------|--|
| <b>OXIDÁCIA</b>   | Cytochróm P450 (CYP)                             | O <sub>2</sub> , NADPH            | Mikrozómy                          | CYP3A4, 2D6, 2C9, 2C, 1A2, 2E1                                     |
|                   | Monoxygenázy obsahujúce flavín (FMO)             | O <sub>2</sub> , NADPH            | Mikrozómy                          | FMO3, FMO5   |
|                   | Monoaminoxidáza (MAO)                            | O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O | Vonkajšia mitochondriálna membrána | MAO-A, MAO-B   |
|                   | Alkoholdehydrogenáza (ADH)                       | NAD <sup>+</sup>                  | Cytosól                            | ADH1-3   |
|                   | Aldehyddehydrogenáza (ALDH)                      | NAD(P) <sup>+</sup>               | Mitochondria, cytosól              | ALDH1, ALDH2   |
|                   | Aldehydoxidáza (AO)                              | O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O | Cytosól                            | AO   |
|                   | Xantinoxidoreduktáza (XOR)                       | O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O | Cytosól                            | XOR  |
| <b>REDUKCIA</b>   | Nitroreduktáza (NR)                              | NAD(P)H                           | Mikrozómy, mikroflóra              |  |
|                   | Azoreduktáza (AR)                                | NAD(P)H                           | Mikrozómy, mikroflóra              |  |
|                   | Aldo-ketoreduktáza (AKR)                         | NAD(P)H,                          | Cytosól, mikrozómy                 | AKR1A1, 1B1, 1C1-C4, 1D1   |
| <b>HYDROLÝZA</b>  | Karboxylesteráza (CES)                           | H <sub>2</sub> O                  | Mikrozómy, cytosól, lyzozómy       | CES1, CES2   |
|                   | Epoxidhydroláza (EH)                             | H <sub>2</sub> O                  | Mikrozómy, Cytosól                 | mEH, sEH   |
| <b>KONJUGÁCIA</b> | UDP-glukuronyltransferáza (UGT)                  | UDP-glukozyľ                      | Mikrozómy                          | UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B                                     |
|                   | Glutatión-S-transferáza (GST)                    | GSH                               | Cytosól                            | GSTA1, M1, P1  |
|                   | Sulfotransferáza (SULT)                          | PAPS                              | Cytosól                            | SULT1A1, 1B1, 1E1, 2A1   |
|                   | N-acetyltransferáza (NAT)                        | Acetyl-CoA                        | Cytosól, mitochondria              | NAT1, NAT2   |
|                   | Metyltransferáza (MT)                            | SAM                               | Cytosól, mikrozómy                 | COMT, PNMT, TPMT, atď.   |
|                   | Enzýmy konjugujúce xenobiotiká s aminokyselinami | ATP, acetyl-CoA, aminokyselina    | Cytosól, mikrozómy, mitochondria   | acyl-CoA syntetáza, acyl-CoA: aminokyselina N-acyltransferáza atď. |

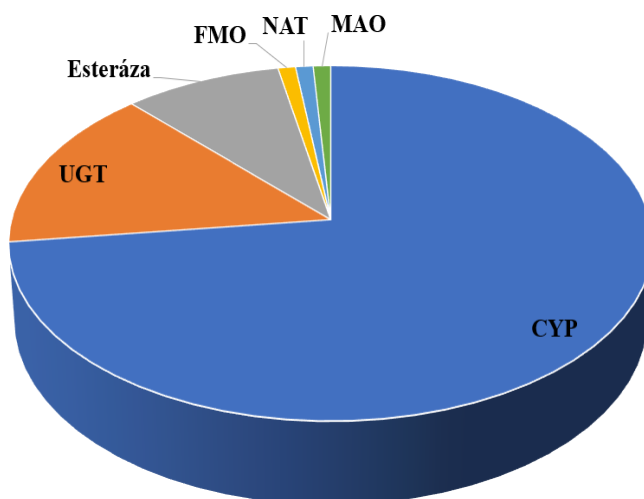
Biotransformácia xenobiotika často zahŕňa niekoľko zmien v materskej zlúčenine. Tieto zmeny sa môžu uskutočniť prostredníctvom série sekvenčných reakcií vedúcich k tvorbe jedného alebo viacerých metabolitov. Nová zlúčenina má odlišné fyzikálno-chemické vlastnosti v porovnaní s materskou zlúčeninou, a v prípade liekov odlišné farmakologické a toxikologické vlastnosti.



Biotransformácia teda môže viesť k nasledujúcim zmenám vlastností xenobiotík:

- konverzia aktívnej zlúčeniny na inú aktívnu zlúčeninu,
- konverzia aktívnej zlúčeniny na inú neaktívnu zlúčeninu,
- konverzia neaktívnej zlúčeniny na inú aktívnu zlúčeninu,
- konverzia neaktívnej zlúčeniny na inú neaktívnu zlúčeninu.

Viac ako 75% z 200 najviac užívaných liekov sú eliminované prostredníctvom biotransformačných enzýmov, pričom približne 95% z nich je metabolizovaných CYP, UGT, esterázami a zvyšok liekov ostatnými enzýmami (Obr. 4).



**Obrázok 4** Príspevky biotransformačných enzýmov k metabolizmu liekov (prevzaté z Guengerich, F. P. Human cytochrome P450 enzymes in Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry. Ed. Ortiz de Montellano, P., Springer International Publishing, 2015, 523-785)

### 1.3. FAKTORY OVPLYVŇUJÚCE METABOLIZMUS XENOBIOTÍK

U ľudí existujú značné rozdiely v schopnosti metabolizovať xenobiotiká. Závisia od fyzikálno-chemických vlastností xenobiotika, od endogénnych faktorov špecifických pre daného jedinca alebo od exogénnych faktorov závislých od prostredia a expozície jedinca (Tab. 2).

**Tabuľka 2** Faktory ovplyvňujúce metabolizmus xenobiotík

| Fyzikálno-chemické | Endogénne             | Exogénne          |
|--------------------|-----------------------|-------------------|
| Elektrofilita      | Vek                   | Dávka             |
| Nukleofilita       | Pohlavie              | Výživa            |
| Lipofilita         | Druh                  | Spôsob podávania  |
| Polarita           | Patológia             | Časť dňa          |
| Väzba proteínov    | Genetika              | Indukcia enzýmov  |
| Veľkosť            | Dostupnosť kofaktorov | Inhibícia enzýmov |
| Sférická prekážka  |                       |                   |
| Stereochémia       |                       |                   |
| Estery             |                       |                   |
| Halogenácia        |                       |                   |

**Vek** významne ovplyvňuje metabolickú kapacitu jedincov. Novorodenci majú nižšiu metabolickú aktivitu ako deti alebo dospelí. Zistilo sa, že množstvo celkového mikrozomálneho proteínu/gram pečene je u novorodencov 20 mg/g a u mladých dospelých okolo 40 mg/g. Po 45. roku života začína pokles relatívneho množstva mikrozomálneho proteínu s vekom. Podobne, aj metabolická aktivita enzýmov I. a II. fázy biotransformácie sa s vekom znižuje, pravdepodobne v dôsledku zníženého objemu pečene a prietoku krvi pečeňou. Metabolizmus liekov sa po 70. roku života znižuje o 30% a tiež aktivita CYP o 32% v porovnaní s jedincami vo veku 20-29 rokov.

**Rozdiely medzi pohlaviami** boli zaznamenané pri absorpcii xenobiotík a liekov, v aktivite enzýmov oboch fáz biotransformácie a vylučovaní xenobiotík žľou. Nežiaduce účinky liekov sú 1,5- až 2-krát častejšie u žien v porovnaní s mužmi. Predpokladá sa, že tento rozdiel vo vedľajších účinkoch liekov môže byť spôsobený vplyvom pohlavných hormónov, telesnej hmotnosti, zložením telesného tuku atď. Počas tehotenstva dochádza k zníženiu metabolizácie xenobiotík, pričom sa predpokladá, že ide o ochranný mechanizmus, ktorý vedie k zníženej tvorbe toxických metabolitov. Choroby a zdravotný stav jedinca tiež ovplyvňujú metabolizmus xenobiotík. Nakoľko najdôležitejším miestom metabolizácie xenobiotík je pečeň, nie je prekvapujúce, že poškodenie normálnej funkcie pečene v dôsledku stukovatenia pečene, biliárnej cirhózy a hepatocelulárneho karcinómu môže obmedziť metabolickú kapacitu jednotlivca.

**Črevný mikrobióm**, t.j. súbor mikroorganizmov v GIT, môže meniť metabolizmus liekov, environmentálnych xenobiotík a ťažkých kovov. Priama chemická modifikácia xenobiotík črevným mikrobiómom, či už pri prechode cez črevný trakt alebo pri opätovnom vstupe do

čreva enterohepatálnou cirkuláciou, môže viesť k zvýšenému metabolizmu alebo bioaktivácii xenobiotík/liekov, v závislosti od enzymatickej aktivity v rámci mikrobiálnej niky. Prevládajúcimi reakciami sú redukcia, adícia acetylových a metylových skupín a tvorba radikálov. Na metabolizácii xenobiotík sa podieľajú mikrobiálne enzýmy, ako sú napríklad  $\beta$ -glukuronidázy, nitroreduktázy a sulfoxidreduktázy. Predpokladá sa, že baktérie majú až okolo 3 000 CYP enzýmov. Okrem toho, mikrobióm môže obmedziť absorpciu xenobiotík v tenkom čreve zvýšením exprese bunkových adhézných proteínov, podporou ochrannej vrstvy sliznice a/alebo priamo zachytením xenobiotika. Zatiaľ čo mikrobióm ovplyvňuje hostiteľa a farmakokinetiku xenobiotika, xenobiotiká môžu ovplyvniť životaschopnosť a metabolizmus mikrobiómu.

#### 1.4. FARMAKOGENOMIKA A PERSONALIZOVANÁ TERAPIA

Vedný odbor, ktorý sa zaoberá štúdiom vplyvu genetických faktorov na individuálne rozdiely v odpovedi na lieky je **farmokogenetika**. **Farmakogenomika** je globálnejšia, zahŕňa štúdium celého spektra génov, ktoré by mohli prispievať k variabilite v účinnosti a toxicite liekov s využitím celogenómových prístupov. **Precízna medicína** (vo všeobecnosti považovaná za analogickú s personalizovanou medicínou alebo individualizovanou medicínou) je inovatívny prístup, ktorý využíva informácie o genóme, životnom prostredí a životnom štýle jednotlivca na presnejší prístup k prevencii, diagnostike a liečbe chorôb. Okrem farmakogenomiky, by v personalizovanej medicíne mali významnú úlohu zohrávať tiež metabolomika (štúdium metabolómu), transkriptomika (kvantitatívne štúdium všetkých génov v organizme) a proteomika (analýza proteómu). Je všeobecne známe, že nie všetci pacienti reagujú na rovnaký liek rovnako. U niektorých pacientov sa môžu vyskytnúť nežiaduce reakcie na liek, ktoré sa nevyskytujú u iných pacientov užívajúcich rovnaký liek v rovnakej dávke. Liek môže tiež vykazovať rôznu účinnosť u jednotlivých pacientov. Dispozícia a osud liečiv (farmakokinetika) a ich terapeutické a toxikologické účinky (farmakodynamika) závisia od zložitých procesov, do ktorých sú zapojené proteíny ovplyvňujúce transport, metabolizmus a mechanizmus účinku liečiv.

Predpokladá sa, že počas evolúcie sa u väčšiny génov vytvorili náhodné variácie v ich nukleotidovej sekvencii. Variácie lokalizované v kódujúcej oblasti génu môžu viesť k substitúcii aminokyseliny v špecifickej polohe proteínu a následne môžu ovplyvniť funkciu

proteínu. Pokiaľ sa variácie vyskytujú v regulačnej oblasti génu, môžu ovplyvniť transkripčné a translačné mechanizmy s následnou moduláciou expresie génového produktu (hladín mRNA a proteínov). Variácie v sekvencii DNA vyskytujúce sa v populácii vo frekvencii vyššej ako 1% sú definované ako polymorfizmy a variácie s frekvenciou nižšou ako 1% sú definované ako mutácie. Genetické variácie, pri ktorých dochádza k substitúcii jedného páru báz, sú definované ako jednonukleotidové polymorfizmy (SNP, Single Nucleotide Polymorphisms). Genetické variácie môžu zahŕňať aj niekoľko nukleotidov a sú definované ako substitúcie, inzercie, delécie, amplifikácie a translokácie. Preto znalosť farmakogenomiky, t.j. znalosť funkčne dôležitých genetických variácií v génoch kódujúcich receptory, iónové kanály, enzýmy atď. pred podávaním liečby by mohlo napomôcť pri rozvoji individualizovanej farmakoterapie, čím by sa zabránilo škodlivým a nežiaducim reakciám na lieky, respektíve zlyhaniu liečby.

V minulosti v súvislosti s interindividuálnou variabilitou na liečbu sa štúdie zameriavali najmä na sledovanie variácií v génoch kódujúcich CYP izoenzýmy (CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19) ako mimoriadne dôležitej rodiny enzýmov metabolizujúcich lieky; na enzýmy II. fázy biotransformácie, ako sú UGT, NAT, tiopurín-S-metyltransferáza (TPMT); ako aj na transportéry liekov ako je P-glykoproteín. Je však potrebné si uvedomiť, že napríklad klinický význam vyšetrenia *TPMT* a *CYP2D6* genových polymorfizmov je známy viac ako štvrtstoročie, avšak v súčasnosti len niektoré krajiny „implementujú“ ich rutinné vyšetrenie do klinickej praxe. V súčasnosti je farmakogenomika stále skôr záležitosťou klinického výskumu a len pomaly preniká do klinickej praxe.

Problém interindividuálnej variability v odpovedi na liečbu nadobúda osobitný význam pri liečbe nádorových ochorení, z dôvodu úzkeho terapeutického spektra protinádorových liekov. Nielen polymorfizmy hostiteľského genómu, ale aj genómu nádoru môžu ovplyvniť odpoveď na liečbu. Genómové variácie hostiteľa aj nádoru regulujú transport, retenciu a eflux chemoterapeutík, pričom určujú stupeň penetrácie do nádorového tkaniva. Genetické polymorfizmy kľúčových enzýmov biotransformácie a ich vplyv najmä na vznik nádorových ochorení je detailne popísaný pri jednotlivých enzýmoch.

## 2. TRANSPORT XENOBIOTÍK DO BUNIEK

Na transporte xenobiotík a liekov cez bunkovú membránu sa podieľajú dve superrodiny transportných proteínov, ktorými sú transportéry rozpustených látok (SLC; Solute carrier transporters) a ATP-viažuce kazetové proteíny (ABC transportéry). Väčšina SLC transportérov sú influxné transportéry, ktoré transportujú substráty do buniek a ABC transportéry sú zvyčajne efluxné transportéry, ktoré transportujú substráty z buniek s využitím hydrolýzy ATP a sú popísané v kapitole 5.

SLC transportéry ovplyvňujú farmakodynamiku liekov, nakoľko selektívne určujú ich vstup do buniek a intracelulárnu koncentráciu. Ich lokalizácia v membráne závisí od funkcie bunky. SLC transportéry sa najčastejšie nachádzajú v bazolaterálnej membráne. Transport xenobiotík a liekov prostredníctvom SLC sa uskutočňuje uľahčenou difúziou (uniport) alebo sekundárnym aktívnym transportom, ktorý využíva iónové ( $H^+$  alebo  $Na^+$ ) gradienty ako hnaciu silu na transport substrátu proti koncentračnému gradientu do buniek. Bolo identifikovaných viac ako tristo SLC transportérov. Sú exprimované v kľúčových tkanivách, ako sú pečeň, obličky, črevá a mozog.

Najvýznamnejšiu úlohu pri transporte xenobiotík a liekov do buniek zohrávajú génové rodiny:

- *SLC21/SLCO* – kódujúce polypeptidy transportujúce organické anióny; OATP,
- *SLC22* – kódujúca transportéry organických aniónov/katiónov/karnitínu; OAT a OCT, OCTN,
- *SLC15* – kódujúca transportéry oligopeptidov spriahnutých s  $H^+$ ; PEPT a PHT.

### 2.1. POLYPEPTIDY TRANSPORTUJÚCE ORGANICKÉ ANIÓN Y (OATP)

Génová rodina *SLC21/SLCO* kóduje 11 OATP transportérov, rozdelených do šiestich podrodín (OATP1-OATP6) na základe 40% identickej aminokyselinovej sekvencie. Substrátmi OATP je široké spektrum aniónových amfipatických zlúčenín s molekulovou hmotnosťou vyššou ako 350 Da, neutrálne lineárne a cyklické peptidy. Mechanizmus transportu sprostredkovaný OATP zatiaľ nie je detailne popísaný. OATP sú schopné obojsmerného transportu a fungujú ako elektroneutrálne výmenníky. Vo všeobecnosti je známe, že je nezávislý od gradientov sodíka, chloridu, draslíka; membránového potenciálu a hladín ATP,

a je pravdepodobne sprostredkovaný kotransportom a/alebo antiportom s  $\text{HCO}_3^-$ , GSH a/alebo konjugátmi glutatiónu. Transport sprostredkovaný OATP môže byť ovplyvnený aj pH.

OATP sprostredkujú transport niektorých endogénnych zlúčenín, ako sú žľčové kyseliny, hormóny štítnej žľazy, prostaglandíny, eikozanoidy, steroidy (a ich konjugáty). OATP sa podieľajú na transporte mnohých liekov, ako sú statíny, inhibítory enzýmu konvertujúceho angiotenzín, blokátory angiotenzínových receptorov, antibiotiká, antihistaminiká a protinádorové lieky. Je zaujímavé, že substráty OATP sú často substrátmi niektorých ABC transportérov (kapitola 5) a teda efektívnosť transport substrátu je realizovaná ich vzájomnou kooperáciou. Navyše, väčšina z týchto substrátov je v pečeni metabolizovaná biotransformačnými enzýmami (ako je CYP a konjugačné enzýmy). Teda spolupráca pečenných OATP transportérov s biotransformačnými enzýmami a s ABC transportérmi umožňuje hepatobiliárnu elimináciu aniónových liekov a označuje sa ako „aliancia transportér lieku-metabolizmus“. Takáto spolupráca existuje aj v iných tkanivách, ako sú črevo a obličky.

OATP1B1 a OATP1B3 sú exprimované výlučne v pečeni a sprostredkujú špecifické vychytávanie taurocholátu, estradiol-17 $\beta$ -D-glukuronidu a estrón-3-sulfátu, ako aj niektorých liekov (prednostne statínov a brómsulfoftaleínu). Transport prostanoidov do buniek zabezpečuje OATP2A1, ktorý je exprimovaný takmer vo všetkých tkanivách. OATP4C1 je lokalizovaný v bazolaterálnej membráne buniek proximálnych tubulov obličky a zabezpečuje transport substrátov ako sú napríklad hormóny štítnej žľazy, digoxín, metotrexát atď. z krvi do obličiek. OATP sú tiež exprimované v čreve (OATP2B1), v mozgu (OATP1A2 a 2B1), v placentе (OATP2B1) a v semenníkoch (OATP6A1).

## 2.2. TRANSPORTÉRY ORGANICKÝCH ANIÓNOV (OAT)

Transportéry OAT a transportér urátov 1 (URAT1) je rodina multišpecifických transportérov, kódovaných superrodinou génov *SLC22*. Bolo identifikovaných desať OAT, ktoré sú podľa fylogenetického vzťahu rozdelené do troch vetiev (A, B a C). Vetva A pozostáva z OAT1 a OAT3; vetva B z OAT6. Vetva C zahŕňa podskupinu D (pozostávajúcu z OAT2 a OAT10), podskupinu E (pozostávajúcu z OAT5, OAT7, OAT8 a OAT9) a podskupinu F (pozostávajúcu z OAT4 a URAT1).

Najlepšie charakterizované OAT1 a OAT3 transportujú organické anióny proti negatívnemu membránovému potenciálu výmenou za 2-oxoglutarát. Gradient 2-oxoglutarátu je udržiavaný sekundárnym aktívnym transportom  $\text{Na}^+$ -dikarboxylát, ktorý využíva gradient  $\text{Na}^+$  udržiavaný pomocou  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy. OAT sa nachádzajú takmer vo všetkých epitelových

bunkách a regulujú transcelulárny transport malých organických aniónových molekúl. OAT sú schopné transportovať substráty obidvoma smermi, avšak väčšina OAT sú influxné transportéry. Najvyššia expresia OAT1, OAT3 a OAT10 je v obličkách; OAT2, OAT5 a OAT7 v pečeni. Väčšina OAT sa nachádza v bazolaterálnej membráne, ale OAT4, OAT10 a URAT1 sa nachádzajú v luminálnej membráne buniek proximálnych tubulov obličky.

OAT1 sprostredkováva transport endogénnych a exogénnych organických aniónov, ako sú 2-oxoglutarát, monokarboxyláty (napr. butyrát, laktát, propionát a pyruvát), karboxylové kyseliny s krátkym reťazcom (napr. hexanoát, heptanoát a oktanoát), prostaglandíny (PGE<sub>2</sub> a PGF<sub>2α</sub>), cyklické nukleotidy (cAMP a cGMP), uráty, folát, nikotinát atď.

OAT2 je antiportér, ktorý vymieňa intracelulárny sukcinát alebo fumarát s extracelulárnym substrátom. Endogénnymi zlúčeninami transportovanými ľudským OAT2 sú L-askorbát, glutamát, glutarát, dehydroepiandrosterónsulfát (DHEAS), estrón-3-sulfát, prostaglandíny (PGE<sub>2</sub> a PGF<sub>2α</sub>), uráty atď.

Endogénne substráty, ktoré sú transportované OAT3 zahŕňajú druhých poslov (cAMP a cGMP), žľové soli (cholát a taurocholát), hormóny (kortizol, DHEAS a estrón-3-sulfát), prostaglandíny (PGE<sub>2</sub> a PGF<sub>2α</sub>), uráty a kynurenáty. OAT3 zohráva centrálnu úlohu v transporte žľových kyselín cez os „črevo-pečeň-obličky“ a podieľa sa na absorpcii, metabolizme a vylučovaní žľových kyselín.

OAT sa podieľajú na transporte mnohých liečiv, ktorými sú nesteroidné protizápalové lieky (napr. diklofenak, ibuprofén, indometacín, ketoprofén, salicylát), antivirotiká (napr. acyklovir, adefovir, cidofovir, tenofovir, zidovudín), protinádorové lieky (napr. irinotekan, metotrexát, paklitaxel), lieky proti dne (allopurinol), antibiotiká, diuretiká (napr. bumetanid, chlórťiazid, cyklotiazid, etakrynát, furosemid, hydrochlorotiazid, torasemid, trichlórmetiazid) atď.

### **2.3. TRANSPORTÉRY ORGANICKÝCH KATIÓNOV (OCT) A TRANSPORTÉRY ORGANICKÝCH KATIÓNOV/KARNITÍNU (OCTN)**

Okrem vyššie opísaných OAT, rodina *SLC22* zahŕňa tiež transportéry organických katiónov (OCT1, OCT2 a OCT3) a elektroneutrálne transportéry organických katiónov (OCTN1, OCTN2, OCTN3 a karnitínový/katiónový transportér OCT6). Pre OCT1 a OCT2 je charakteristická 70% identická sekvencia aminokyselín a približne 50% identická sekvencia aminokyselín s OCT3. Pre OCTN1 a OCTN2 je charakteristická 77% identická sekvencia aminokyselín a približne 31-37% identická sekvencia aminokyselín s OCT1-3.

OCT1, OCT2 a OCT3 sprostredkujú uľahčenú difúziu širokého spektra organických kationov v smere klesajúceho elektrochemického gradientu. Transport prebieha v oboch smeroch, je nezávislý od sodíka alebo pH a je elektrogénny. OCT translokujú rôzne organické kationy s odlišnou štruktúrou; preto sa tiež označujú ako „polyšpecifické“ transportéry organických kationov. Je pre ne charakteristická prekrývajúca sa substrátová špecifita. Medzi ich substráty patrí napríklad tetraetylamónium, neurotoxín 1-metyl-4-fenylpyridínium, antiparkinsoniká (napr. amantadín a memantín), antidiabetiká (napr. metformín), antagonisti  $H_2$  receptorov (napr. cimetidín a ranitidín), biogénne amíny (napr. dopamín, noradrenalin a sérotonín) a niektoré endogénne zlúčeniny (napr. cholin, kreatinín a prostaglandíny).

OCTN1, OCTN2 a OCT6 sú transportéry kationov a karnitínu. Transport OCTN1 je závislý od gradientu sodíka aj protónov a transportuje acetylcholin, L-karnitín, a niektoré liečivá (napr. chinidín, pyrilamín, verapamil, ipratropium, tiotropium, mitoxantrón, doxorubicín, gabapentín). OCTN2 je polyšpecifický transportér kationov závislý alebo nezávislý od sodíka a transportuje kationy, ako je acetyl-L-karnitín, butyryl-L-karnitín, mildronát, cefaloridín, emetín, cholin atď.

Ľudské OCT1 a OCT2 sú vysoko exprimované v bazolaterálnej membráne hepatocytov a v bazolaterálnej membráne buniek proximálnych tubulov obličiek. Sú prítomné aj v ďalších tkanivách, podobne ako OCT3. OCTN1 je exprimovaný hlavne v epitelových a vo svalových bunkách, ako aj v obličkách, kostnej dreni a v priedušnici. Najvyššia expresia OCTN2 je v pečeni, obličkách, kostrovom svale, srdci a v placentе. OCTN2 je lokalizovaný v membráne kefového lemu buniek proximálnych tubulov obličiek a enterocytov. OCT6 je exprimovaný najmä v plazmatických membránach Sertoliho buniek a v lumenálnej membráne epitelových buniek nadsemenníkov. Okrem toho je exprimovaný v pečeni embrya, hematopoetických bunkách, kostrovom svalstve, obličkách, pečeni, placentе, mliečnej žľaze a v mozgu.

## 2.4. TRANSPORTÉRY OLIGOPEPTIDOV SPRIAHNUTÉ S $H^+$ (PEPT)

Peptidové transportéry PEPT1 (*SLC15A1*) a PEPT2 (*SLC15A2*) transportujú di-/tripeptidy a lieky podobné peptidom. PEPT1 je exprimovaný najmä v tenkom čreve, PEPT2 v obličkách a nie sú exprimované v hepatocytoch. Sprostredkujú protón-dependentný transport peptidergických  $\beta$ -laktámových antibiotík, inhibítorov enzýmu konvertujúceho angiotenzín, sartanov a peptidomimetík podobných di- a tripeptidom. Ide o sekundárny aktívny transport, pričom udržanie vnútrobunkového  $H^+$  gradientu si vyžaduje apikálny  $Na^+/H^+$ -výmenník v spojení s bazolaterálnou  $Na^+/K^+$ -ATPázou.



### 3. ENZÝMY I. FÁZY BIOTRANSFORMÁCIE

Reakcie I. fázy biotransformácie zahŕňajú oxidáciu, redukciu a hydrolýzu xenobiotika:

- **oxidácia** – je najbežnejším typom reakcií I. fázy biotransformácie; zahŕňa hydroxyláciu bočného reťazca; aromatickú hydroxyláciu; deamináciu; N-, O- a S-dealkyláciu; tvorbu sulfoxidov; dehydrogenáciu a deamináciu mono- a diamínov,
- **redukcia** – je pomerne zriedkavá; zahŕňa redukciu nitroskupiny, azoskupiny, terciárnych amín-N-oxidov, aldehydov, ketónov, sulfoxidov a polyhalogenidov,
- **hydrolýza** – je bežnou biotransformačnou reakciou pre estery a amidy.

Vznikajúce intermediáty následne vstupujú do reakcií II. fázy biotransformácie, kde dochádza k ich konjugácii s konjugáčnym činidlom. Nakoľko tieto intermediáty sú väčšinou reaktívnejšie ako ich materské molekuly, môže dôjsť k zvýšeniu toxicity xenobiotika. Ak je tento proces biotransformácie neefektívny, reaktívne metabolity sa môžu viazať na proteíny alebo DNA, čo vedie k cytotoxicite a/alebo vzniku mutácií. V proces biotransformácie xenobiotika sa tiež generujú reaktívne formy kyslíka [ROS; superoxidový aniónový radikál, peroxid vodíka ( $H_2O_2$ ) alebo hydroxylový radikál], ktoré sú eliminované antioxidantnými enzýmami bunky (napr. superoxidodismutázou, katalázou, glutatiónperoxidázou), čo v konečnom dôsledku vedie k vyčerpaniu antioxidantnej ochrany bunky a prispieva k zvýšeniu oxidačného stresu. Mnohé vznikajúce reaktívne medziprodukty/metabolity a ROS zohrávajú významnú úlohu v patogenéze niektorých ochorení.

Prevažná väčšina xenobiotík počas metabolizácie podlieha oxidačným reakciám. Prvú fázu biotransformácie tvorí široká skupina enzýmov (Tab. 1), pričom najbežnejšie a najvýznamnejšie z nich sú cytochróm P450 (CYP) – oxidázy so zmiešanou funkciou. Podieľajú sa na metabolizácii väčšiny xenobiotík a majú veľmi široký rozsah substrátovej špecifity.

V tejto kapitole sa budeme venovať najmä CYP, ale aj ďalším vybraným enzýmom I. fázy biotransformácie, ich subcelulárnej lokalizácii, kofaktorom, distribúcii v orgánoch, mechanizme reakcií, typickým substrátom a genetickým variáciám najmä v súvislosti s nádorovými ochoreniami.

### 3.1. CYTOCHRÓM P450

Cytochróm P450 (CYP, EC 1.14.14.1) predstavuje veľkú rodinu enzýmov, ktoré sú zodpovedné najmä za reakcie I. fázy biotransformácie. Táto rodina enzýmov je tvorená prevažne monooxygenázami, ktoré katalyzujú redukčné štiepenie molekulového kyslíka a inzerciu jedného atómu kyslíka do substrátu. Ide o evolučne veľmi staré hemoproteíny, ktoré sa vyvinuli z jedného *CYP* génu archebaktérií pred 1,5 miliardy rokov a sú prítomné od prokaryotov až po eukaryoty a človeka. Termín P450 (Pigment-450) sa používa na označenie proteínov obsahujúcich hém, pre ktoré je charakteristické absorpčné maximum pri vlnovej dĺžke 450 nm v redukovanom stave v prítomnosti oxidu uhoľnatého. Tento jav je nezvyčajný, pretože všetky ostatné známe proteíny obsahujúce hém, ako napríklad hemoglobín, absorbujú svetlo pri 420 nm.

V organizme sa CYP podieľajú na (Tab. 3):

- *metabolizácii xenobiotík, liekov* (viac ako 90%), *karcinogénov, prokarcinogénov*, ktoré môžu byť deaktivované alebo naopak môže dôjsť k ich aktivácii (najmä rodiny CYP1-CYP3),
- *metabolizme endogénnych látok* (steroidov, karboxylových kyselín, vitamínov a eikozanoidov; najmä rodiny CYP5-CYP11).

**Tabuľka 3** Ľudské CYP podieľajúce sa na metabolizácii rôznych substrátov

| Substráty                   | CYP izoenzýmy  |
|-----------------------------|--|
| <b>Xenobiotiká</b>          | 1A1, 1A2, 2A6, 2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2F1, 3A4, 3A5, 3A7   |
| <b>Steroidy</b>             | 1B1, 7A1, 7B1, 8B1, 11A1, 11B1, 11B2, 17A1, 19A1, 21A2, 27A1, 39A1, 46A1, 51A1 |
| <b>Karboxylové kyseliny</b> | 2J2, 4A11, 4B1, 4F12   |
| <b>Eikozanoidy</b>          | 4F2, 4F3, 4F8, 5A1, 8A1  |
| <b>Vitamíny</b>             | 2R1, 24A1, 26A1, 26B1, 26C1, 27B1  |
| <b>Neznáma funkcia</b>      | 2A7, 2S1, 2U1, 2W1, 3A43, 4A22, 4F11, 4F22, 4V2, 4X1, 4Z1, 20A1, 27C1          |

Keďže na biotransformácii xenobiotík a liekov sa podieľajú najmä rodiny CYP1-CYP3, ďalej v osobitných podkapitolách budú detailnejšie charakterizované iba tieto enzýmové rodiny.

### 3.1.1. Klasifikácia a charakterizácia CYP

Enzýmy CYP sa označujú písmenami „CYP“ a arabská číslica označuje rodinu CYP (napr. CYP1, CYP2, CYP3 atď.). Potom nasleduje písmeno označujúce podrodinu (napr. CYP1A) a ďalšia arabská číslica, ktorá označuje individuálny gén/izoenzým (napr. CYP1A1). CYP1A1 teda označuje rodinu CYP1, podrodinu A a proteín 1 v podrodine. Gén a cDNA sa píše kurzívou (*CYP1A1*), mRNA a proteín sú označené veľkými písmenami (CYP1A1).

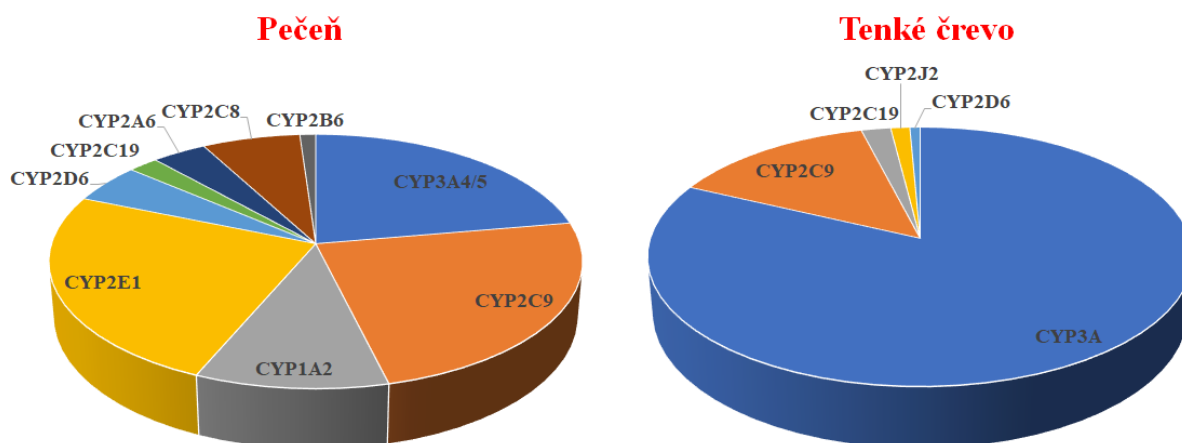
Členovia rodiny CYP sa líšia primárnou sekvenciou aminokyselín, substrátovou špecifitou, imunonologickou krížovou reaktivitou a tkanivovou distribúciou. Aminokyselinová sekvencia v rámci rovnakej rodiny vykazuje 40% homológiu, a sekvencia v rámci podrodiny viac ako 55% (napr. CYP2A6 a CYP2A7).

Superrodina CYP zahŕňa viac ako 13 000 génov reprezentujúcich viac ako 400 génových rodín (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>). U ľudí bolo popísaných 57 rôznych génov *CYP* a 58 pseudogénov. U ľudí z 18 rodín a 44 podrodín najdôležitejšiu úlohu v metabolizme xenobiôtík v pečeni zohrávajú enzýmy rodiny 1-3 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4), pričom ostatné rodiny majú dôležitú endogénnu funkciu.

CYP sa rozdeľujú do rôznych tried na základe viacerých kritérií:

- *funkcia CYP*: detoxikácii xenobiôtík a biosyntéza endogénnych zlúčenín,
- *membránovo-viazané formy* (prevažne u eukaryotov) a *rozpuštné formy* (u prokaryotov),
- *subcelulárna lokalizácia a prenos elektrónov*: eukaryotické CYP sú lokalizované prevažne v endoplazmatickom retikule (ER) a sú redukované membránovo-viazanou CYP reduktázou obsahujúcou flavínadenín dinukleotid (FAD) alebo flavínmononukleotid (FMN). Na druhej strane, prenos elektrónov u prokaryotických a mitochondriálnych CYP je sprostredkovaný rozpustným dvojzložkovým reduktázovým systémom obsahujúcim FAD a Fe-S proteín.

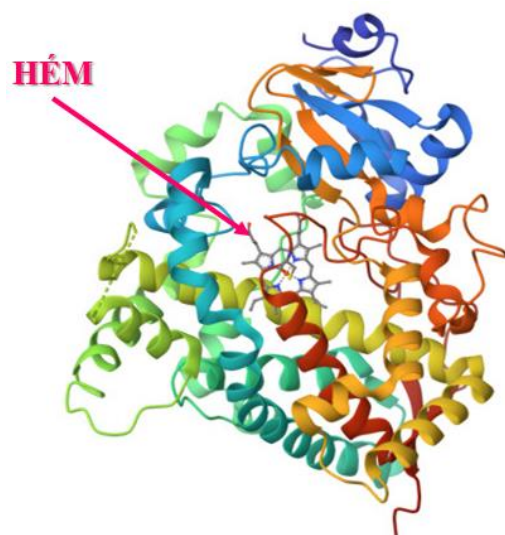
U cicavcov sú CYP prítomné takmer vo všetkých tkanivách, s najvyššími koncentráciami v pečeni a v tenkom čreve (Obr. 5). Sú tiež prítomné vo vnútornej membráne mitochondrií steroidogénnych tkanív, ako je kôra nadobličiek, semenníky, vaječníky, prsníky, placenta a podieľajú sa na syntéze a degradácii endogénnych steroidných hormónov. CYP majú špecifické funkcie v mozgu, medzi ktoré sa zaraďuje regulácia endogénnych agonistov GABA receptorov, udržiavanie homeostázy cholesterolu v mozgu a eliminácia retinoidov.



**Obrázok 5** Relatívna expresia CYP izoenzýmov v pečeni a v tenkom čreve (prevzaté z Song Y a kol. Clin Pharmacokinet. 60: 585-601, 2021)

### 3.1.2. Štruktúra CYP

V proteínovej databanke (Protein Data Bank, <http://www.wwpdb.org/>) bolo doteraz uložených 104 unikátnych štruktúr CYP. Nukleárna magnetická rezonancia (NMR), röntgenová kryštalografia spolu s počítačovým modelovaním poskytujú informácie o trojrozmernej štruktúre cicavčích CYP. Štruktúra CYP je evolučne zachovaná a značne konzervovaná. Na obrázku 6 je znázornená štruktúra ľudského CYP3A4 izoenzýmu.



**Obrázok 6** Štruktúra ľudského CYP3A4 (databanka proteínov - PDB ID: 1TQN)

CYP sú hemoproteíny obsahujúce v aktívnom centre jeden hém ako prostetickú skupinu a 400-500 aminokyselinových zvyškov. Terciárnu štruktúru CYP tvoria prevažne  $\alpha$ -helixy (A-L) s ortogonálnym usporiadaním zväzkov a štyri  $\beta$ -skladané listy. Vo všeobecnosti platí, že čím je daná štruktúra bližšie k hému, tým je viac konzervovaná, ako je to v prípade helixov I a L. Helixy F a G, F/G-slučka spolu s B/C-slučkou tvoria prístup k aktívnemu miestu CYP.

Vysoko konzervovanými časťami štruktúry CYP sú:

- klaster bohatý na prolin blízko N-konca (napr. u niektorých CYP je sekvencia PPGPXPXPXXGN vysoko konzervovaná od ľudí až po rastliny),
- slučka nasledujúca po helixe A,
- C a I skrutkovice,
- časť K helixu,
- žliabok na prenos protónov.

Aktívne miesto CYP je umiestnené hlboko v štruktúre enzýmu, a preto substrát vstupuje do aktívneho miesta kanálom spájajúcim aktívne miesto s vonkajšou časťou enzýmu. Podobne substrát opúšťa aktívne miesto tým istým alebo iným kanálom. Konzervované štruktúrne jadro CYP je tvorené štvorhelixovým zväzkom zloženým z troch paralelných helixov D, L a I a jedného antiparalelného helixu E. Hémová skupina je umiestnená medzi distálnym I helixom a proximálnym L helixom a je viazaná na susednú slučku cysteín-hém-ligand, ktorá obsahuje aminokyselinovú sekvenciu FxxGx(H/R)xCxG. Tento konzervovaný cysteín je proximálnym alebo „piatym“ ligandom pre hémové železo. Dlhý helix I tvorí stenu hémového „vrečka“ a obsahuje aminokyselinovú sekvenciu (A/G)-Gx(E/D)T, ktorá je v strede špirály. Vysoko konzervovaný treonín, ktorému predchádza kyslá aminokyselina, je umiestnený v aktívnom mieste a predpokladá sa, že sa podieľa na katalýze.

Aj keď je folding CYP vysoko konzervovaný, existuje dostatočná štruktúrna diverzita umožňujúca väzbu substrátov odlišných veľkostí na rôzne CYP. Rozpoznanie a väzba substrátu na CYP sú zabezpečené šiestimi „rozpoznávacími miestami substrátu“ (SRS, substrate recognition sites): oblasťou B' helixu (SRS1), časťou helixov F a G (SRS2 a SRS3), časťou helixu I (SRS4), spojovacou oblasťou  $\beta$ 2 helixu K (SRS6) a  $\beta$ 4 vlásenkou lemujúcou aktívne miesto CYP (SRS5). Tieto SRS predurčujú CYP substrátovú špecifitu. SRS sú považované za flexibilné proteínové oblasti a predpokladá sa, že pri katalýze sa uplatňuje mechanizmus indukovaného prispôsobenia sa.

Železo vo forme železitých iónov ( $\text{Fe}^{3+}$ ) môže existovať v dvoch spinových stavoch, v nízko-spinovom stave (LS), v ktorom je päť 3d elektrónov maximálne spárovaných, a vo

vysokospinovom stave (HS), v ktorom sa päť 3d elektrónov maximálne nespárovaných. Pomocou spektrálnych, NMR a kryštalografických údajov bolo dokázané, že v enzýme bez naviazaného substrátu molekula vody tvorí šiesty axiálny ligand  $\text{Fe}^{3+}$ , čím stabilizuje LS stav iónu. Väzbou substrátu na enzým je komplex železo-voda vytesnený z enzýmu, čím sa mení koordinačný stav  $\text{Fe}^{3+}$  zo šesťväzbového na päťväzbový, v ktorom sa  $\text{Fe}^{3+}$  pohybuje mimo roviny hému.

### 3.1.3. Katalytický cyklus CYP

Monooxygenázová reakcia katalyzovaná CYP zahŕňa inkorporáciu jedného atómu kyslíka do substrátu (RH) za vzniku oxidovaného metabolitu (ROH) a druhý atóm kyslíka sa redukuje na vodu (Obr. 7).

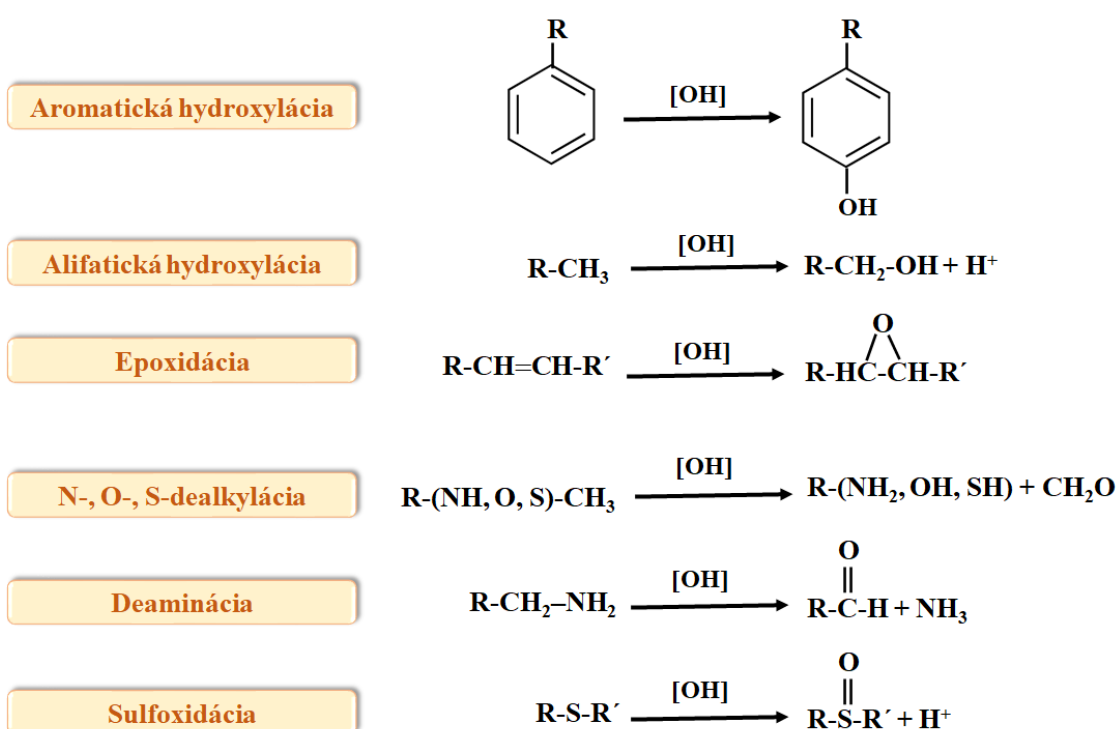


**Obrázok 7** Hydroxylácia substrátu katalyzovaná CYP

Väčšina reakcií katalyzovaných CYP je oxidácia uhlíka, pričom atómy uhlíka v organických zlúčeninách sa značne líšia svojou hybridizáciou a poskytujú rôzne oxidované medziprodukty (primárne a sekundárne alkoholy, fenoly, epoxidy). Niektoré z najbežnejších reakcií katalyzovaných CYP sú zhrnuté na obrázku 8.

Transport elektrónov je sprostredkovaný viaczložkovým monooxygenázovým systémom, v ktorom sa elektróny z redukovaného nikotínamidadenín-dinukleotidfosfátu (NADPH) prenášajú na molekulový kyslík prostredníctvom CYP. V závislosti od lokalizácie v bunke a redoxných partnerov, sa CYP vo všeobecnosti delia na dve hlavné triedy:

- *trieda I*, zahŕňa mitochondriálne a bakteriálne CYP, ktoré využívajú dvoch redoxných partnerov, a to Fe-S proteín (ferredoxín/adrenodoxín) a reduktázu obsahujúcu flavín (ferredoxín/adrenodoxín reduktázu),
- *trieda II*, sú mikrozomálne monooxygenázy, ktoré prijímajú elektróny z NADPH-cytochróm P450 oxidoreduktázy (POR). Reduktázy aj monooxygenázy sú integrálne membránové proteíny. Okrem toho, niektoré mikrozomálne CYP využívajú ako redoxného partnera cytochróm b5 (cyt b5).

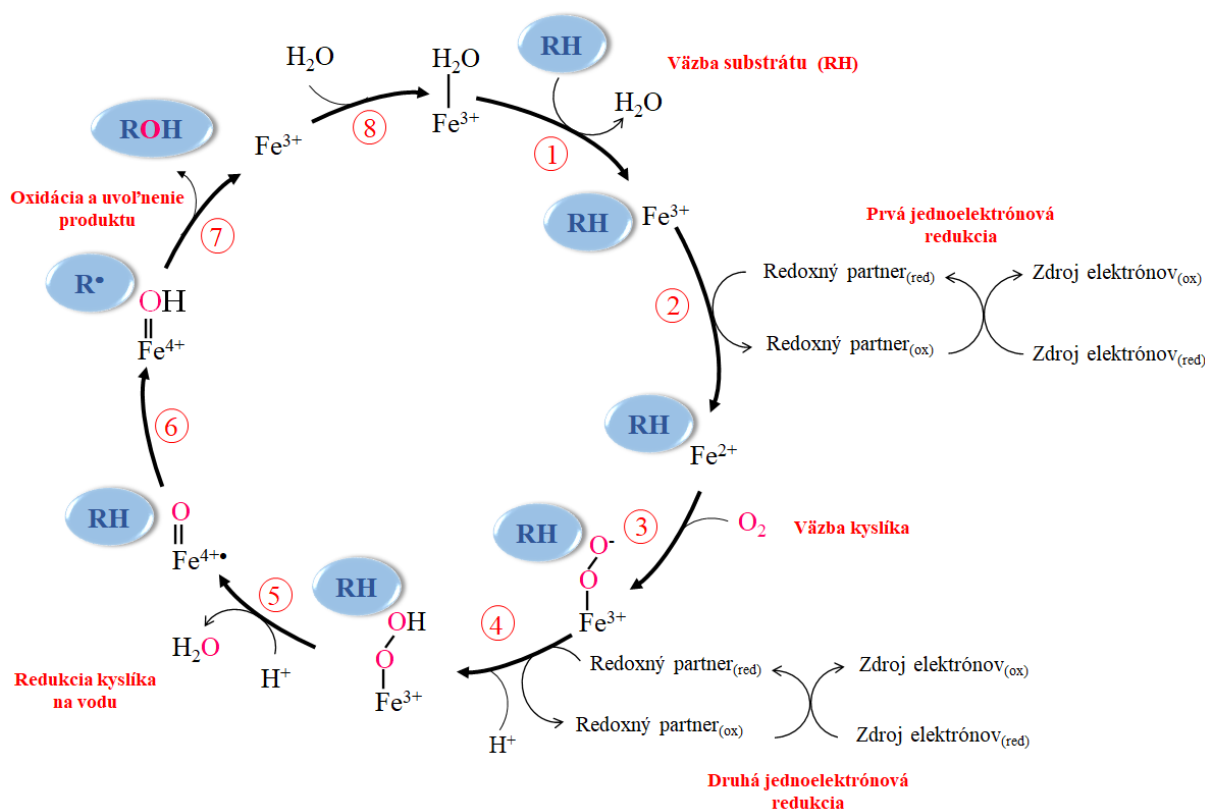


**Obrázok 8** Príklady niektorých všeobecných reakcií katalyzovaných CYP (prevzaté z Cederbaum AI. Redox Biol.4: 60-73, 2015)

Väčšina cicavčích CYP je lokalizovaných v ER. U ľudí 50 z 57 CYP sú mikrozomálne enzýmy a zvyšných sedem sa nachádza v mitochondriách. Mikrozomálne CYP používajú POR na transport elektrónov z NADPH. POR prenáša elektróny z NADPH nielen na CYP, ale aj na ďalšie mikrozomálne akceptory elektrónov, ako sú hemoxygenáza, cyt b<sub>5</sub>, skvalénmonooxygenáza a indoldioxygenáza. POR je membránovo viazaný proteín s molekulovou hmotnosťou 78 kDa. Je členom rodiny diflavínoxidoreduktáz, ktoré obsahujú jednu molekulu FAD a jednu molekulu FMN.

CYP katalytický cyklus je znázornený na obrázku 9. Pred naviazaním substrátu (RH) je aktívne miesto enzýmu obsadené vodou, ktorá sa viaže na Fe<sup>3+</sup> ión hému. Naviazaním substrátu na aktívne miesto enzýmu, dochádza k vytesneniu vody (1). Zároveň dochádza k väzbe CYP s redoxným partnerom a k zníženiu redoxného potenciálu CYP, čím sa uľahčí prenos elektrónov z reduktázy. Nastáva jednoelektrónová redukcia hémového železa z Fe<sup>3+</sup> na Fe<sup>2+</sup> (2), čím je umožnená väzba molekulového kyslíka na železo (3). V prípade, ak je redoxným partnerom POR, NADPH sa viaže na POR, pričom dochádza k vytvoreniu zatvorenej konformácie POR. V tejto zatvorenej konformácii sa uskutoční transfer elektrónov z dvojelektrónového donora NADPH na FAD, ktorý prenáša tieto dva elektróny jeden po druhom na FMN. Dochádza

k uvoľneniu  $\text{NADP}^+$  a vytvoreniu otvorenej konformácie POR. V tejto otvorenej konformácii POR preferuje vytvorenie komplexu s CYP s už naviazaným substrátom. Väzba substrátu jednak zvyšuje redoxný potenciál CYP, čím sa z termodynamického hľadiska zabezpečí prenos elektrónov a tiež zabráni neprimeranému zníženiu redoxného potenciálu CYP. Väzba substrátu na CYP môže tiež vyvolať konformačné zmeny, ktoré umožnia prenos elektrónov z FMN hydrochinónu na hémové železo CYP. Druhou jednoelektrónovou redukciou vzniká medziprodukt  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo, ktorý sa rýchlo protónuje a vzniká medziprodukt  $\text{Fe}^{3+}$ -hydroperoxo (4). Ten je následne znovu protónovaný, čo vedie k uvoľneniu vody a tvorbe vysoko reaktívneho ferryl-oxo porfyrínového radikálu (5). Tento radikál získava atóm vodíka alebo elektrón od substrátu, za vzniku radikálu substrátu a ferrylhydroxidu (6). Nasleduje rýchly prenos aktivovaného kyslíka na radikál substrátu za vzniku hydroxylovaného produktu (ROH) a jeho disociácia od enzýmu ukončuje katalytický cyklus (7). Hémové železo CYP sa vracia do stavu  $\text{Fe}^{3+}$  a môže vstúpiť do nového cyklu reakcií (8).



**Obrázok 9** Katalytický cyklus CYP (prevzaté z Behrendorff JBYH. Front Microbiol. 12: 649273, 2021)



### 3.1.4. Faktory ovplyvňujúce aktivitu CYP

Expresia a aktivita CYP sa môže značne líšiť medzi jedincami a etnickými skupinami. Interindividuálna variabilita CYP môže byť ovplyvnená faktormi, ktorými sú:

- *fyziologické faktory* – vek, pohlavie, hormóny, prostredie a génové polymorfizmy,
- *patologické stavy* – tumorigenéza, zápal, cholestáza atď.,
- *komedikácia* (indukcia a inhibícia), ktorá môže byť dôležitá pre predpovedanie toho, ako jedinec zareaguje na liečbu. Enzymy CYP môžu byť indukované alebo inhibované súbežne podávanými liekmi a cirkulujúcimi metabolitmi, čo môže viesť k liekovým interakciám (DDI, Drug-Drug Interactions) a k interakciám medzi liekmi a génmi (DDGI, Drug-Drug-Gene Interactions), nakoľko dochádza k zmene aktivity daného CYP enzýmu.

**K indukcii CYP** dochádza na transkripčnej, ako aj na netranskripčnej úrovni, ktorou je stabilizácia mRNA a enzýmu, alebo inhibícia degradácie enzýmu. Gény kódujúce CYP1-CYP3 môžu byť transkripčne aktivované xenobiotikami po ich väzbe na určité receptory. Medzi tieto receptory sa zaraďujú aryl-uhl'ovodíkový receptor (AhR, Aryl-Hydrocarbon Receptor), konštitutívny androstánový receptor (CAR, Constitutive Androstane Receptor) a pregnánový jadrový receptor (PXR, Pregnane Nuclear Receptor).

AhR patrí do rodiny Per-Arnt-Sim (PAS) transkripčných faktorov, ktoré aktivujú ľudské *CYP1A1*, *CYP1A2* a *CYP1B1*, ako aj gény kódujúce niektoré enzýmy II. fázy biotransformácie. Ligandami AhR sú PAU, halogénované aromatické uhl'ovodíky, niektoré lieky, kofeín a eikozanoidy, ktoré po väzbe aktivujú AhR. Nasleduje translokácia AhR z cytosólu do jadra, kde interaguje s jadrovým translokátorom aryl-uhl'ovodíkového receptora (ARNT). Komplex AhR-ARNT sa viaže na gény obsahujúce xenobiotikum responzívne elementy a dochádza k transkripcii týchto génov.

PXR je členom superrodiny jadrových/steroidných receptorov a je kľúčovým regulátorom najmä *CYP3A* génov. Okrem toho PXR transaktivuje gény kódujúce proteíny CYP2B a CYP2C, GST, P-glykoproteín, proteíny mnoholiekovej rezistencie (MRP, Multidrug Resistance-Associated Proteins) a OATP2. Ligandami a aktivátormi PXR sú mnohé prírodné a syntetické steroidy, steroidné hormóny, lieky, karotenoidy a xenobiotiká. PXR tvorí heterodimér s retinoid X receptorom a tento komplex sa viaže v jadre na regulačné sekvencie v promótorových oblastiach cieľových génov. Na regulácii aktivity PXR sa podieľa niekoľko mechanizmov, medzi ktoré sa zaraďuje posttranskripčná regulácia prostredníctvom mikroRNA

a posttranslačné modifikácie, ako je fosforylácia, acetylácia, SUMOylácia a ubikvitinácia, ktoré by mohli významným spôsobom ovplyvniť biotransformáciu sprostredkovanú CYP.

CAR je jadrový receptor, ktorý je konštitutívne aktívny aj bez ligandu. Je exprimovaný najmä v pečeni a sprostredkováva indukciu génov *CYP2B* fenobarbitalom a jemu podobnými lipofilnými zlúčeninami. Okrem toho CAR reguluje tiež aktivitu *CYP3A4*, *CYP2C8*, *CYP2C9*, ako aj *SULT*, *UGT* a *GST*. Podobne ako *PXR*, aj *CAR* tvorí heterodimér s retinoid X receptorom a tento komplex sa v jadre viaže na regulačné sekvencie v promótorových oblastiach cieľových génov.

CYP sú tiež indukované aj ďalšími transkripčnými faktormi, ako je napríklad farnezoid X receptor (*FXR*), receptormi aktivovanými proliferátormi peroxizómov (*PPAR*), pečňovým X receptorom (*LXR*), glukokortikoidovým receptorom (*GR*) atď.

**Inhibícia CYP** je vo všeobecnosti bežnejšia ako indukcia. Považuje sa za hlavný mechanizmus vedúci k liekovej interakcii a zvyčajne zahŕňa kompetíciu liekov o väzbové miesto CYP. Inhibícia CYP môže narušiť biotransformáciu alebo klírens liekov, čo môže viesť k vyšším plazmatickým koncentráciám lieku, k ovplyvneniu terapeutickej odpovede a k zvýšeniu nežiaducich vedľajších účinkov liekov. Medziprodukty vznikajúce metabolizáciou liekov katalyzovanou CYP môžu tiež vyvolávať inhibíciu CYP. Tento typ inhibície sa tiež označuje ako inhibícia „samovražedná“, „časovo-závislá“ alebo „závislá od katalýzy“. K inaktivácii CYP dochádza vytvorením kovalentnej väzby medzi inaktívatorom a apoproteínom; alkyláciou, aryláciou alebo deštrukciou hémovej skupiny; čo vedie ku kovalentnej modifikácii apoproteínu.

### 3.1.5. Rodina CYP1

CYP1 rodinu tvoria tri izoenzy my *CYP1A1*, *CYP1A2* a *CYP1B1*. U ľudí sú gény kódujúce *CYP1A1* a *CYP1A2* lokalizované na chromozóme 15q24.1 spôsobom hlava k hlave. Fylogenetická analýza *CYP1A* génu poukázala na to, že gén *CYP1A2* mohol vzniknúť z *CYP1A1*, nakoľko majú 5'-susediacu oblasť, ktorá obsahuje obojsmerný promótor a responzívne elementy, ktoré regulujú expresiu *CYP1A1* aj *CYP1A2*. Gén pre *CYP1B1* je lokalizovaný na chromozóme 2p21-22.

Ľudský *CYP1A1* je exprimovaný hlavne v extrahepatálnych tkanivách, ako sú pľúca, pankreas, týmus, maternica, placenta, tenké črevo a lymfocyty. *CYP1A2* je exprimovaný najmä v pečeni a tvorí 13-15% všetkých hepatálnych CYP. *CYP1B1* je exprimovaný najmä v

extrahepatálnych tkanivách, ako je prostata, prsník a maternica. CYP1A2 sa vyznačuje 80% identickou aminokyselinovou sekvenciou a 74% identickou sekvenciou DNA s CYP1A1 a približne 40% s CYP1B1.

Reakcie katalyzované CYP1A zahŕňajú hydroxyláciu a oxidáciu aromatických zlúčenín. CYP1A1 sa podieľa na metabolizácii environmentálnych prokarcinogénov, ako sú PAU a halogénované aromatické uhľovodíky. CYP1A2 metabolizuje najmä aromatické amíny a heterocyklické zlúčeniny. Oxidácia PAU a heterocyklických aromatických amínov/amidov vedie k zvýšenej tvorbe arénoxidov, dilepoxidov a ďalších reaktívnych elektrofilných zlúčenín, ktoré sú schopné vytvárať adukty s DNA a proteínmi, čo môže viesť k tumorigénze a orgánovej toxicite. Induktory CYP1A1/A2 môžu potenciálne zvýšiť toxicitu prokarcinogénov prostredníctvom zvýšenia ich bioaktivity za vzniku toxických metabolitov. CYP1A sa tiež podieľajú na metabolizácii asi 9% liekov, ako sú analgetiká, antipyretiká, antipsychotiká, antidepresíva a protizápalové lieky. CYP1B1 sa tiež podieľa na metabolizácii širokého spektra xenobiotík a vykazuje určité prekrývajúce sa metabolické účinky s CYP1A1 a CYP1A2.

Enzýmy CYP1 rodiny sa podieľajú na biotransformácii mnohých endogénnych zlúčenín, ako sú melatonín, retinol, kyselina linolová, fosfatidylcholín, uroporfyrinogén, pregnenolón a progesterón, estradiol a estrón, dehydroepiandrosterón a testosterón. CYP1 katalyzujú NADPH-dependentnú oxidáciu estrogénu, čo vedie k produkcii hydroxylovaných metabolitov estrogénu, ktoré zohrávajú kritickú úlohu v patogenéze niektorých ochorení, najmä karcinómu prsníka. CYP1A1 a CYP1A2 katalyzujú preferenčne C-2 hydroxyláciu estrogénu a menej C-4. Pre CYP1B1 pri metabolizácii estrogénu je charakteristická C-4 hydroxylačná aktivita.

### **3.1.6. Rodina CYP2**

CYP2 predstavuje najväčšiu rodinu CYP a tvorí ju viac ako 30% všetkých ľudských CYP izoenzýmov. CYP2 izoenzýmy sú kódované 16 génmi, pričom každý z nich obsahuje deväť exónov a osem intrónov. Gény sú rozptýlené na rôznych chromozómoch a sú organizované v génových klastroch. Tri najväčšie génové klastre sú CYP2ABFGST klaster na chromozóme 19q13.2, ktorý obsahuje gény *CYP2A6* a *CYP2B6*; CYP2C klaster na chromozóme 10q23.33 s génmi *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19* a klaster CYP2D na chromozóme 22q13.1-2 s jediným funkčným génom *CYP2D6*.

### Podrodina CYP2A

U ľudí tvoria CYP2A podrodinu tri gény *CYP2A6*, *CYP2A7*, *CYP2A13* a pseudogén *CYP2A18P*. Tieto gény sa nachádzajú na 370 kb génovom klastri chromozómu 19q13.2, ktorý tiež obsahuje gény a pseudogény podrodín *CYP2B*, *CYP2F*, *CYP2G*, *CYP2S* a *CYP2T*. Funkčné sú iba *CYP2A6*, *CYP2A13* a *CYP2A7* kóduje nefunkčný proteín.

CYP2A6 (označovaný tiež ako IIA3 a 2A3) bol purifikovaný z mikrozómov ľudských hepatocytov. Okrem pečene je CYP2A6 exprimovaný v nosovej sliznici, priedušnici, pľúcach a sliznici pažeráka. Najcharakteristickejšou a najšpecifickejšou reakciou CYP2A6 je 7-hydroxylácia kumarínu, ktorá sa využíva ako *in vivo* diagnostický test. CYP2A6 sa podieľa na metabolizácii širokého spektra liekov, karcinogénov a xenobiotík, vrátane nikotínu. Nikotín, psychoaktívna zložka cigaretového dymu, je primárne metabolizovaný hepatálnym CYP2A6 (70-80%) a tiež hlavný metabolit nikotínu, kotinín, sa metabolizuje výlučne prostredníctvom CYP2A6 na trans-3'-hydroxykotinín (kapitola 6.2). Pomer týchto metabolitov nikotínu trans-3'-hydroxykotinín/kotinín je stabilný u fajčiarov a slúži na stanovenie aktivity tohto izoenzýmu. CYP2A6 sa podieľa na bioaktivácii prolieku tegafuru na 5-fluorouracil, 7-hydroxylácii efavirenzu, biotransformácii inhibítora aromatázy letrozolu, disulfiramu, fadrozolu, halotanu atď. Endogénnym substrátom CYP2A6 je bilirubín.

Aktivita CYP2A6 môže byť indukovaná a inhibovaná liekmi, endogénnymi zlúčeninami a zložkami potravy. Induktormi CYP2A6 sú napríklad fenobarbital, dexametazón a rifampín, pričom pravdepodobne zvyšujú transkripciu *CYP2A6* génu. Zistilo sa, že aktivita CYP2A6 je vyššia u žien ako u mužov. Je to z dôvodu pôsobenia estrogénov, ktoré po väzbe na estrogénové receptory a translokácii do jadra indukujú transkripciu *CYP2A6* génu. Niektoré lieky (napr. 8-metoxypsoralen, selegilín) a endogénne látky (napr. tryptamín, dopamín a sérotonín) inhibujú CYP2A6. Podobne, niektoré látky prítomné v potravinách, ako je mentol, kyselina káвовá, kyselina p-kumarová, kvercetín, grapefruitová šťava atď. inhibujú CYP2A6.

O katalytickej aktivite CYP2A7 je veľmi málo informácií o katalytickej aktivite tohto enzýmu. CYP2A13 sa vyznačuje 94% identickou sekvenciou aminokyselín a podobnou substrátovou špecifitou (metabolizácia kumarínu a nikotínu) ako CYP2A6. Je exprimovaný najmä v nosovej sliznici, priedušnici, pľúcach, a v pečeni (približne len 1% z hladiny detegovanej v nosovej sliznici). Ukázalo sa, že CYP2A13 je najúčinnnejším aktivátorom v tabaku prítomných prokarcinogénnych nitrozamínov, ako napríklad 4-(metylnitrozamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanónu. Ďalšími substrátmi CYP2A13 sú aflatoxín B1, fenacetín, teofylín, 4-aminobifenyl atď. Okrem toho sa CYP2A13 podieľa na aktivácii značného množstva PAU (a ich dihydrodiol derivátov), arylamínov a heterocyklických amínov.

### *Podrodina CYP2B*

Úloha podrodiny CYP2B pri metabolizácii xenobiotík je v porovnaní s ostatnými rodinami menej významná. U ľudí tvorí CYP2B6 približne 2-5% hepatálnych CYP a je preň charakteristická približne 300-násobná variabilita expresie. V pečeni plodu sa zistila veľmi nízka, resp. nedetegovateľná expresia CYP2B6, ale počas prvého mesiaca života sa zvyšuje približne na 2-násobok. Nízka expresia CYP2B6 sa zistila v mozgu, obličkách, srdci, placentе a v dýchacích cestách. Niektoré štúdie potvrdili rozdiely v expresii CYP2B6 vzhľadom na pohlavie a etnicitu. Substrátmi CYP2B6 sú liečivá (napr. bupropión, efavirenz, cyklofosamid, ifosamid), ako aj environmentálne xenobiotiká a to najmä pesticídy (napr. chlorpyrifos).

### *Podrodina CYP2C*

Podrodina CYP2C pozostáva u ľudí zo štyroch vysoko-homológnych génov lokalizovaných na chromozóme 10q23.3, a to od centroméry po teloméru v poradí *CYP2C18-CYP2C19-CYP2C9-CYP2C8*. Sú exprimované najmä v pečeni ( $CYP2C9 > CYP2C8 > CYP2C19$ ), pričom tvoria približne 20% hepatálnych CYP. Výnimkou je CYP2C18, ktorý je exprimovaný na úrovni mRNA, ale nie na úrovni proteínu. Expresia CYP2C9 je porovnateľná s expresiou CYP3A4, a expresia CYP2C8 a CYP2C19 je 2-10-násobne nižšia v porovnaní s CYP2C9. CYP2C sú exprimované v menšej miere aj v ďalších tkanivách ako sú obličky, črevá, mozog, srdce, aorta a pľúca.

Enzýmy podrodiny CYP2C sa podieľajú na metabolizácii viac ako 20% liekov. Najvýznamnejší z nich, CYP2C9 sa podieľa na metabolizácii širokého spektra liečiv ako sú warfarín, fenytoín, kyselina valproová, kandesartan, losartan, perorálne antidiabetiká, väčšina nesteroidných protizápalových liekov atď. Bežne používané substráty na fenotypizáciu CYP2C9 sú diklofenak a tolbutamid. Izoenzým CYP2C9 sa tiež podieľa na metabolizácii endogénnych látok, a to najmä kyseliny arachidónovej, kyseliny linolovej a niektorých steroidov. Jeho induktorom je rifampicin a inhibítormi amiodarón, flukonazol, sulfafenazol a ďalšie.

CYP2C8 enzým je odlišný od ostatných členov CYP2C podrodiny, nakoľko má netypicky veľké aktívne miesto, ktoré dokáže rozpoznať rôzne zlúčeniny ako substráty. Význam CYP2C8 pri metabolizácii liečiv je nižší ako v prípade CYP2C9 alebo CYP2C19. Podieľa sa na metabolizácii antidiabetík (napr. rosiglitazónu a pioglitazónu), antiarytmika amiodarónu, protinádorového lieku paklitaxelu a antimalarika amodiachínu, ktorý sa tiež používa ako selektívny marker pre stanovenie CYP2C8 enzýmovej aktivity. CYP2C8 tiež metabolizuje endogénne zlúčeniny, ako napríklad retinoidy a kyselinu arachidónovú.

CYP2C19 je zodpovedný za metabolizáciu približne 10% liečiv, ktorými sú napríklad inhibítory protónovej pumpy, antidepresíva (napr. imipramín, amitriptylín, sertralín, fluoxetín, citalopram), antikonvulzíva (napr. fenytoín, S-mefenytoín), hypnotiká a sedatíva (napr. diazepam, flunitrazepam, klobazam, fenobarbital), antimalariká (napr. proguanil) atď. Endogénnymi substrátmi CYP2C19 sú farneazol, melatonín a estrogény. CYP2C19 je indukovateľný niektorými liečivami, ako sú rifampicín, dexametazón, fenobarbital a inhibovaný napríklad omeprazolom, grapefruitovým džúsom atď.

Enzymy CYP2C rodiny vykazujú prekrývajúcu sa substrátovú špecifitu. Napríklad stereoizoméry warfarínu sú metabolizované rôznymi CYP2C enzýmami, a to konkrétne CYP2C9 aj CYP2C19. CYP2C9 je stereoselektívny pre S-enantiomér warfarínu, zatiaľ čo CYP2C19 pre R-enantiomér. Podobne aj niektoré lieky metabolizované CYP2C8 sú substrátmi iných CYP enzýmov. Približne 75% z nich je metabolizovaných CYP3A4, 30% CYP2C9 pričom vznikajú rôzne produkty. Napríklad CYP2C8 metabolizuje paklitaxel na 6 $\alpha$ -hydroxypaklitaxel, zatiaľ čo CYP3A4 vytvára 3'-hydroxypaklitaxel. Vysvetlením pre vznik rôznych metabolitov, by mohlo byť to, že obidva tieto enzýmy majú rovnako veľké aktívne miesta, ktoré sa však líšia štruktúrou.

### *Podrodina CYP2D*

Lokus CYP2D je lokalizovaný na chromozóme 22q13, pozostáva z deviatich exónov s otvoreným čítacím rámcom a obsahuje jediný aktívny gén *CYP2D6* a dva pseudogény (*CYP2D7* a *CYP2D8*). CYP2D6 sa v pečeni podieľa na biotransformácii psychotropných liekov a steroidov a v mozgu zohráva kľúčovú úlohu v metabolizme endogénnych substrátov (neurosteroidov, neurotransmitterov), liekov a toxínov. Okrem týchto tkanív je CYP2D6 exprimovaný aj v ďalších tkanivách, ako sú črevo, pľúca a lymfoidné bunky. Aj keď CYP2D6 tvorí len 2-4% hepatálnych CYP, podieľa sa na metabolizácii približne 20% liečiv, ktorými sú niektoré analgetiká (napr. kodeín, tramadol), antidepresíva (napr. paroxetín, tricyklické antidepresíva), antihypertenzíva (napr. metoprolol, bisoprolol) a protinádorové lieky (napr. tamoxifén).

Animálne štúdie poukázali na to, že mozgové izoenzýmy CYP2D katalyzujú metabolizmus endogénnych neuroaktívnych substrátov, napr. 21-hydroxyláciu neurosteroidov a tvorbu monoaminergných neurotransmitterov prostredníctvom alternatívnych dráh. Mozgové CYP2D katalyzujú alternatívnu cestu syntézy dopamínu prostredníctvom hydroxylácie tyramínu a tvorbu sérotonínu, ktorá prebieha O-demetyláciou 5-metoxytryptamínu.

### *Podrodina CYP2E*

Podrodinu CYP2E tvorí jediný gén *CYP2E1*, ktorý je lokalizovaný na chromozóme 10q26.3 a obsahuje deväť exónov a osem intrónov. Vo vysokých hladinách je CYP2E1 prítomný v pečeni (hepatocytoch a Kupfferových bunkách), pomerne vysoké hladiny boli detegované v srdcovom tkanive a nižšie hladiny v mozgu, nosovej sliznici, kôre obličiek, semenníkoch, vaječníkoch a v GIT. Je prítomný najmä v ER, ale bolo dokázané, že je tiež prítomný v plazmatickej membráne a v mitochondriách hepatocytov.

Substrátmi CYP2E1 sú molekuly s nízkou molekulovou hmotnosťou, ako je etanol, acetón, halotan, chlórzoazón a acetaminofén; priemyselné chemikálie; toxické látky a prokarcinogény (napr. nitrozamíny, azoslúčeniny, benzén, styren, vinylchlorid, vinylbromid, akrylonitril, vinylkarbamát, etylkarbamát). Endogénnymi substrátmi CYP2E1 sú acetón, acetol, steroidy, polynenasýtené karboxylové kyseliny, ako sú kyselina linolová a kyselina arachidónová, ktoré sú metabolizované na  $\omega$ -hydroxylované karboxylové kyseliny.

Hlavným enzýmom podieľajúcim sa na oxidácii etanolu na acetaldehyd je alkoholdehydrogenáza. Pri zvýšenom príjme alkoholu, respektíve u jedincov s nízkou aktivitou alkoholdehydrogenázy, sa na metabolizácii etanolu a iných alkoholov s krátkym reťazcom podieľa tiež CYP2E1 (Obr. 12). Hypotéza, že etanol by mohol byť substrátom CYP nebola ľahko akceptovaná z dôvodu hydrofilnej povahy etanolu, avšak Lieber a kol. (1970) podali dôkaz o priebehu reakcie v pečeni potkana. CYP2E1 má relatívne vysokú hodnotu  $K_m$  pre etanol (8-10 mmol/l vs. 0,2-2 mmol/l pre pečennú alkoholdehydrogenázu), ide o minoritnú cestu oxidácie etanolu a pravdepodobne predstavuje <10% schopnosti pečene oxidovať etanol. CYP2E1 katalyzuje dvojelektrónovú oxidáciu etanolu na acetaldehyd. Je zaujímavé, že acetaldehyd je tiež substrátom CYP2E1 a je oxidovaný na acetát; teda CYP2E1 môže, aspoň teoreticky, katalyzovať oxidáciu etanolu na acetát. CYP2E1 môže tiež katalyzovať jedoelektrónovú oxidáciu etanolu na 1-hydroxyetylový radikál.

Etanol indukuje CYP2E1, t.j. je substrátom CYP2E1 a zároveň zvyšuje hladiny tohto enzýmu v hepatocytoch. Etanol môže byť oxidovaný aj inými CYP okrem CYP2E1, a to najmä CYP3A a CYP1A, pričom tiež dochádza k ich indukcii prostredníctvom etanolu. K indukcii CYP2E1 môže dochádzať tiež pri rôznych metabolických alebo nutričných stavoch. Zvýšené hladiny CYP2E1 boli zistené pri chronickej obezite, pri príjme potravy s vysokým obsahom tukov, pri diabetes mellitus, ale paradoxne aj pri dlhodobom hladovaní.

Počas katalytického cyklu CYP2E1 sa produkuje zvýšené množstvo ROS, a to najmä superoxidový aniónový radikál a  $H_2O_2$ . Tieto ROS môžu iniciovať lipoperoxidáciu nenasýtených karboxylových kyselín, čo vedie k tvorbe vysoko reaktívnych aldehydov, ako je

malondialdehyd a 4-hydroxy-2-nonenal. ROS môžu tiež oxidačne poškodzovať nukleové kyseliny a proteíny, čo vedie k permeabilizácii mitochondriálnej membrány a k iniciácii bunkovej smrti. Preto sa predpokladá, že CYP2E1 je hlavným systémom prispievajúcim k etanolom-indukovanému oxidačnému stresu a etanolom-indukovanému poškodeniu pečene. Zvýšené hladiny hepatálneho CYP2E1 sa zistili u pacientov s nealkoholickou steatohepatitídou (NASH), ktorá je v súčasnosti považovaná za najčastejšie chronické a progresívne ochorenie pečene, pri ktorom dochádza k akumulácii tukov v bunkách pečene, ktoré presahuje 5-10% hmotnosti pečene pacientov s nízkou konzumáciou alkoholu (<20 g etanolu/deň). Selektívne inhibítory CYP2E1 4-metyl-pyrazol, dialylsulfid (prítomný v cesnaku), fenyliizotiokyanát, chlórmetiazol a ďalšie napomáhajú minimalizovať hepatotoxicitu vyvolanú etanolom.

### 3.1.7. Rodina CYP3

CYP3 rodinu tvorí jediná podrodina CYP3A, ktorá obsahuje štyri gény *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* a *CYP3A43* kódujúce funkčné proteíny. Táto podrodina je kódovaná 231 kbp klastrom štyroch génov *CYP3A* na chromozóme 7q21 a niekoľkými pseudogénmi. Každý gén obsahuje trinásť exónov so zachovanými hranicami exón-intrón. CYP3A enzýmy sú vysoko exprimované v pečeni (40%) a podieľajú sa na metabolizácii viac ako 50% liekov a na biotransformácii karcinogénov (napr. benzo[a]pyrénu, 7,8-dihydrodiolu, aflatoxínu B1). Z nich sa na metabolizácii liekov u ľudí podieľa najmä CYP3A4 a CYP3A5.

Prevládajúcim izoenzýmom CYP3A v pečeni a v čreve je CYP3A4, ktorý vykazuje desať až stonásobné interindividuálne rozdiely v expresii mRNA a proteínov v pečeni u dospelých jedincov. Je exprimovaný aj v iných tkanivách, ako je pažerák, dvanástnik a hrubé črevo. CYP3A5 je exprimovaný v obličkách, črevách, nadobličkách, pečeni, prostate a v pľúcach. Expresia CYP3A7 a CYP3A43 je v pečeni u ľudí približne 15-krát nižšia v porovnaní s CYP3A4/5. CYP3A7 je prevažne fetoplacentárny enzým, je vysoko exprimovaný v pečeni a črevách embrya a plodu, ako aj v endometriu a v placente, a je detegovateľný v pečeni a v tenkom čreve niektorých dospelých. CYP3A43 je vysoko exprimovaný v prostate a v mozgu, menej v semenníkoch, pečeni, obličkách, placente a v pankrease.

Substrátmi CYP3A sú štruktúrne rôznorodé látky, rôznej veľkosti a afinity. Typické reakcie katalyzované CYP3A4 sú N-oxidácia, C-oxidácia, N-dealkylácia, O-dealkylácia, nitroredukcia, dehydratácia a C-hydroxylácia. Medzi liečivá, ktoré sú metabolizované CYP3A izoenzýmami patria analgetiká (napr. acetaminofén, lidokaín), anestetické opioidy (napr. alfentanil), antiarytmiká (napr. amiodarón, chinidín), antibiotiká (napr. erytromycín), protinádorové lieky



(napr. cyklofosfamid, epipodofylotoxíny, ifosfamid, toremifén, vinkristín, vinblastín, vindezín, paklitaxel, docetaxel, kabazitaxel), antikonvulzíva (napr. klonazepam, trimetadion, zonisamid), antidepresíva (napr. sirolimus, imipramín), antiepileptiká (napr. karbamazepín, fenobarbital), antihistaminiká (napr. fexofenadín, terfenadín), antihypertenzíva (napr. nifedipín), antitusiká (napr. dextrometorfán, kodeín), azolové antimykotiká (napr. flukonazol, itrakonazol, ketokonazol), imunosupresíva (napr. takrolimus, rapamycín, cyklosporín, FK506), blokátory vápnikových kanálov (napr. diltiazem), lieky na zníženie hladiny cholesterolu v krvi (napr. statíny), narkotiká (napr. kokáin), nesteroidné antiandrogény (napr. flutamid), nesteroidné antiestrogény (napr. tamoxifén), antiretrovirotiká (napr. amprenavir, ritonavir), psychoaktívne lieky (napr. benzodiazepín, midazolam), steroidy (napr. estradiol, testosterón, hydrokortizón) a inhibítory tyrozínkinázy (napr. lapatinib, dasatinib, erlotinib, imatinib).

Enzýmy CYP3A podrodiny sa tiež podieľajú na metabolizácii niektorých endogénnych substrátov, ako sú hormóny, cholesterol, žľčové kyseliny, kyselina arachidonová a vitamín D. Cholesterol je metabolizovaný na 4 $\beta$ -hydroxycholesterol a na 25-hydroxycholesterol prostredníctvom CYP3A4 a CYP3A5. Enzýmy CYP3A sa podieľajú na biotransformácii žľcových kyselín. 25-hydroxylácia 5 $\beta$ -cholestan-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triolu, ktorý je medziproduktom biosyntézy kyseliny cholovej, je katalyzovaná CYP3A4 a CYP3A5. Podrodina CYP3A hrá dôležitú úlohu v metabolizme androgénov (testosterón, androstendión, dehydroepiandrosterón a dihydrotestosterón), progesterónu a kortizolu, prostredníctvom 6 $\beta$ -hydroxylačnej reakcie, ktorá je jedinečná pre túto podrodinu CYP. Najvyššiu 6 $\beta$ -hydroxylačnú aktivitu má CYP3A4, po ktorom nasleduje CYP3A5 a CYP3A7. 2 $\beta$ -, 15 $\beta$ - a 16 $\beta$ -hydroxylácia testosterónu je sprostredkovaná CYP3A4. Tvorba 6 $\beta$ - a 2 $\beta$ -hydroxytestosterónu je katalyzovaná CYP3A5 a CYP3A7, zatiaľ čo tvorba 2 $\alpha$ -hydroxytestosterónu je katalyzovaná iba CYP3A7. Estradiol je metabolizovaný prostredníctvom CYP3A4 na 2-, 4- a 16 $\beta$ -hydroxylačné produkty. Vznik 2- a 4-hydroxylovaných estradiolových metabolitov je tiež v menšej miere katalyzovaný prostredníctvom CYP3A5 a CYP3A7. CYP3A4 katalyzuje 24- a 25-hydroxyláciu vitamínu D<sub>3</sub> a CYP3A5 katalyzuje 23- alebo 24-hydroxyláciu 1,25-dihydroxycholecalciferolu.

Expresia enzýmov CYP3A je regulovaná rôznymi exogénnymi (lieky, chemikálie a strava) a endogénnymi (karboxylové kyseliny, hormóny, cytokíny a mikroRNA) faktormi. Aktivitu CYP3A enzýmov môžu ovplyvniť antropogénne environmentálne chemikálie, ako sú organofosfáty, karbamáty, parabény, benzotriazolové UV stabilizátory a zmäkčovadlá. Prírodné zlúčeniny prítomné v potravinách, ako napríklad flavonoidy nachádzajúce sa v ovoci a zelenine, káve, čaji, čokoláde a víne, môžu meniť expresiu CYP3A enzýmov. Bazálna expresia CYP3A génov môže byť tiež ovplyvnená stravou s vysokým obsahom tukov.

Mnohé dôležité lieky sú induktormi alebo inhibítormi CYP3A. Súbežné podávanie týchto liekov spolu so substrátom CYP3A môže viesť k zmene účinnosti lieku, vyvolať nepriaznivé a dlhotrvajúce liekové interakcie a toxicitu. Existujú dve kategórie inhibítorov CYP3A – chemické inhibítory a monoklonálne protilátky proti CYP3A. Tieto inhibítory sú veľmi užitočné pri objasňovaní úlohy jednotlivých CYP3A v metabolizme liekov a pri predpovedaní potenciálnych liekových interakcií. V dôsledku atypického charakteru aktívnych miest CYP3A môže ten istý inhibítor spôsobiť rôzne typy inhibícií voči rôznym substrátom. Silnými inhibítormi CYP3A enzýmov sú antimykotiká (napr. itrakonazol, ketokonazol a vorikonazol), protinádorové lieky (napr. ceritinib, idelalisib, ribociclib a tucatinib), makrolidové antibiotiká (napr. klaritromycín a telitromycín), antivirotiká (používané na liečbu HIV, napr. indinavir, nelfinavir, ritonavir a sakvinavir), antidepresíva (napr. nefazodón) atď.

Indukcia CYP3A je závislá od času pôsobenia a aj od koncentrácie induktora a spôsobuje významný pokles farmakologickej účinnosti rôznych liekov. Lieky indukujúce CYP3A možno rozdeliť do piatich tried:

- archetypické induktory podobné fenobarbitalu (napr. fenytoín),
- induktory podobné PAU (napr. cigaretový dym a omeprazol),
- induktory typu pregnenolón 16 $\alpha$ -karbonitril a glukokortikoidy (napr. dexametazón, rifampín a erytromycín),
- induktory podobné etanolu (napr. izoazid),
- induktory typu peroxizómových proliferátorov (napr. klofibrát a ftaláty používané v zmäkčovadlách).

V zásade existujú tri hlavné mechanizmy indukcie CYP3A, a to prostredníctvom zvýšenia génovej expresie (napr. dexametazón a rifampicín), prostredníctvom stabilizácie mRNA molekuly (napr. erytromycín) a znížením degradácie proteínu (napr. posttranslačnou stabilizáciou).

### **3.1.8. Génové polymorfizmy CYP enzýmov metabolizujúcich lieky**

Väčšina génov kódujúcich CYP enzýmy je polymorfná, varianty alel sú zosumarizované a popísané na stránke konzorcia pre nomenklatúru ľudských CYP alel ([www.cypalleles.ki.se](http://www.cypalleles.ki.se)). Najčastejšie sa vyskytujúca alela pre každý enzým (divý typ, wild type) sa označuje \*1. Alelické varianty sa označujú podľa ich následnej identifikácie (napr. \*2, \*3). Niektoré z týchto

SNP môžu meniť funkciu CYP enzýmov, avšak mnohé SNP sú „tiché“ a nemajú vplyv na funkciu daných enzýmov.

CYP enzýmy podieľajúce sa na metabolizácii xenobiotík a liekov sa rozdeľujú do dvoch tried na základe génových polymorfizmov:

- *trieda I* – zložená z CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1 a CYP3A4, ktoré sú dobre konzervované, nemajú významné funkčné polymorfizmy a sú aktívne v metabolizácii prokarcinogénov a liekov,
- *trieda II* – zložená z CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6, ktoré sú vysoko polymorfné a aktívne v metabolizácii liekov, nie však prokarcinogénov.

Najviac polymorfizmov bolo doteraz charakterizovaných pre *CYP2B6* (48 alel), *CYP2C9* (32 alel), *CYP2D6* (92 alel) a *CYP3A4* (34 alel). Väčšina funkčných polymorfizmov bola popísaná v génoch kódujúcich *CYP2A6*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* a *CYP2D6*, pričom najviac študovanými sú SNP génov kódujúcich *CYP2C9*, *CYP2C19* a *CYP2D6* (Tab. 4).

**Tabuľka 4** Génové polymorfizmy vybraných ľudských CYP

|                | Alela  | Nukleotidová<br>zámena | Variant proteínu       | Aktivita enzýmu                       |
|----------------|--------|------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| <b>CYP2C9</b>  | *1     | Divý typ               | —                      | Normálna                              |
|                | *2     | 430C>T                 | R144C                  | Znížená                               |
|                | *3     | 1075A>C                | I359L                  | Znížená                               |
| <b>CYP2C19</b> | *1     | Divý typ               | -                      | Normálna                              |
|                | *2     | 681G>A                 | Defektný zostrih       | Inaktívny enzým                       |
|                | *3     | 636G>A                 | Stop kodón             | Inaktívny enzým                       |
| <b>CYP2D6</b>  | *1     | Divý typ               | —                      | Normálna                              |
|                | *2 × N | Multiplikácia génu     | N aktívne gény         | Zvýšená                               |
|                | *3     | 2549A>del (2637)       | Posun čítacieho rámca  | Inaktívny enzým                       |
|                | *4     | 1846G>A                | Defektný zostrih       | Inaktívny enzým                       |
|                | *5     | Delécia génu           | Bez enzýmu             | Inaktívny enzým                       |
|                | *6     | 1707T>del (1795)       | Posun čítacieho rámca  | Inaktívny enzým                       |
|                | *10    | 100C>T (188)           | P34S<br>S486T          | Nestabilný enzým                      |
|                | *17    | 1023C>T<br>2850C>T     | T107I<br>R296C<br>486T | Zmenená afinita enzýmu<br>k substrátu |

Najbežnejšími *CYP2C9* variantami, ktoré vedú k zmene aktivity enzýmu sú *CYP2C9\*2* a *CYP2C9\*3*. V prípade *CYP2C9\*2* dochádza k zámene arginínu za cysteín na pozícii 144

(R144C), a pri *CYP2C9\*3* k zámene izoleucínu za leucín na pozícii 359 (I359L). Výskyt jednotlivých variantných alel je rôzny u jednotlivých etnických skupín. Alely *CYP2C9\*2* a *CYP2C9\*3* sa vyskytujú najmä u kaukazskej populácie (frekvencia výskytu 8-14% a 4-16%), u afroamerickej populácie (frekvencia výskytu 4% a 2%) a u ázijskej populácie (frekvencia výskytu 4% pre *CYP2C9\*3*). Ďalšie variantné alely *CYP2C9\*4*, *CYP2C9\*5*, *CYP2C9\*6*, *CYP2C9\*8*, *CYP2C9\*11* majú nízku frekvenciu výskytu, respektíve nachádzajú sa najmä u afroamerickej populácie.

Najbežnejším *CYP2C19* variantom je *CYP2C19\*2*, ktorý je spojený s produkciou skráteneho (truncated) proteínu. Frekvencia výskytu minoritnej alely je 18% u kaukazskej a africkej populácie a viac ako 30% u ázijskej populácie. Ostatné alely *CYP2C19\*3*-\*8 sú zriedkavé, s výnimkou *CYP2C19\*3* s frekvenciou výskytu minoritnej alely u ázijskej populácie približne 7%. Na druhej strane alela *CYP2C19\*17* (806C>T) vedie k zvýšenej transkripcii a je bežná najmä u kaukazskej a africkej populácie (frekvencia výskytu minoritnej alely približne 23%), a menej častá u ázijskej populácie.

Aktivita *CYP2D6* enzýmu sa líši medzi jednotlivcami a populáciami, od normálnej, zvýšenej, zníženej, až po chýbajúcu. Alely *CYP2D6\*2* (frekvencia výskytu 27%-36%) a *CYP2D6\*4* (frekvencia výskytu 12%-16%) sú frekventované u európskej, africkej, juhoázijskej a zmiešanej americkej populácie. Na druhej strane, neaktívne alely *CYP2D6\*3* (frekvencia výskytu 4%) a *CYP2D6\*6* (frekvencia výskytu 2%) sa vyskytujú iba u jedincov európskeho pôvodu. Alela so zníženou funkciou *CYP2D6\*10* sa takmer výlučne vyskytuje u africkej, juhoázijskej a čiastočne u východoázijskej populácie (frekvencia výskytu 59%). *CYP2D6\*14* sa nachádza len u východoázijskej populácie (frekvencia výskytu 2%). Alela *CYP2D6\*17* (frekvencia výskytu 20%) je prítomná u africkej populácie. Alely so zvýšenou funkciou *CYP2D6\*1*×*N* a *CYP2D6\*2*×*N* sú bežné u africkej populácie (29%) a ich frekvencia je nižšia u kaukazskej a ázijskej populácie (frekvencia výskytu 1%-2%).

*CYP2D6* diplotypy je možné použiť na určenie predpokladaných fenotypov pomocou AS (Activity Score) systému. Na výpočet AS sa alely zoskupia podľa ich funkčnosti a každej alele sa priradí hodnota na výpočet AS každého diplotypu: alely bez funkcie – skóre 0 (\*3, \*4, \*4×*N*, \*5, \*6, \*7, \*8, \*11, \*12, \*36, \*40, \*42, \*56); alely so zníženou funkciou – skóre 0,5 (\*9, \*10, \*17, \*29, \*41, \*44, \*49); alely s normálnou funkciou – skóre 1 (\*2, \*35, \*43, \*45); a alely so zvýšenou funkciou – skóre 2 (\*1×*N*, \*2×*N*).

Podľa *CYP2D6* genotypov a ďalších (*CYP2C19*, *CYP2C9* atď.) boli popísané štyri CYP fenotypy (Tab. 5):

- *slabí metabolizéri (PM, poor metabolizers)*, nesúci dve defektné alely a preto im úplne chýba určitá enzýmová aktivita,
- *strední metabolizéri (IM, intermediate metabolizers)*, heterozygotní pre defektnú alelu alebo nesúci dve čiastočne defektné alely, čo vedie k zníženiu aktivity enzýmu,
- *extenzívni metabolizéri (EM, extensive metabolizers)*, nesúci dve funkčné alely a s normálnou aktivitou enzýmu,
- *ultrarýchli metabolizéri (UM, ultrarapid metabolizers)*, nesúci viac ako dve aktívne kópie génov, čo vedie k proporcionálnemu zvýšeniu množstva enzýmu vzhľadom k počtu kópií génu.

Na základe frekvencie alel *CYP2D6*, sú u hlavných etnických skupín najbežnejšími fenotypmi extenzívni a strední metabolizéri (EM a IM). EM tvoria 43-67% populácie a IM tvoria 10-44%. Ultrarýchli a slabí metabolizéri sú menej častí, títo jedinci sú vystavení vyššiemu riziku nežiaducich reakcií alebo zlyhania liečby, pokiaľ sú liečení liekom, ktorý je metabolizovaný alebo bioaktivovaný prostredníctvom *CYP2D6*.

**Tabuľka 5** Pravdepodobné fenotypy priradené na základe príkladov bežných diplotypov

| Fenotyp                        | CYP2D6  | CYP2C9                    | CYP2C19                    | CYP3A5 |
|--------------------------------|---|---------------------------|----------------------------|--------|
| <b>Slabý metabolizér</b>       | *4/*4, (*4/*4)×N,<br>*3/*4, *5/*5,<br>*5/*6                           | *2/*2,<br>*2/*3,<br>*3/*3 | *2/*2,<br>*2/*3,<br>*3/*3  | *3/*3  |
| <b>Stredný metabolizér</b>     | *4/*41, *5/*9,<br>*4/*10  | *1/*2,<br>*1/*3           | *1/*2,<br>*1/*3,<br>*2/*17 | *1/*3  |
| <b>Extenzívny metabolizér</b>  | *1/*1, *1/*2,<br>*2/*2, *1/*9,<br>*1/*41, *41/*41,<br>*1/*5,<br>*1/*4 | *1/*1                     | *1/*1                      | *1/*1  |
| <b>Ultrarýchly metabolizér</b> | (*1/*1)×N <sup>a</sup> ,<br>(*1/*2)×N,<br>(*2/*2)×N                   | —                         | *17/*17,<br>*1/*17         | —      |

Pozn. × N<sup>a</sup> predstavuje počet kópií génu *CYP2D6*.

Strata alebo zníženie aktivity príslušného CYP enzýmu, ako je tomu u PM a IM, môže viesť k akumulácii určitých liekov/xenobiotík v krvi a nezmetabolizovaný liek môže spôsobiť

toxicitu. Na druhej strane, u UM je liek menej účinný a sú potrebné vyššie dávky lieku na dosiahnutie terapeutického účinku. V ideálnom prípade pred navrhnutím liečby a „koktailu“ liekov by mal byť pacientovi určený fenotyp. Tento prístup sa spolieha na to, že metabolizmus vybraného lieku je dobre popísaný, avšak nezahŕňa potenciálnu zmenu aktivity enzýmov II. fázy (aj z dôvodu SNP). Preto interindividuálna variabilita metabolizmu lieku a klírens lieku je častým a komplexným problémom v klinickej praxi. Tiež aj liekové interakcie a interakcie liek-gén môžu viesť k situácii, kedy UM alebo EM (najmä pre CYP2D6 alebo CYP2C19) sa demonštruje ako fenotyp PM.

### 3.1.9. Genetické variácie CYP a nádorové ochorenia

Pri vzniku nádorových ochorení zohrávajú CYP enzýmy tri hlavné úlohy:

- aktivujú (v niektorých prípadoch inaktivujú) environmentálne a v potrave prítomné xenobiotiká na ultimátne karcinogény,
- aktivujú alebo inaktivujú protinádorové lieky,
- sú potenciálnymi cieľmi protinádorovej terapie.

CYP genetické variácie (najmä SNP) boli a sú rozsiahle študované v súvislosti s genetickou predispozíciou k vzniku nádorových ochorení (Tab. 6). Výsledky štúdií sú však častokrát nejednoznačné. Je potrebné si uvedomiť, že pri náchylnosti na vznik nádorového ochorenia zohráva okrem genetickej predispozície, dôležitú úlohu aj životný štýl a životné prostredie. Okrem toho ďalšie faktory, ktorými sú vek, pohlavie, hormonálny stav, choroby atď. môžu mať vplyv na náchylnosť pre vznik nádorového ochorenia.

Spomedzi CYP enzýmov v súvislosti so vznikom nádorových ochorení sú najštudovanejšie CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2E1 a CYP3A4, ktoré sa podieľajú na aktivácii rôznych prokarcinogénov, ako sú PAU, heterocyklické amíny, nitróزامíny, azofarbivá a alkylačné činidlá. Ich metabolizáciou môžu vznikať sekundárne metabolity, ktoré môžu spôsobiť poškodenie DNA, indukovať mutácie, transformáciu buniek a viesť k tumorigenéze. Polymorfizmy a zmeny exprese *CYP1A1* sú študované najmä u karcinómu pľúc, nakoľko ako bolo už vyššie uvedené, tento enzým sa podieľa na metabolizácii prokarcinogénov prítomných v cigaretovom dyme. Najštudovanejšími sú dva polymorfizmy, jeden v intróne v mieste štiepenia *MspI* (*CYP1A1 MspI*) a druhý spôsobujúci zámenu izoleucínu za valín v oblasti enzýmu viažucej hém (*CYP1A1 Ile<sup>46</sup>Val*). Tieto dva polymorfizmy sa u ázijskej populácie

spájajú so stredným až vysokým rizikom pre vznik karcinómu pľúc. U kaukazskej a afroamerickej populácie sú tieto polymorfizmy menej frekventované.

**Tabuľka 6** Hlavné izoformy CYP, ktoré sa podieľajú na karcinogenéze (prevzaté z Stipp MC, Acco A. Cancer Chemother Pharmacol. 87: 295-309, 2021)

| CYP izoenzým                     | Nádorové ochorenie  |
|----------------------------------|---|
| <b>CYP1A1</b>                    | karcinóm pľúc, karcinóm hlavy, karcinóm krku, karcinóm ústnej dutiny, karcinóm hrtana/hltana, karcinóm pažeráka, kolorektálny karcinóm, karcinóm žľazníka, karcinóm prsníka, karcinóm prostaty, karcinóm obličiek, endometriálny karcinóm a karcinóm vaječníkov, lymfómy a leukémia   |
| <b>CYP1A2</b>                    | uroteliálny karcinóm a karcinóm močového mechúra  |
| <b>CYP1B1</b>                    | karcinóm prostaty, karcinóm vaječníkov, karcinóm hlavy, karcinóm krku, karcinóm prsníka, karcinóm pľúc, karcinóm gastrointestinálneho traktu, karcinóm močového mechúra a karcinóm pečene   |
| <b>CYP2A6</b>                    | karcinóm pľúc, karcinóm ústnej dutiny a karcinóm hrubého čreva a konečníka  |
| <b>CYP2C9</b>                    | kolorektálny karcinóm a karcinóm pľúc   |
| <b>CYP2C18</b><br><b>CYP2C19</b> | karcinóm prostaty, karcinóm močového mechúra, karcinóm pľúc, karcinóm pečene, kolorektálny karcinóm a akútna leukémia   |
| <b>CYP2D6</b>                    | karcinóm pľúc, karcinóm hlavy, karcinóm krku, karcinóm pečene, melanóm, karcinóm prsníka, akútna leukémia, karcinóm prostaty, karcinóm močového mechúra, karcinóm mozgu, karcinóm obličiek, kolorektálny karcinóm, karcinóm vaječníkov, karcinóm konečníka, karcinóm vulvy, karcinóm pankreasu, karcinóm krčka maternice, karcinóm hypofýzy a lymfómy |
| <b>CYP2E1</b>                    | karcinóm pľúc a karcinóm tráviaceho traktu  |
| <b>CYP3A4</b>                    | karcinóm prostaty, karcinóm prsníka, karcinóm vaječníkov a myeloidná leukémia   |
| <b>CYP3A5</b>                    | akútna myeloidná leukémia, myelodysplastický syndróm a akútna lymfoblastická leukémia   |

CYP1A2 je najštudovanejší u kolorektálneho karcinómu, karcinómu prsníka a karcinómu pľúc. Aktivita CYP1A2 kolíše u jednotlivcov a u niektorých nádorových ochorení sa zistila znížená expresia a aktivita CYP1A2. Environmentálne faktory (zvýšený príjem kávy a fajčenie) sa podieľajú na aktivácii CYP1A2 prostredníctvom chemických stimulov (ako sú PAU). CYP1A2 sa podieľa tiež na metabolizme estrogénov. Vykazuje najvyššiu 17 $\beta$ -estradiol hydroxylačnú aktivitu na C-2, čo vedie k tvorbe 2-hydroxyestradiolu. Cytotoxicita 2-hydroxyestradiolu je menšia ako 4-hydroxyestradiolu, pretože 2-hydroxyestradiol sa ďalej metabolizuje na 2-metoxysteradiol, ktorý vykazuje protinádorové účinky. To naznačuje, že CYP1A2 má potenciál uplatniť svoje protinádorové účinky.

Polymorfizmy a zmeny expresie *CYP1B1* sú študované najmä u hormonálne-závislého karcinómu prsníka a karcinómu prostaty. CYP1B1 sa jednak podieľa na metabolizácii

prokarcinogénov (napr. PAU) a tiež na hydroxylácii 17 $\beta$ -estradiolu na C-4, ktorej výsledkom je tvorba 4-hydroxyestradiolu. Ten následne reaguje s chinónmi a premieňa sa na estradiol-3,4-chinón, ktorý tvorí depurinované DNA adukty a následne indukuje tumorigenézu prostredníctvom poškodenia DNA alebo aberantnej génovej expresie.

Spomedzi ďalších vyšetřovaných CYP, viac ako 70% štúdií potvrdilo súvislosť medzi *CYP2A6* polymorfizmami a karcinómom pľúc alebo ústnej dutiny. Zistilo sa, že genotypy spojené s nízkou aktivitou *CYP2A6* znižujú náchylnosť na vznik karcinómu pľúc, pravdepodobne z dôvodu pomalšej metabolizácie nikotínu. Asociácia medzi *CYP2D6* polymorfizmami a karcinómom prsníka je často študovaná u pred- a postmenopauzálnych pacientiek liečených antiestrogénom tamoxifénom. Tamoxifén je proliek, ktorý je metabolizovaný na aktívne metabolity endoxifén a 4-hydroxy-tamoxifén prostredníctvom *CYP2D6*. Tieto metabolity majú 33-krát vyššiu afinitu k estrogénovému receptoru než samotný tamoxifén. Niektoré štúdie poukázali na vyššie riziko relapsu u žien s estrogénovým receptor-pozitívnym karcinómom prsníka a s fenotypom slabý metabolizér (*CYP2D6*\*4/\*4), ktoré boli liečené tamoxifénom.

## 3.2. MONOOXYGENÁZY OBSAHUJÚCE FLAVÍN

Ďalšími významnými enzýmami I. fázy biotransformácie sú popri CYP monooxygenázy obsahujúce flavín (FMO; Flavin-containing monooxygenases; E.C.1.14.12.8). FMO predstavujú širokú rodinu mikrozomálnych enzýmov prítomných takmer vo všetkých organizmoch, ktoré vyžadujú FAD ako prostetickú skupinu, NADPH ako kofaktor a O<sub>2</sub> ako kosubstrát. Podieľajú sa na oxygenácii širokého spektra xenobiotík a liekov obsahujúcich nukleofilný heteroatóm (dusík, síru, fosfor, selén). Produkty reakcií katalyzovaných FMO sú vo všeobecnosti polárnejšie, menej toxické, ale aj menej farmakologicky aktívne a sú ľahšie vylúčiteľné z organizmu ako materská zlúčenina. Okrem monooxygenácie môžu FMO katalyzovať tiež oxidačnú dekarboxyláciu, oxidačnú demetyláciu a tvorbu disulfidovej väzby.

### 3.2.1. Klasifikácia a charakterizácia FMO

Ľudský genóm obsahuje jedenásť *FMO* génov, z ktorých päť je funkčných (*FMO1-FMO5*). *FMO* gény, ktorých sekvencia nukleotidov je identická na viac ako 40% sú zaradené do rovnakej rodiny. Gény *FMO1-FMO5* sa vyznačujú 52-60% identickou sekvenciou DNA s výnimkou *FMO3* a *FMO6*, u ktorých je to až 71%. Gény *FMO1-FMO4* sú lokalizované na



chromozóme 1q24.3. Tento klaster obsahuje tiež gén *FMO6P*, klasifikovaný ako pseudogén, pretože produkuje nesprávne zostrihanú mRNA. Gén *FMO5* je lokalizovaný na chromozóme 1q21.1 približne 26 Mb bližšie k centromére. Ďalší génový klaster *FMO* je prítomný na chromozóme 1q24.2 a je zložený výlučne z pseudogénov *FMO7P-FMO11P*. Vznikajúce proteíny sú zložené z 532-558 aminokyselín a obsahujú vysoko konzervované FAD a NADPH väzbové domény.

Najvyššia expresia FMO1 je v obličkách dospelých; v pečeni a v tenkom čreve plodu je 10- až 14-krát nižšia v porovnaní s expresiou FMO1 v obličkách dospelých. FMO1 je exprimovaná tiež v pľúcach a v mozgu, pričom po narodení sa jej hladina v mozgu znižuje. FMO2 je dominantnou formou v pľúcach dospelých a je tiež exprimovaná v obličkách, pečeni, tenkom čreve a v mozgu. FMO3 a FMO5 sú hlavnými formami FMO v pečeni dospelého človeka a sú exprimované aj v pľúcach, obličkách, pečeni plodu, tenkom čreve a v mozgu. Expresia FMO4 je v rôznych tkanivách nízka a je exprimovaná najmä v pečeni a v obličkách dospelých. Medzi jedincami existujú značné rozdiely v hladinách FMO mRNA, proteínov a vo funkčnej aktivite FMO, čo naznačuje viacnásobnú úroveň regulácie.

FMO sa podieľajú oxygenácii xenobiotík, liekov, pesticídov a zložiek potravy. FMO katalyzujú oxidáciu 1,4-disubstituovaných hydrazínov, N-alkylarylamínov, alkyltiolov, aminotiolov, tioamidov, 2-merkaptimidazolov, tiokarbamátov, merkaptopyrimidínov a tiokarbamidov. Na metabolizácii širokého spektra substrátov sa podieľajú najmä FMO1 a FMO3. Väčšina liekov, ktoré sú metabolizované FMO sú terciárne amíny, ktoré sú N-oxygenované za vzniku N-oxidu alebo sulfidy, ktoré sú S-oxygenované na sulfoxid. Niektoré liečivá sú metabolizované FMO1 aj FMO3 (napr. benzydamín, itoprid, N-deacetylketokonazol, vorikonazol a tamoxifén), a niektoré iba určitým FMO enzýmom, napríklad chlórpromazín, imipramín a kvazepam sú metabolizované FMO1 a prokaínamid FMO3. FMO2 a FMO5 metabolizujú užší rozsah substrátov. Keďže expresia FMO4 v tkanivách je veľmi nízka, predpokladá sa, že nezohráva významnú úlohu v metabolizácii liekov. Je tiež známe, že FMO sú menej náchylné na liekové interakcie.

Biogénne amíny, fenetylamín a tyramín, sú N-oxygenované FMO za vzniku N-hydroxy metabolitov, ktoré sú následne oxygenované a vznikajú trans-oxímy. Oxímy majú nízku farmakologickú aktivitu a preto sa predpokladá, že N-oxygenácia biogénnych amínov sprostredkovaná FMO vedie k ich inaktivácii. Trimetylamín (TMA, páchnuci po rybách) je ďalším príkladom endogénnej zlúčeniny, ktorá sa *in vivo* tvorí rozkladom cholínu a karnitínu pôsobením črevných baktérií a je N-oxygenovaný FMO3. Mutácie v géne *TMO3* spôsobujú zriedkavé ochorenie trimetylamínúriu (TMAúria). Postihnutí jedinci nie sú schopní

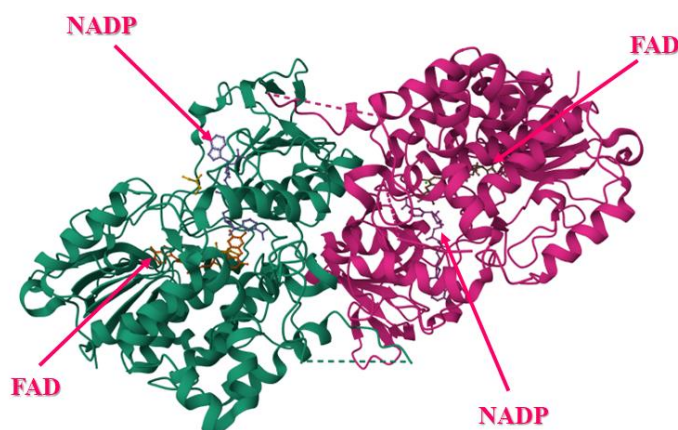
metabolizovať TMA na N-oxid (bez zápachu). Porucha sa niekedy nazýva syndróm rybieho zápachu, pretože jedinci vylučujú nadmerné množstvo TMA dychom, potom a močom, čo vyvoláva zápach pripomínajúci hnijúce ryby. Táto porucha často vedie k psychickým a sociálnym problémom, v extrémnych prípadoch ku klinickej depresii a samovražedným sklonom.

Tioly, ako je cysteamín, sú S-oxygenované na disulfid (cystamín). Fyziologická úloha S-oxygenácie cysteamínu prostredníctvom FMO nie je známa, ale predpokladá sa jej význam pri tvorbe disulfidových väzieb. Kyselina lipová je ďalším príkladom endogénneho substrátu, ktorý je S-oxygenovaný prostredníctvom FMO.

FMO katalyzujú stereoselektívnu N'-oxidáciu nikotínu. Nikotín-N'-oxidy predstavujú 4 až 7% z celkového množstva metabolitov nikotínu prítomných v moči u fajčiarov. V prípade, ak je hydroxylačná kapacita CYP2A6 znížená alebo defektná, hladiny nikotín-N'-oxidov sa zvyšujú až na 31% z celkového množstva metabolitov nikotínu prítomných v moči.

### 3.2.2. Štruktúra FMO

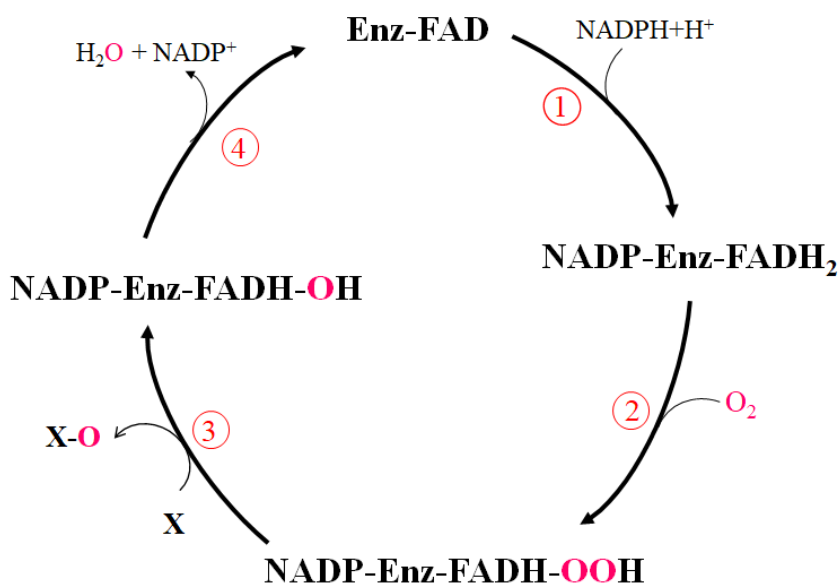
Napriek tomu, že FMO boli objavené pred viac ako 30 rokmi, štruktúra cicavčích FMO nie je plne objasnená. Cicavčie FMO sú diméry, ktoré sú viazané v membránach ER prostredníctvom C-koncového transmembránového  $\alpha$ -helixu, ktorý prechádza membránou, pričom niekoľko posledných C-koncových aminokyselinových zvyškov vystupuje na druhej strane membrány. Väzbové miesta pre FAD a NADPH sú vysoko konzervované a nachádzajú sa hlboko v štruktúre proteínu (obr. 10). FMO obsahujú subdoménu zloženú z 80 aminokyselinových zvyškov, ktorá chráni aktívne miesto a uzaviera dutinu, do ktorej sa viaže substrát. Väčšina aminokyselinových zvyškov v aktívnom mieste a vo väzbovej doméne kofaktora sú v rámci evolúcie konzervované.



**Obrázok 10** Štruktúra ancestrálneho FMO1 (databanka proteínov - PDB ID: 7AL4)

### 3.2.3. Katalytický cyklus FMN

Katalytický cyklus FMO je znázornený na obrázku 11. Na rozdiel od CYP, FMO akceptujú elektróny priamo od NADPH, a teda nevyžadujú reduktázu. Kroky 1 a 2 katalytického cyklu sú rýchle a enzým je prítomný v aktívnej forme ako C4a-hydroperoxyflavín, ktorý je schopný oxygenovať substrát.



**Obrázok 11** Katalytický cyklus FMO (prevzaté z Hodgson, E. Introduction to Biotransformation (Metabolism). Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, 865-875, 2010)

V prvom kroku (1) dochádza k naviazaniu NADPH na enzým a k dvojelektrónovej redukcii jeho prostetickej skupiny FAD na FADH<sub>2</sub>. V druhom kroku (2) molekulový kyslík rýchlo reaguje s redukovaným FADH<sub>2</sub> za vzniku C4a-hydroperoxyflavínu, ktorý potom oxiduje substrát a štiepi O-O väzbu. Dochádza k inzercii jedného atómu kyslíka do substrátu a oxidovaný substrát opúšťa cyklus (3). Druhý atóm kyslíka tvorí vodu a NADP<sup>+</sup> sa uvoľní z enzýmu a opustí cyklus. Redukovaný flavín je spätne reoxidovaný (4).

Animálne a *in vitro* štúdie poukázali na tvorbu ROS počas katalytického cyklu FMO, a to najmä superoxidového aniónového radikálu alebo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Toxikologické dôsledky produkcie ROS prostredníctvom FMO neboli skúmané. Na druhej strane bola vyslovená hypotéza, že generovanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prostredníctvom FMO by mohlo zohrávať dôležitú fyziologickú úlohu pri kontrole celkového redoxného stavu bunky. Avšak je potrebné si uvedomiť, že vlastnosti a aktivita purifikovaného enzýmu sa môže výrazne líšiť od natívneho enzýmu.

### 3.2.4. Genetické variácie FMO a nádorové ochorenia

Nakoľko indukcia, respektíve inhibícia FMO nie je taká bežná ako pri CYP, zmeny aktivity FMO v dôsledku environmentálnych vplyvov nie sú také výrazné. Na druhej strane sa však predpokladá, že zmeny v metabolizácii xenobiotík a liekov prostredníctvom FMO sú dôsledkom genetických rozdielov. V porovnaní s CYP, je počet identifikovaných SNP *FMO* omnoho nižší. Podľa GenBank, bolo v *FMO1*, *FMO2*, *FMO3*, *FMO4* a *FMO5* identifikovaných 34, 57, 40, 30 a 40 variantov genómovej DNA, čo prekladá 2, 9, 19, 1 a 2 varianty v kódujúcej oblasti pre *FMO1*, *FMO2*, *FMO3*, *FMO4* a *FMO5*.

Niektoré z alelických variantov *FMO1* sú pravdepodobne zriedkavé alely (H97Q, I303V, I303T, R502X) a neprispievajú významne k interindividuálnym rozdielom v expresii *FMO1*. Väčšina ľudí je homozygotná pre nezmyselnú (nonsense) mutáciu *FMO2* 1414C>T (Gln472\*). Výsledná alela *FMO2\*2A* kóduje skrátený polypeptid *FMO2.2A*, ktorý postráda 64 aminokyselinových zvyškov z C-konca a je katalyticky neaktívny. Alela *FMO2\*1* kóduje funkčný polypeptid *FMO2.1* a je prítomná u africkej populácie, pričom v niektorých oblastiach subsaharskej Afriky je takmer 50% jedincov nositeľom aspoň jednej alely *FMO2\*1*.

Päť z 19 variantov *FMO3* (E158K, V257M, E308G, R492W a G180V) sa spája s normálnou, alebo mierne zníženou TMA N-oxygenujúcou aktivitou. Prvé tri varianty sú bežné a zvyšné dva raritné. Jedným zo zriedkavých SNP pozorovaný iba u jedincov afrického pôvodu je *FMO3 360P*. Spája sa s fenotypom „*extenzívny metabolizér*“ a pravdepodobne prispieva k vyššiemu klírensu liekov u jedincov, ktorí tento SNP majú. Bolo identifikovaných veľmi málo nesynonymných SNP v génoch kódujúcich *FMO4* a *FMO5*, ktoré sa vyskytujú v populáciách v nízkej frekvencii a nie je známe, že by ovplyvňovali aktivitu enzýmov.

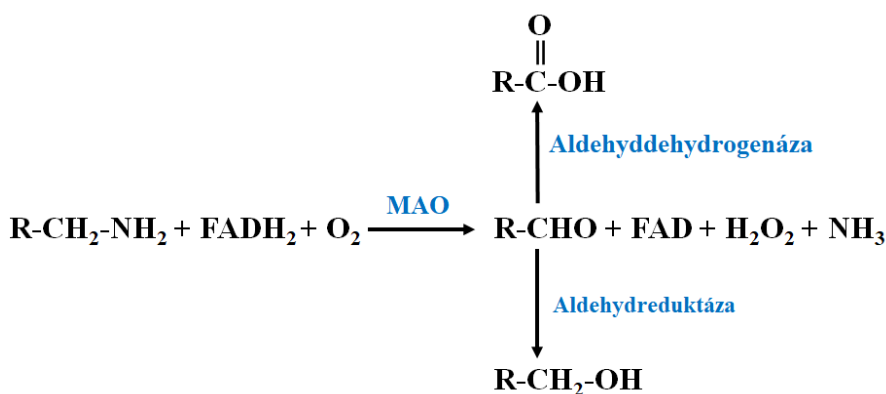
Interindividuálna *FMO* diverzita môže byť tiež dôsledkom vzniku rôznych aberantných *FMO* zostrihov variantov, ktoré kódujú nefunkčný enzým. Duplikácia *FMO* génov môže viesť naopak k zvýšeniu aktivity *FMO*. Niektoré polymorfizmy v promótorovej oblasti *FMO* génov spôsobujú zvýšenie, alebo naopak vedú k strate funkcie promótoru.

Hoci je známe, že genetické varianty *FMO*, najmä tie, ktoré ovplyvňujú aktivitu *FMO3*, ovplyvňujú metabolizmus liekov *in vitro*, štúdie zaoberajúce sa sledovaním *in vivo* vplyvu *FMO* variantov u ľudí je obmedzený. Podobne, aj počet štúdií zaoberajúcich sa sledovaním vzťahu medzi *FMO* SNP a rizikom vzniku nádorových ochorení je nízky a preto sú potrebné kvalitne nadizajnované štúdie, ktoré by napomohli definovať klinický význam genotypizácie *FMO*.

### 3.3. ĎALŠIE OXIDÁZY PODIEĽAJÚCE SA NA METABOLIZÁCIU XENOBIOTÍK

#### 3.3.1. Monoaminoxidázy

Monoaminoxidázy (MAO, EC 1.4.3.4) sú flavoproteíny, ktoré katalyzujú oxidačnú deamináciu biogénnych monoamínov a primárnych, sekundárnych, terciárnych amínov xenobiotík (vrátane liekov) na aldehydy, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a amoniak (obr. 12).



**Obrázok 12** Oxidačná deaminácia monoamínu na príslušný aldehyd katalyzovaná MAO. Vznikajúci aldehyd je ďalej metabolizovaný aldehyddehydrogenázou alebo aldehydreduktázou.

U ľudí existujú dve izoformy MAO, a to MAO-A, MAO-B, ktoré vykazujú odlišnú, ale prekrývajúcu sa substrátovú špecifitu. Sú kódované samostatnými génmi lokalizovanými na X-chromozóme a vyznačujú sa približne 70% identickou aminokyselinou sekvenciou. MAO-A prednostne oxiduje sérotonín, noradrenalín a adrenalín. Je ireverzibilne inhibovaný nízkymi dávkami klogylínu. MAO-B prednostne oxiduje fenyletylamín a je ireverzibilne inaktivovaný nízkymi dávkami deprenylu (selegilínu). Dopamín a tyramín sú spoločné substráty pre MAO-A aj MAO-B. Avšak, len málo štúdií sa venovalo sledovaniu úlohy MAO pri eliminácii xenobiotík, s výnimkou metabolizácie exogénneho tyramínu a takzvaného „syrového efektu“, ktorý vzniká v dôsledku požitia veľkého množstva potravín obsahujúcich tyramín pri inhibícii MAO.

MAO sú lokalizované vo vonkajšej mitochondriálnej membráne a sú prítomné prakticky vo všetkých oblastiach mozgu a vo väčšine periférnych orgánov. Kvôli ich schopnosti metabolizovať monoamíny, ktoré fungujú ako neurotransmitery, sa výskum MAO izoforiem v minulosti zameriaval na cerebrálnu úlohu týchto dvoch enzýmov. Novšie štúdie však poukázali na

expresiu MAO izoforiem aj v periférnych tkanivách, ktorá prevyšuje expresiu v mozgu. Napríklad ľudský MAO-A je dominantne exprimovaný v placentе, tukovom tkanive, štítnej žľaze a v pľúcach, zatiaľ čo expresia v rôznych častiach mozgu je pomerne nízka. Naproti tomu MAO-B je dominantne exprimovaný v rôznych častiach centrálného nervového systému (CNS; hypotalamus, prefrontálny kortex, amygdala, miecha), ako aj v maternici, obličkách, pečeni a v srdci. V CNS sa MAO-A nachádza predovšetkým v katecholaminergných neurónoch, zatiaľ čo MAO-B je prítomný v sérotonergných a histamínergných neurónoch, ako aj v gliálnych bunkách.

### 3.3.2. Peroxidázy

Peroxidázy (EC 1.11.1) predstavujú veľkú rodinu izoenzymov, ktoré sú prítomné takmer vo všetkých živých organizmoch. Sú to oxidoreduktázy, ktoré katalyzujú redukciu peroxidov ako je  $\text{H}_2\text{O}_2$  spojenú s oxidáciou rôznych organických a anorganických zlúčenín, vrátane xenobiotík. Ďalšími oxidačnými činidlami okrem  $\text{H}_2\text{O}_2$  sú alkylhydroperoxidy, kyselina peroxybenzoová,  $\text{OCl}^-$ ,  $\text{OBr}^-$ ,  $\text{ClO}_2^-$ ,  $\text{BrO}_3^-$ ,  $\text{IO}_4^-$ , kyselina m-nitrobenzoová atď. V závislosti od dostupnosti substrátu a typu peroxidázy prechádzajú tieto oxidoreduktázy buď peroxidázovým alebo halogenačným cyklom. Pri tejto jednoelektrónovej oxidácii zlúčenín vznikajú voľné radikály, ktoré môžu podliehať dismutácii alebo byť oxidované na elektrofilný oxidačný produkt, ktorý môže alkylovať bázy DNA a v konečnom dôsledku aktivovať proces chemickej karcinogenézy.

Gény kódujúce ľudské peroxidázy sú lokalizované na rôznych chromozómoch. Peroxidázy sú zložené z 576-738 aminokyselín a existujú ako monoméry, diméry alebo tetraméry. Vo všeobecnosti sa rozdeľujú na hémové a nehémové peroxidázy. Hémové peroxidázy obsahujú prostetickú skupinu protoporfyrín IX s nízko spinovým  $\text{Fe}^{3+}$ , zatiaľ čo nehémové peroxidázy túto prostetickú skupinu neobsahujú. Rodina ľudských peroxidáz zahŕňa myeloperoxidázu, eozinofilnú peroxidázu, laktoperoxidázu, peroxidázu prítomnú v slinách, tyroidálnu peroxidázu, prostaglandín H1/2 syntázu atď.

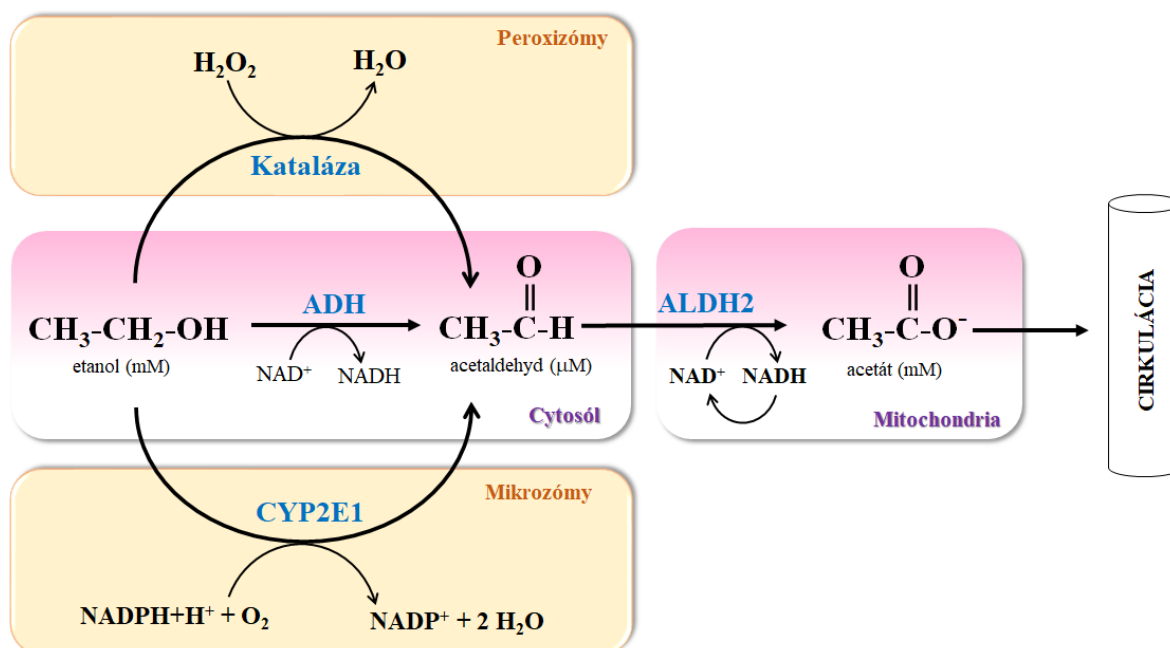
Peroxidázy sú experimentované v rôznych tkanivách a líšia sa tiež subcelulárnou lokalizáciou v závislosti od ich špecifických funkcií. Katalyzujú oxidáciu širokého spektra xenobiotík, ako sú fenoly, aromatické amíny, PAU atď. Podieľajú sa tiež na aktivácii niektorých liečiv (napr. fenotiazínov, nesteroidných protizápalových liekov, troglitazónu, tolkapónu), ktorá však môže zvyšovať ich cytotoxicitu. Pokiaľ ide o priemyselné využitie, peroxidázy sa využívajú najmä pri čistení odpadových vôd.

### 3.3.3. Alkoholdehydrogenázy

Cicavčie alkoholdehydrogenázy (ADH, EC 1.1.1.1) predstavujú rodinu enzýmov, ktoré katalyzujú oxidáciu a redukciu širokého spektra alkoholov a aldehydov. Na základe elektroforetických vlastností, kinetických vlastností a sekvencie aminokyselín sa ľudské ADH rozdeľujú do piatich tried. Izoenzýmy triedy I (ADH1, ADH2 a ADH3) majú nízku hodnotu  $K_m$  pre etanol a zohrávajú v jeho metabolizme hlavnú úlohu. Izoenzýmy triedy II (ADH4) sa podieľajú na oxidácii etanolu pri jeho vyšších koncentráciách. Trieda III (ADH5) sa veľmi málo podieľa na metabolizme etanolu, s výnimkou jeho vysokých koncentrácií, a zohráva dôležitú úlohu pri metabolizácii formaldehydu a oxidu dusnatého. Izoenzým triedy IV (ADH7) je prítomný v žalúdku a v pažeráku a má vysokú hodnotu  $K_m$  pre etanol. U ADH6 bol identifikovaný iba gén, nie však funkčný proteín. Ľudské ADH existujú ako homodiméry alebo heterodiméry.

Hlavným miestom metabolizácie etanolu je pečeň, a v menšej miere aj GIT (jazyk, ústa, pažerák, žalúdok). Etanol absorbovaný tenkým črevom je metabolizovaný pečeňou tromi spôsobmi: oxidáciou ADH, CYP2E1 (menej CYP3A4) a katalázou (Obr. 13). Tieto reakcie vedú k vzniku toxického acetaldehydu, ktorý je oxidovaný na acetát prostredníctvom mitochondriálnej aldehyddehydrogenázy (ALDH). Hlavnú úlohu v metabolizme etanolu zohráva cytosólová ADH, pričom vzniká spomínaný acetaldehyd a  $NAD^+$  sa redukuje na NADH.

ADH je exprimovaná prevažne v hepatocytoch a menej v GIT, pľúcach a v obličkách. Približne 10% etanolu je metabolizovaného prostredníctvom CYP2E1 na acetaldehyd a zároveň dochádza k produkcii ROS, ktoré prispievajú k toxicite alkoholu. Okrem toho, etanol chráni CYP2E1 pred ubikvitináciou a degradáciou proteazómovým komplexom. Tento mechanizmus vedie k zvýšeniu hladiny CYP2E1 v hepatocytoch a k tolerancii etanolu u chronických alkoholikov. Acetaldehyd a ROS interagujú s makromolekulami (DNA, lipidy, proteíny), čo vedie k tvorbe reaktívnych metabolitov a k narušeniu fyziologických funkcií buniek.



**Obrázok 13** Metabolizmus etanolu v hepatocyte (prevzaté z Zakhari S. Alcohol Res Health. 29: 245-254, 2006)

ADH a ALDH sa podieľajú na metabolizácii metanolu na formaldehyd a na kyselinu mravčiu. Kyselina mravčia je toxín a je zodpovedná za typické prejavy otravy metanolom – dysfunkcia sietnice, po ktorej môže nasledovať jej nezvratné poškodenie; metabolická acidóza a neurologické poruchy. Malé množstvo metanolu je prítomné v potrave, fermentovaných alkoholických nápojoch atď. V chemickom priemysle sa metanol používa pri výrobe mnohých organických látok, vrátane viacerých liečiv. Smrteľná dávka metanolu u ľudí nie je presne stanovená. Predpokladá sa, že požitie 30 až 100 ml metanolu môže spôsobiť smrť, avšak úmrtie na metanol môže nastať aj po požití 15 ml 40% metanolu a slepota môže nastať už pri konzumácii 4 ml metanolu. Liečba otravy metanolom spočíva v kompetitívnej inhibícii ADH použitím fomepizolu alebo etanolu.

Gény kódujúce ADH2 a ADH3 sú polymorfné, čo vedie k syntéze enzýmov, ktoré sa môžu líšiť rýchlosťou metabolizácie etanolu a produkciou acetaldehydu. Ukázalo sa, že tieto varianty ovplyvňujú úroveň pitia alkoholu a následne riziko vzniku abúzu alkoholu alebo alkoholovej závislosti. Gén *ADH2* sa vyskytuje vo forme troch alel, ktoré sa líšia aminokyselinovou sekvenciou kódovanej  $\beta$  podjednotky. Alela *ADH2\*1* kóduje podjednotku  $\beta 1$ , ktorá má v pozícii 48 a 370 aminokyselín arginín a je to referenčná alela. *ADH2\*2* kóduje  $\beta 2$  podjednotku, ktorá má v pozícii 48 histidín a je frekventovaná u ázijskej populácie. Spomaľuje klírens acetaldehydu a chráni pred nadmerným požívaním alkoholu. *ADH2\*3*



kóduje podjednotku  $\beta 3$ , ktorá má v pozícii 370 cysteín a vyskytuje sa u 25% africkej populácie. V podjednotkách  $\beta 2$  aj  $\beta 3$  dochádza k substitúcii aminokyselín, ktoré prichádzajú do kontaktu s koenzýmom  $\text{NAD}^+$ , čo v konečnom dôsledku vedie k 70- až 80-krát vyššej rýchlosti reakcie v porovnaní s  $\beta 1$  podjednotkou, pretože koenzým sa na konci reakcie uvoľňuje rýchlejšie. Gén *ADH3* má dve alely, *ADH3\*1* a *ADH3\*2*, ktoré kódujú podjednotky  $\gamma 1$  s vyššou aktivitou a  $\gamma 2$  s nižšou aktivitou voči etanolu.

Požívanie alkoholu je rozšírené na celom svete. Odhaduje sa, že zvýšený príjem etanol je zodpovedný za 3,8%-nú celosvetovú úmrtnosť a 6,5%-nú úmrtnosť v Európe. Je známe, že požívanie (akútne/chronické) vysokých dávok alkoholu je spojené s poškodením centrálného a periférneho nervového systému, pečene, pankreasu alebo myokardu. Mnoho epidemiologických štúdií poukázalo na koreláciu medzi spotrebou etanolu a výskytom nádorových ochorení.

### 3.3.4. Aldehyddehydrogenázy

Aldehyddehydrogenázy (ALDH, EC 1.2.1.3) sú rodinou  $\text{NAD(P)}$ -závislých enzýmov, ktoré sa podieľajú na oxidácii veľkého množstva alifatických a aromatických, endogénnych a exogénnych aldehydov na zodpovedajúce karboxylové kyseliny. Endogénne aldehydy vznikajú v metabolizme aminokyselín, sacharidov, lipidov, biogénnych amínov, vitamínov a steroidov. Aldehydy tiež vznikajú biotransformáciou mnohých liekov, ako aj environmentálnych zlúčenín. Aldehydy sú vysoko reaktívne elektrofilné zlúčeniny, ktoré interagujú s tiolovými skupinami a aminoskupinami, čím prejavujú svoje cytotoxické, mutagénne alebo karcinogénne účinky. ALDH sa tiež podieľajú na syntéze esenciálnych molekúl, ako je kyselina retinová, betaín a kyselina gama-aminomaslová.

Doteraz bolo u ľudí identifikovaných 19 členov superrodiny ALDH, ktoré sa navzájom líšia subcelulárnou lokalizáciou, distribúciou v tkanivách a preferovanými substrátmi, ktoré metabolizujú. Počiatočná klasifikácia ALDH koncom 80-tych rokov, keď bolo známych len málo ALDH, viedla k ich rozdeleniu do troch tried: ALDH 1, 2 a 3. Triedu 1 a 3 tvoria konštitutívne exprimované a indukovateľné cytosólové enzýmy; a triedu 2 konštitutívne mitochondriálne enzýmy. Členovia triedy 1 a 2 sú zvyčajne homotetraméry so 70% identickou sekvenciou. Členovia 3 triedy sú homodiméry, pričom ich sekvenčná identita k triede 1 alebo 2 je len 25%.

Najdôležitejšiu úlohu pri metabolizácii acetaldehydu zohráva ALDH2 (Obr. 13), a v prípade, ak je tento enzým nefunkčný, úlohu preberajú ALDH1A1 a ALDH1B1. ALDH1A1

je exprimovaná v mozgu, pečeni, obličkách, tukovom tkanive, očných šošovkách, sietnici atď. Oxiduje retinal na kyselinu retinovú, ktorá sa podieľa na regulácii transkripcie génov kritických pre normálny rast a diferenciáciu buniek. Zvýšená expresia ALDH1A1 sa zistila u mnohých nádorových ochorení, pričom sa spája so zlou prognózou, ako aj s liekovou rezistenciou na chemoterapeutiká. ALDH1B1 je mitochondriálny enzým, ktorý je exprimovaný v pečeni, tenkom čreve, semenníkoch a v menšej miere aj v iných tkanivách, ako je pankreas a hrubé črevo. Podieľa sa na detoxikácii acetaldehydu vznikajúceho z alkoholu, participuje v metabolizme kortikosteroidov, biogénnych amínov a neurotransmiterov.

ALDH2 je exprimovaná najmä v pečeni, ale aj v iných orgánoch, ako je srdce, obličky, sval a mozog. Bodová mutácia v *ALDH2* géne spôsobujúca zmenu G za A v exóne 12 (*ALDH2*\*2) sa vyskytuje približne u 8% svetovej populácie, pričom výskyt vo východnej Ázii dosahuje až 45%. Jej výsledkom je strata enzýmovej aktivity ALDH2, čo vedie k akumulácii toxického acetaldehydu a následne môže viesť k vzniku a progresii ochorení pečene ako sú nealkoholické tukové ochorenia pečene, vírusová hepatitída a hepatocelulárny karcinóm.

### 3.3.5. Aldehydoxidáza a xantínoxioreduktáza

Aldehydoxidáza (AO, EC 1.2.3.1) je cytosólový molybdoflavoproteín, ktorý patrí do rodiny enzýmov obsahujúcich molybdén podobne ako xantínoxioreduktáza. Pre svoju katalytickú aktivitu využíva molybdén (Mo) a FAD na oxidáciu a/alebo redukciu substrátov. Je vysoko exprimovaný v pečeni. AO sa vyznačuje širokou substrátovou špecifitou, podieľa sa na oxidácii aromatických a alifatických aldehydov na zodpovedajúce karboxylové kyseliny. Na rozdiel od CYP, zdrojom kyslíka preneseného do substrátu je voda, nie O<sub>2</sub>. AO sa tiež podieľa na redukčných reakciách, ako je redukcia aromatických zlúčenín obsahujúcich nitroskupinu na hydroxylamíny.

Xantínoxioreduktáza (XOR) sa vyskytuje v dvoch formách, ako xantíndehydrogenáza (XDH, EC 1.1.1.204) a xantínoxiidáza (XO, EC 1.1.3.22). Treba poznamenať, že v literatúre sa pre enzým vo všeobecnosti často používa termín xantínoxiidáza. Cicavčia XDH sa môže premeniť na XO modifikáciou cysteínových zvyškov alebo proteolýzou polypeptidového reťazca enzýmu. Obidve formy môžu redukovať molekulový kyslík, hoci XO je účinnejšia. XOR sa podieľa na katabolizme purínových nukleotidov, katalyzuje oxidáciu hypoxantínu na xantín a následne xantínu na kyselinu močovú. Podobne ako AO, XOR katalyzuje oxidáciu rôznych alifatických a aromatických aldehydov. Okrem pečene je XOR exprimovaná aj v iných tkanivách.

### 3.4. ENZÝMY PODIEĽAJÚCE SA NA REDUKCII XENOBIOTÍK

Dôležitou cestou metabolizácie mnohých xenobiotík je ich redukcia, aj keď v odbornej literatúre je dostupných oveľa menej informácií v porovnaní s oxidáciou xenobiotík. Redukcia je chemická reakcia, pri ktorej metabolit získava elektróny. Mnohé redukčné reakcie sú opakom oxidačných reakcií. Redukcii podliehajú nitroskupiny, azoskupiny, terciárne amín-N-oxidy, aldehydy, ketóny, sulfoxidy, polyhalogenidy atď. Redukciou xenobiotík sú generované polárne funkčné skupiny, ako sú hydroxylové skupiny a aminoskupiny, ktoré môžu podstúpiť ďalšiu biotransformáciu alebo konjugáciu. Pri redukcii často ako medziprodukty vznikajú voľné radikály. Mnohé z týchto redukčných reakcií však prebiehajú za anaeróbných podmienok, kedy sa tvorba voľných radikálov znižuje. Významnými enzýmami podieľajúcimi sa na redukcii xenobiotík sú nitroreduktázy, azoreduktázy, aldo-ketoreduktázy a karbonylreduktázy.

**Nitroreduktázy (NR)** sú flavoenzýmy s pevne naviazaným kofaktorom FMN. Katalyzujú redukciu nitroskupín širokého spektra nitrozlučením za vzniku primárnych amínov. Nitrozlučeniny sa nachádzajú napríklad v priemyselných rozpúšťadlách, insekticídach a konzervačných látkach. NR sa rozdeľujú do dvoch tried na základe ich schopnosti prenášať elektróny a citlivosti na kyslík:

- *NR typu I* nie sú citlivé na kyslík a redukujú nitroskupiny nitrozlučením postupným prenosom dvoch elektrónov z NAD(P)H za anaeróbných/aeróbných podmienok. Tieto NR redukujú rôzne nitrozlučeniny, ako sú nitrofurány, nitrofenoly, nitrobenzény, nitrobenzoáty, nitroimidazoly a nitrotoluény.
- *NR typu II* sú citlivé na kyslík a redukujú nitroskupinu nitrozlučením prenosom jedného elektrónu za aeróbných podmienok, pričom vytvárajú negatívne nabitú nitroskupinu, ktorá ľahko reaguje s kyslíkom za vzniku superoxidového aniónového radikálu. Tieto enzýmy majú za následok „zbytočný redoxný cyklus“, ktorý tvorí veľké množstvo superoxidu a indukuje oxidačný stres.

V ostatných desaťročiach sa pri liečbe nádorových ochorení zvýšená pozornosť venuje vývoju nových liečebných stratégií, ktoré by napomohli efektívnejšiemu zacieleniu proliekov na nádorové bunky, s cieľom zvýšiť ich účinnosť a znížiť ich toxicitu. Génová terapia založená na aktivácii „prolieku“ pomocou enzýmu (gene-directed enzyme/prodrug therapy, GDEPT) je jedným z možných prístupov v liečbe nádorových ochorení. GDEPT využíva transgény

kódujúce enzýmy, ktoré môžu konvertovať prolieky na aktívne terapeutické metabolity. Mimoriadne zaujímavé pre GDEPT sú NR typu I, prevažne z baktérií, ktoré sú schopné redukciou aktivovať nitroaromatické prolieky v okysličených ako aj hypoxických nádorových tkanivách.

**Azoreduktázy (AR)** sú flavín-dependentné (FMN) enzýmy, ktoré sú schopné redukčne štiepiť azozlúčeniny obsahujúce  $R_1-N=N-R_2$  skupinu, kde  $R_1$  a  $R_2$  sú aromatické skupiny. Azozlúčeniny sú výrazne farebné, preto sa často využívajú ako farbivá v potravinárskom, kozmetickom, farmaceutickom, textilnom a polygrafickom priemysle. Avšak mnohé azofarbivá majú letálne, genotoxické, mutagénne a karcinogénne účinky. Redukcia substrátov azoreduktázami vyžaduje donora elektrónov, ktorým je NADH alebo NADPH a prebieha „bi-bi ping-pongovým“ reakčným mechanizmom. Ide o dvojelektrónový proces, pri ktorom sa hydrid prenáša z NAD(P)H na FMN a potom na substrát. Redukcia jedného azo-substrátu vyžaduje dva NAD(P)H.

**Aldo-ketoreduktázy (AKR)** katalyzujú NAD(P)H-závislú redukcii širokého spektra karbonylových zlúčenín, ako sú aldehydy a ketóny, za vzniku primárnych a sekundárnych alkoholov. Pretože týmto enzýmom chýbajú kovové alebo flavínové kofaktory, sú menej účinné ako alkoholdehydrogenázy a podieľajú sa najmä na redukčných reakciách.

Doteraz bolo u ľudí charakterizovaných 15 AKR, patriacich do troch rôznych rodín, a to AKR1, AKR6 a AKR7. Medzi ľudské enzýmy AKR patria AKR1A1 (aldehýdreduktáza), AKR1B1 a AKR1B10 (aldózareduktázy), AKR1C1-C4 (hydroxysteroiddehydrogenázy), AKR1D1 (steroid  $5\beta$ -reduktáza), rodina AKR6 (AKR6A3, A5 a A9; proteíny Kv $\beta$ ) a rodina AKR7 (AKR7A2 a AKR7A3; aflatoxínaldehýdreduktázy). Vyznačujú sa širokou substrátovou špecifitou a katalyzujú redukcii aldehydov vznikajúcich v metabolizme sacharidov a lipidov; ketosteroidov; ketoprostaglandínov a karcinogénov (napr. nitrozamínov odvodených od nikotínu, trans-dihydrodiolov PAU). Mnohé z týchto zlúčenín sú vysoko elektrofilné, môžu interagovať s proteínmi, nukleovými kyselinami a inými makromolekulami, čo môže následne viesť k poškodeniu buniek a k apoptóze. Preto AKR zohrávajú veľmi dôležitú úlohu pri ich redukcii na menej toxické alkoholové formy.

**Karbonylreduktázy (CBR)** patria do triedy NAD(P)H-závislých oxidoreduktáz, ktoré sú súčasťou rodiny dehydrogenáz/reduktáz s krátkym reťazcom (SDR). Pôvodne sa

predpokladalo, že CBR patria do rodiny AKR na základe funkčnej aktivity. Neskôr sa však ukázalo, že sú členmi rodiny SDR na základe štruktúrnej podobnosti enzýmov.

CBR katalyzujú redukciu aldehydových a ketoskupín veľkého počtu biologicky a farmakologicky aktívnych substrátov, ako sú prostaglandíny, steroidy, pteríny, biogénne amíny a chinóny odvodené od PAU, a chemoterapeutík (napr. daunorubicín a doxorubicín). Chinóny môžu byť transformované jednoelektrónovou redukciou na toxický semichinónový radikál, ktorý môže reagovať s kyslíkom za vzniku superoxidového aniónového radikálu, alebo dvojelektrónovou redukciou na hydrochinóny, čo vedie k oxidačnému stresu. CBR sa podieľajú na metabolizácii niektorých substrátov, ktoré sú tiež metabolizované inými enzýmami redukujúcimi karbonyl, ako sú napríklad aldehydoreduktázy a alkoholdehydrogenázy.

### **3.5. ENZÝMY PODIEĽAJÚCE SA NA HYDROLÝZE XENOBIOTÍK**

Hydrolýza je proces štiepenia xenobiotika pôsobením vody. Prebieha v cytosóle a v hladkom ER buniek mnohých tkanív, ako sú pečeň, tenké črevo, obličky, pľúca atď. Uplatňuje sa u zlúčenín obsahujúcich esterovú alebo amidovú väzbu, pričom vznikajú príslušné karboxylové kyseliny, alkoholy alebo amíny, ktoré obsahujú skupiny dôležité pre konjugčné reakcie. Vo všeobecnosti je enzymatická hydrolýza amidov pomalšia ako hydrolýza esterov. Hydrolytické reakcie sú dôležité aj pre metabolizáciu epoxidov tvorených systémom CYP.

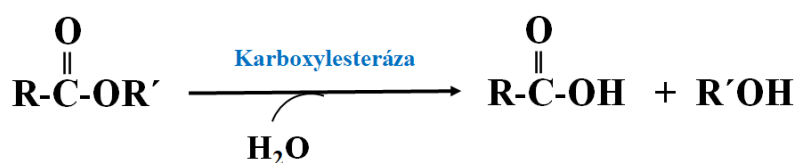
Estery a amidy sú hydrolyzované pôsobením karboxylesteráz, medzi ktoré sa zaraďujú cholinesterázy, pseudocholinesterázy, arylkarboxylesterázy, hepatálne mikrozomálne karboxylesterázy. Okrem karboxylesteráz sa na hydrolýze xenobiotík podieľajú tiež arylsulfatázy, epoxidhydroxylázy, cysteínové a serínové endopeptidázy.

Hydrolytické reakcie sa líšia od oxidačných a redukčných reakcií v troch aspektoch:

- reakcia nezahŕňa zmenu oxidačného stavu substrátu,
- substrát podlieha veľkej zmene, nakoľko pri hydrolýze dochádza k odštiepeniu relatívne veľkého fragmentu (fragmentov) z jeho molekuly,
- hydrolytické enzýmy, ktoré metabolizujú xenobiotiká, sú tie isté, ktoré pôsobia na endogénne substráty a ich aktivita sa neobmedzuje len na pečeň; nachádzajú sa v mnohých iných orgánoch, vrátane obličiek a čreva.

### 3.5.1. Karboxylesterázy

Karboxylesterázy (CES, EC 3.1.1.1) sú členmi rodiny  $\alpha,\beta$ -serínových hydroláz. Tieto enzýmy katalyzujú hydrolýzu esterov (Obr. 14), tioesterov, karbamátov a amidov a zohrajú dôležitú úlohu v metabolizme rôznych endobiotík a xenobiotík.



**Obrázok 14** Hydrolýza esteru katalyzovaná CES. CES katalyzujú reakciu vody s esterovou skupinou, pričom vzniká karboxylová kyselina a alkohol, ktoré sú polárnejšie zlúčeniny ako pôvodný ester.

Väčšina CES sú intracelulárne proteíny nachádzajúce sa prevažne v mikrozomálnej frakcii ER a niektoré CES sú sekretované z buniek. Cicavčie CES sa rozdeľujú do piatich rodín (CES1-5) na základe homologickej aminokyselinovej sekvencie. U ľudí patrí väčšina identifikovaných CES do podrodín CES1 a CES2. CES1 je vysoko exprimovaná v pečeni a v menšej miere v pľúcach a v mozgu. CES1 je substrátovo selektívna voči karboxyesterom s veľkým acylom a malým alkoholom. CES2 je vysoko exprimovaná v čreve, obličkách a v pečeni a je účinnejšia pri metabolizácii zlúčenín s malým acylom a veľkým alkoholom. CES sa vyznačujú širokou a prekrývajúcou sa substrátovou špecifitou, čo vyplýva z veľkého prispôsobiteľného aktívneho miesta, ktoré umožňuje vstup mnohých štruktúrne rôznorodých substrátov. CES hydrolyzujú substráty viacstupňovým katalytickým mechanizmom, ktorý je konzervovaný u všetkých serínových hydroláz a je závislý od katalytickej triády (serín, histidín a kyselina glutámová) v aktívnom mieste enzýmu.

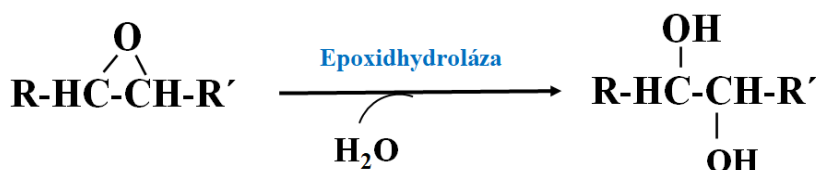
Mnohé environmentálne toxické látky, lieky a nelegálne drogy sú hydrolyzované prostredníctvom CES. Príklady zahŕňajú pyretroidné insekticídy, ftaláty, chemoterapeutiká a narkotiká, ako je kokaín a heroín. Podieľajú sa tiež na metabolizme lipidov a sú zodpovedné za hydrolýzu endogénnych esterov, ako sú triacylglyceroly, estery cholesterolu a ďalšie endogénne lipidy.

CES sa podieľajú na metabolizácii niektorých antikoagulantov, inhibítorov enzýmu konvertujúceho angiotenzín, antihyperlipidemík, antivirov, chemoterapeutík, imunosupresív a psychoaktívnych liekov. CES nielen inaktivujú/metabolizujú lieky (približne 20% liekov) za vzniku neaktívnych metabolitov (napr. lidokaín a loteprednolum etabonát), ale tiež aktivujú

prolieky (cca. 50% proliekov) na farmakologicky aktívne (napr. irinotekan). CES1 aj CES2 zohrávajú dôležitú úlohu pri „prvom-prechode“ niektorých liekov hydrolyzovaných CES, a tým ovplyvňujú ich biologickú dostupnosť pred vstupom do systémovej cirkulácie. V súčasnosti sa veľký záujem venuje charakterizácii potenciálnych inhibítorov CES, ktoré by sa mohli použiť ako koliečivá modulujúce hydrolyzu esterových liekov s cieľom zlepšenia účinnosti alebo zmiernenia toxicity liekov prostredníctvom zmeny ich farmakokinetických profilov. Navyše, genetické faktory, choroby a liekové interakcie môžu zmeniť aktivitu týchto enzýmov a významne ovplyvniť terapeutické účinky liekov metabolizovaných CES.

### 3.5.2. Epoxidhydrolázy

Epoxidhydrolázy (EH, EC 3.3.2.3) predstavujú rodinu hydrolytických enzýmov, ktoré tiež zahŕňajú esterázy, proteázy, dehalogenázy a lipázy. U cicavcov bolo charakterizovaných päť tried EH. *Ephx1* a *Ephx2* kódujú mikrozomálne (mEH, EC 3.3.2.9) a rozpustné (sEH, EC 3.3.2.10) EH. sEH aj mEH sa vyznačujú nízkou sekvenčnou homológiou a obe patria do rodiny  $\alpha/\beta$ -fold hydroláz na základe štruktúrnych podobností. Ďalšími enzýmami zaradenými medzi EH sú cholesterolepoxidhydroláza, leukotrién A4-hydroláza a hepoxilín A3-hydroláza. EH sú exprimované takmer u všetkých živých organizmov. Vysoká aktivita sEH bola zistená v pečeni, obličkách a v cievach tkanív. Mikrozomálne EH sú vysoko exprimované v pečeni, pľúcach, obličkách, črevách, mozgu, prostate, srdci a v semenníkoch. EH katalyzujú hydrolyzu epoxidov za vzniku vicinálnych (t.j. susedných) trans-dihydrodiolov (Obr. 15).



**Obrázok 15** Hydrolyza epoxidu katalyzovaná EH za vzniku trans-dihydrodiolu

EH sa líšia substrátovou špecifitou, mEH preferujú toxické epoxidy xenobiotík a sEH preferujú epoxidy endogénnych lipidov a vo všeobecnosti dopĺňajú mEH v ich xenobioticko-metabolizačnej aktivite. CYP (u ľudí predovšetkým izoenzýmy CYP2C a 2J) metabolizujú karboxylové kyseliny, ako je kyselina arachidónová, kyselina linolová, kyselina eikozapentaénová a kyselina dokozaheptaénová na biologicky aktívne epoxy-karboxylové

kyseliny (EpFA; ako sú epoxyeikozatriénové kyseliny, epoxyoctadekamonoénové kyseliny, epoxyeikozatetraénové kyseliny a epoxydokozapentaénové kyseliny). Tieto epoxidy majú v organizme významné fyziologické účinky (napr. vazodilatačné, protizápalové, angiogénne a antiapoptotické), majú krátky biologický polčas života, a sú inaktivované sEH na menej aktívne a menej toxické dioly.

mEH sa podieľajú na účinnej detoxikácii mnohých reaktívnych epoxidov, ako sú metabolity PAU; epoxidy vznikajúce z antikonvulzívnych liekov (karbamazepín-10,11-epoxid); prokarcinogénne zlúčeniny (napr. styrén-7,8-oxid); epoxidové deriváty butadiénu, aflatoxínu B1, benzénu, naftalénu, antracénu atď. Detoxikačnú aktivitu ľudskej mEH je možné určiť na základe jej schopnosti eliminovať styrén-7,8-oxid. Je to hlavný genotoxický metabolit vznikajúci v pečeni metabolizáciou exogénneho, v priemysle tvoreného styrénu prostredníctvom CYP. Styren-7,8-oxid je účinne metabolizovaný mEH na menej toxický metabolit fenylglykol. Endogénne tvorený styren-7,8-oxid je účinne hydrolyzovaný ihneď po vytvorení bez opustenia pečene, zatiaľ čo styren-7,8-oxid exogénneho pôvodu sa musí najprv dostať do pečene cirkuláciou.

Za určitých okolností sa však mEH podieľajú na bioaktivácii substrátov, ako napríklad pri metabolizácii benzo[a]pyrénu (kapitola 6.1). Benzo[a]pyrén je metabolizovaný CYP1A1 a/alebo CYP1B1 na benzo[a]pyrén-7,8-epoxid, ktorý následne podlieha selektívnej hydrolýze katalyzovanej mEH za vzniku benzo[a]pyrén-7,8-dihydrodiolu. Vznikajúci dihydrodiol by mal byť následne eliminovaný enzýmami II. fázy biotransformácie, avšak je dobrým substrátom pre sekundárnu epoxidáciu v polohe 9,10, čím vzniká ultimátny karcinogén benzo[a]pyrén-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid, ktorý však už nie je substrátom pre mEH. Okrem metabolizmu xenobiotík, sa mEH podieľajú na regulácii metabolizmu steroidov, transportu žľových kyselín a metabolizme vitamínu K.

Bolo popísaných niekoľko polymorfizmov vedúcich k zmene aktivity EH, k rozdielom v bioaktivácii prokarcinogénov a v konečnom dôsledku k zmene náchylnosti na vznik nádorových ochorení. V prípade mEH ide o dva SNP, jeden v exóne 3 (337T>C) a druhý v exóne 4 (415A>G). 337T>C SNP spôsobuje substitúciu tyrozínu za histidín v pozícii 113 (Tyr113His) vedúcu k zníženiu enzýmovej aktivity o 40%. 415A>G SNP vedie k zámene histidínu za arginín v pozícii 139 (His139Arg) a zvyšuje enzýmovú aktivitu o 25%. V prípade sEH sa potvrdila asociácia medzi vybranými SNP (Lys55Arg a Arg287Gln) a rizikom vzniku aterosklerózy a kardiovaskulárnych ochorení.



## 4. ENZÝMY II. FÁZY BIOTRANSFORMÁCIE

Enzýmy II. fázy biotransformácie katalyzujú konjugáčné reakcie, pri ktorých dochádza k väzbe inkorporovanej funkčnej skupiny xenobiotika s malými, endogénnymi molekulami (konjugáčné činidlo, Tab. 7). Konjugáčné reakcie sú biosyntetické reakcie, endergonické, preto je potrebné dodať energiu. Vo väčšine prípadov, reakcie II. fázy biotransformácie znižujú biologickú aktivitu a teda aj toxicitu molekúl. Na druhej strane, je však potrebné si uvedomiť, že môžu viesť k tvorbe toxických metabolitov. Vznikajúce hydrofilné zlúčeniny sa ľahšie odstraňujú z organizmu prostredníctvom moču alebo žlče. Na rozdiel od enzýmov I. fázy, ktoré slúžia na aktiváciu metabolitov, enzýmy druhej fázy deaktivujú a detoxikujú xenobiotiká a preto sa označujú ako detoxikačné enzýmy.

Konjugáčné reakcie sa rozdeľujú na dva základné typy reakcií:

- *typ I* (napr. glukuronidácia, sulfonácia) – aktivované konjugáčné činidlo reaguje so substrátom a vedie k tvorbe konjugovaného produktu,
- *typ II* (konjugácia s aminokyselinami) – najskôr je aktivovaný substrát a až potom sa konjuguje s aminokyselinou a vytvára sa konjugovaný produkt.

**Tabuľka 7** Hlavné konjugáčné reakcie II. fázy biotransformácie

| Typ konjugácie           | Aktivované konjugáčné činidlo          | Transferáza (lokalizácia)  | Substráty podliehajúce konjugácii                                  |
|--------------------------|--|----------------------------|--|
| Glukuronidácia           | Kyselina UDP- $\alpha$ -D-glukurónová  | UDP-glukuronyltransferáza  | Fenoly, alkoholy, karboxylové kyseliny, hydroxylamíny, sulfonamíny |
| Acetylácia               | Acetyl-CoA                             | N-acetyltransferáza        | Amíny  |
| Konjugácia s glutatiónom | Glutatión (cysteín)                    | Glutatión-S-transferáza    | Epoxidy, arénoksidy, hydroxylamíny, nitroskupiny                   |
| Sulfonácia               | 3'-fosfoadenozyl-5'-fosfosulfát (PAPS) | Sulfotransferáza           | Fenoly, alkoholy, aromatické amíny                                 |
| Konjugácia s glycínom    | Glycín                                 | Acyl-CoA-glycíntransferáza | Acyl-CoA deriváty karboxylových kyselín                            |
| Metylácia                | S-adenozylmetionín                     | Metyltransferázy           | Katecholamíny, fenoly, amíny                                       |

Hlavnými enzýmami II. fázy biotransformácie sú UGT, GST a SULT.

## 4.1. UDP-GLUKURONYLTRANSFERÁZY

UDP-glukuronyltransferázy (UGT, EC 2.4.1.17) patria do veľkej rodiny enzýmov UDP-glykozyltransferáz, ktoré katalyzujú transfer glykozylového zvyšku z donora UDP-glykozyl na lipofilné molekuly. UGT sú hlavnými enzýmami II. fázy biotransformácie a katalyzujú reakciu, ktorá sa označuje ako glukuronidácia. Ide o transfer kyseliny glukurónovej z kyseliny UDP- $\alpha$ -D-glukurónovej na alifatickú alkoholovú, fenolovú a karboxylovú skupinu, aromatické a alifatické amíny, tioly a kyslé atómy uhlíka hydrofóbných zlúčenín. Glukuronidácia slúži na elimináciu značného počtu rôznorodých exogénnych (napr. analgetiká, nesteroidné protizápalové lieky, antikoluvizíva, antipsychotiká, antivirotiká, environmentálne zlúčeniny, polutanty), ako aj endogénnych (napr. bilirubín, žľčové kyseliny, mastné kyseliny, steroidné hormóny, hormóny štítnej žľazy a vitamíny rozpustné v tukoch) zlúčenín. UGT sa vyznačujú odlišnou, ale čiastočne sa prekrývajúcou špecifitou voči substrátom a inhibítormi.

### 4.1.1. Klasifikácia a charakterizácia UGT

Ľudské UGT sa na základe evolučnej divergencie rozdeľujú do štyroch rodín, a to UGT1, UGT2, UGT3 a UGT8. Z hľadiska biotransformácie najvýznamnejšiu úlohu zohrávajú UGT1 a UGT2, preto sa ďalej budeme zaoberať len týmito enzýmami. UGT1 a UGT2 sa delia do troch podrodín, UGT1A, UGT2A a UGT2B. V rámci jednej rodiny sa gény kódujúce enzýmy vyznačujú 50% homologickou sekvenciou DNA a v podrodine približne 60%. Rodiny UGT sa označujú arabskými číslicami (napr. UGT1) a potom nasleduje označenie podrodiny pomocou veľkého písmena (napr. UGT1A). Individuálne gény sú označené arabskou číslicou (napr. *UGT1A1*).

Génový klaster ľudskej *UGT1A* sa nachádza na chromozóme 2q37 a obsahuje viaceré jedinečné exóny, ako aj konzervované exóny 2-5, z ktorých môže vzniknúť deväť typov funkčných izoform UGT1A (*UGT1A1*, *UGT1A3*-*UGT1A10*). *UGT1A2*, *UGT1A11*, *UGT1A12* a *UGT1A13* sú pseudogény a nekódujú funkčné proteíny. Gény *UGT2A* a *UGT2B* sa nachádzajú na chromozóme 4q13 a kódujú tri a sedem funkčných proteínov. *UGT2A1* a *UGT2A2* vznikajú alternatívnym zostrihom. *UGT2A3* a všetky izoformy *UGT2B* (*UGT2B4*, *UGT2B7*, *UGT2B10*, *UGT2B11*, *UGT2B15*, *UGT2B17* a *UGT2B28*) sú kódované jednotlivými génmi. Tabuľka 8 sumarizuje všeobecné substráty UGT a ich lokalizáciu v tkanivách.

**Tabuľka 8** Tkanivová lokalizácia a substrátová špecifita ľudských UGT izoform

| UGT izoenzy | Lokalizácia v tkanive               | Preferované substráty                    |
|-------------|-------------------------------------|--|
| UGT1A1      | Pečeň, žlčník, tenké črevo          | Fenoly, flavonoidy                       |
| UGT1A3      | Pečeň, žlčník,                      | Fenoly, alkylamíny a arylamíny           |
| UGT1A4      | Pečeň, žlčník, tenké črevo          | Fenoly, alkoholy, alkylamíny a arylamíny |
| UGT1A5      | Neznáma                             | Neznáme                                  |
| UGT1A6      | Pečeň, žlčník, žalúdok, tenké črevo | Fenoly                                   |
| UGT1A7      | Žalúdok, tenké črevo                | Neznáme                                  |
| UGT1A8      | Tenké črevo                         | Fenoly                                   |
| UGT1A9      | Pečeň                               | Fenoly, karboxylové kyseliny             |
| UGT1A10     | Žlčník, žalúdok, tenké črevo        | Fenoly, amíny                            |
| UG2B4       | Pečeň                               | Neznáme                                  |
| UGT2B7      | Pečeň, tenké črevo, obličky         | Fenoly, alkoholy                         |
| UGT2B10     | Pečeň                               | Neznáme                                  |
| UGT2B11     | Prostata, pečeň, obličky            | Neznáme                                  |
| UGT2B15     | Pečeň, prostata, prsník             | Fenoly                                   |
| UGT2B17     | Prostata                            | Fenoly                                   |

UGT1A1 je zodpovedný za konjugáciu bilirubínu, ktorý vzniká pri degradácii hému. Strata alebo zníženie aktivity UGT1A1 vedie k zvýšeniu hladín nekonjugovaného bilirubínu v sére a k rozvoju nekonjugovanej hyperbilirubinémie u Crigler-Najjarovho a Gilbertovho syndrómu. UGT1A1 je dôležitý pre konjugáciu niektorých estrogénov, ako sú katecholestrogény, 17 $\beta$ -estradiol, 2-hydroxyestrón, 2-hydroxyestradiol, 2-metoxysteradiol a etinylestradiol.

Substrátmi UGT1A3 sú žľozové kyseliny, estrogény, metabolity vitamínu D, xenobiotiká a lieky (napr. PAU, amíny, nesteroidné protizápalové lieky, statíny). UGT1A4 katalyzuje N-glukuronidáciu terciárnych a čiastočne primárnych amínov. Endogénnymi substrátmi UGT1A4 sú progestíny (napr. 5 $\alpha$ -pregnán-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol), dihydrotestosterón, androsterón a 25-hydroxyvitamín D<sub>3</sub>. Konjuguje tiež xenobiotiká, ako sú saponíny, nikotín a od nikotínu odvodený karcinogén nitrozamín 4-(metylnitrozamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanón.

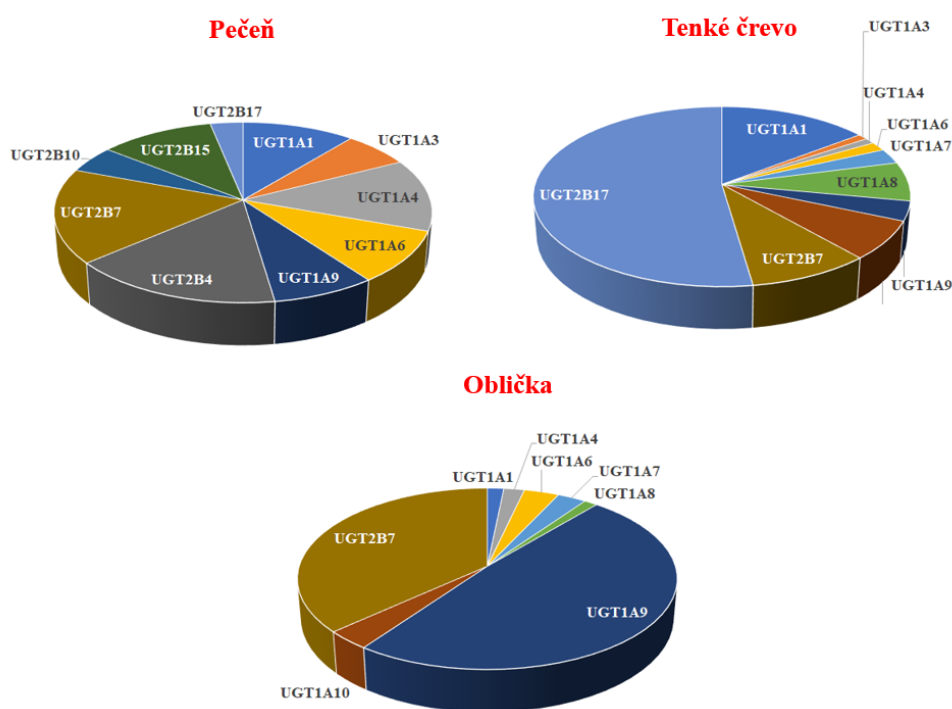
UGT1A6 katalyzuje glukuronidáciu planárnych fenolov ( $\alpha$ -naftolu a 4-nitrofenolu) a jeho selektívnym endogénnym substrátom je sérotonín. UGT1A7 metabolizuje rôzne karcinogény, napríklad hydroxylované benzo[a]pyrény. UGT1A8 konjuguje katecholestrogény, kumaríny, flavonoidy, antrachinóny a fenoly. UGT1A9 a UGT1A10 vykazujú široké spektrum substrátovej špecifity od fenolov, steroidov, karboxylových kyselín, až po lieky vrátane chemoterapeutík.

UGT2B4 sa podieľa na konjugácii žľozových kyselín, katecholestrogénov, metabolitov androgénu a konjuguje kodeín, morfin a zidovudín, ktoré sú tiež substrátmi UGT2B7. UGT2B7 je pravdepodobne najdôležitejšou izoformou, pretože konjuguje približne 35% užívaných

liekov. Dôležitými endogénnymi substrátmi UGT2B7 sú žľové kyseliny; estrogény a katecholestrogény; androgény a ich metabolity; mineralokortikoidy, glukokortikoidy a ich metabolity; karboxylové kyseliny a kyselina retinová.

UGT2B10 katalyzuje N-glukuronidáciu nitrózamínov prítomných v tabaku. UGT2B11 katalyzuje glukuronidáciu 3 $\alpha$ -hydroxysteroidov. UGT2B15 sa podieľa na glukuronidácii androgénov, ich metabolitov a katecholestrogénov. UGT2B17 metabolizuje a inaktivuje dihydrotestosterón, testosterón a androsterón.

UGT sú exprimované v rôznych ľudských tkanivách (Tab. 8), ale najmä v tých, ktoré sú v bezprostrednom kontakte s xenobiotikami, ako sú pečeň, črevá a obličky (Obr. 16). V dôsledku vysokej podobnosti v štruktúre rôznych UGT izoenzýmov, je ťažké pripraviť UGT-špecifické protilátky. V pečeni sú exprimované UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B7 a UGT2B15. Žiadna, respektíve veľmi nízka expresia v pečeni bola pozorovaná u UGT1A5, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A10, UGT2A1 a UGT2A2. Rôzna úroveň expresie UGT1A a UGT2B bola dokázaná aj v iných tkanivách ako sú obličky, tenké črevo, hrubé črevo, žalúdok, pľúca, vaječníky, semenníky, prostata atď. Expresia jednotlivých UGT tiež vykazuje interindividuálnu variabilitu vzhľadom na vek, pohlavie, induktory enzýmov a génové polymorfizmy.



**Obrázok 16** Relatívna expresia UGT v pečeni, tenkom čreve a v obličkách (prevzaté z Kasteel a kol., Arch Toxicol. 94: 2637-2661, 2020)

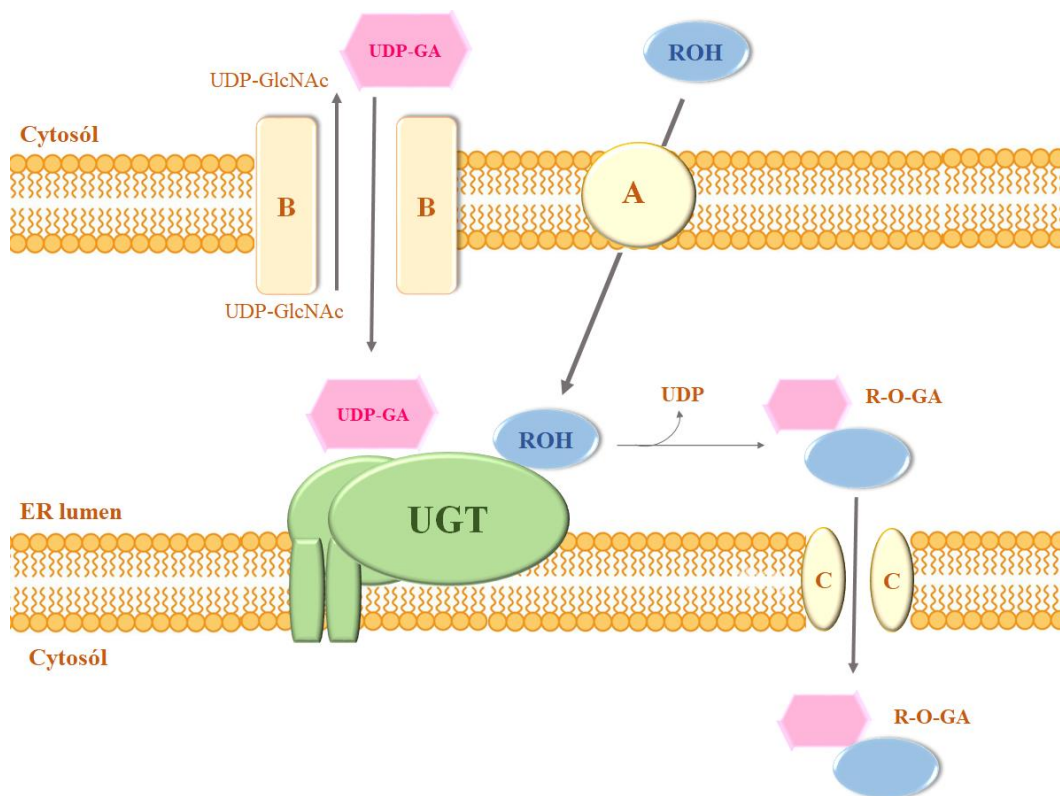
#### 4.1.2. Štruktúra UGT

UGT sú membránové glykoproteíny lokalizované najmä v hladkom ER, a v menšej miere sú prítomné v jadre a v Golgiho aparáte. UGT obsahujú N- a C-koncovú doménu. Sú syntetizované ako prekursorové molekuly obsahujúce približne 530 aminokyselinových zvyškov a N-koncový signálny peptid. Tento signálny peptid zabezpečuje nasmerovanie polypeptidového reťazca do ER, pričom následne dochádza k jeho odštiepeniu a N-glykozyľácii proteínu. Zrelý proteín s približne 505 aminokyselinovými zvyškami je klasifikovaný ako transmembránový proteín ER typu I s luminálnou a cytoplazmatickou doménou. Luminálnu doménu tvorí približne 95% polypeptidového reťazca a cytoplazmatickú doménu len 20 aminokyselinových zvyškov. Konzervovaná oblasť 17 hydrofóbnych zvyškov medzi N-koncovým asparagínom a C-koncovým lyzínom spája tieto dve domény v lipidovej dvojvrstve ER.

Aktívne miesto UGT je lokalizované na luminálnej strane membrány ER. Doména viažuca UDP-sacharid je umiestnená smerom k C-koncu. C-koncová doména UGT je vo všeobecnosti viac konzervovaná a obsahuje tiež transmembránovú doménu, ktorá ukotvuje enzým v membráne. Substrát (aglykón) viažuca doména je umiestnená smerom k N-koncu proteínu. Napriek intenzívnemu výskumu, sekundárna a terciárna štruktúra UGT, ako aj zodpovedajúca topológia membrány sú neznáme, z dôvodu značných ťažkostí s izoláciou a purifikáciou plne aktívnych UGT.

Ľudské UGT tvoria homo- a hetero-oligoméry, ako sú diméry, triméry a tetraméry. Predpokladá sa, že dimerizácia medzi dvoma rôznymi monomérmi UGT môže viesť k vytvoreniu nového miesta pre väzbu substrátu, ktorý sa v homodimérnej forme nevyskytuje a tým dochádza k zvýšeniu metabolickej kapacity UGT.

Keďže aktívne miesto UGT sa nachádza na luminálnej strane membrány ER, predpokladá sa, že prenos nabitých UDP-sacharidov z cytosólu, kde sú syntetizované, do lumenu ER je sprostredkovaný transportnými proteínmi. A následne, aj odstránenie nabitých glukuronidov z luminálneho priestoru ER do cytosólu sprostredkovávajú transportné proteíny (Obr. 17).



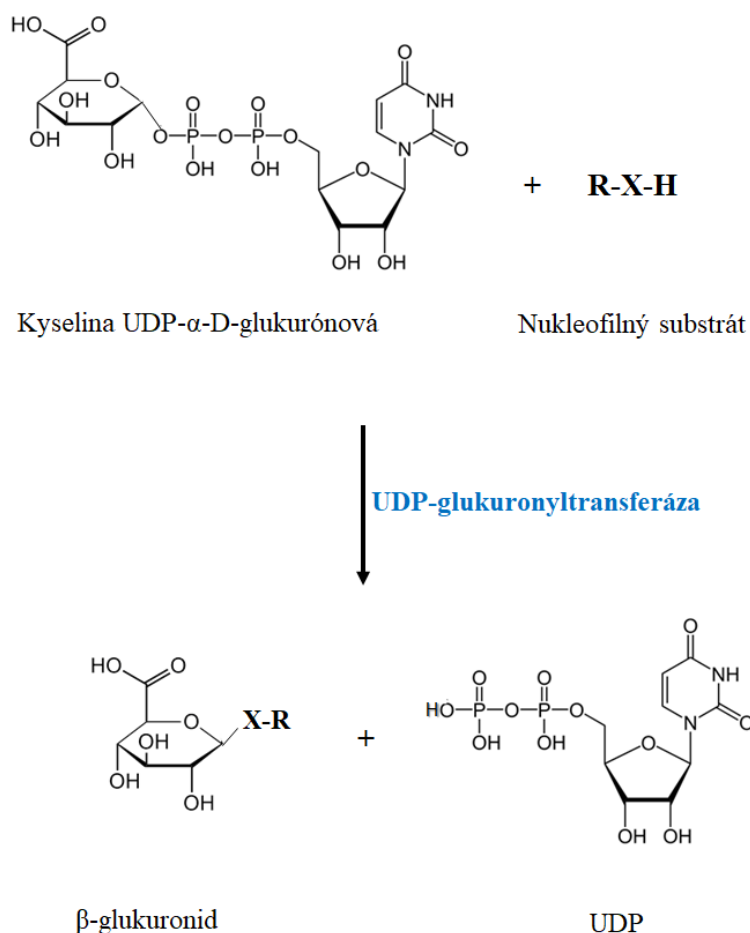
**Obrázok 17** Glukuronidačný systém ER. (A) Do lumenu ER vstupuje substrát (ROH) prostredníctvom difúzie. (B) Kyselina UDP-glukurónová (UDP-GA) vstupuje do lumenu ER prostredníctvom antiportéra UDP-GA/UDP-GlcNAc. Po konjugácii katalyzovanej UGT, sú glukuronidované produkty (R-O-GA) odstránené z lumenu ER pomocou transportéra glukuronidov (C) (prevzaté z Liu Y a Coughtrie MWH. *Pharmaceutics*. 9: 32, 2017).

Pozn. UDP-GlcNAc, uridín-5'-difosfát N-acetylglukozamín

#### 4.1.3. Katalytická aktivita UGT

UGT katalyzujú konjugáciu kyseliny glukurónovej, ktorej donorom je kyselina UDP- $\alpha$ -D-glukurónová, na nukleofilnú funkčnú skupinu substrátu, ktorý je vo forme aglykónu, za vzniku vo vode rozpustných  $\beta$ -glukuronidov a uridín-5'-difosfátu (UDP, Obr. 18). Aryl, alkyl, enol a acyl hydroxylové skupiny sú glukuronidované za vzniku O-glukuronidov (esterového alebo éterového typu). N-glukuronidy vznikajú z amidov a sulfonamidov. S- a C-glukuronidy vznikajú raritne z tiolov a enol atómu uhlíka.

Syntéza esenciálneho substrátu glukuronidačných reakcií, kyseliny UDP- $\alpha$ -D-glukurónovej prebieha v cytosóle hepatocytu oxidáciou UDP-glukózy katalyzovanou enzýmom UDP-glukóza-6-dehydrogenázou (UGDH, EC 1.1.1.22), v dvoch po sebe nasledujúcich krokoch vyžadujúcich  $\text{NAD}^+$ .



**Obrázok 18** Konjugačná reakcia katalyzovaná UGT

Pozn. nukleofilný substrát, X = O, COO, S, NH, NR. Uridín-5'-difosfát, UDP

Predpokladá sa, že glukuronidácia prebieha mechanizmom podobným bimolekulárnej nukleofilnej substitúcii ( $S_N2$ ), kedy nukleofilná skupina aglykónu atakuje anomérny uhlík kyseliny UDP-α-D-glukurónovej. Dôležitú katalytickú úlohu pri týchto reakciách zohrávajú aminokyseliny aspartát a histidín, ktoré aktivujú hydroxylovú skupinu aglykónu na nukleofilný atak. Histidín je bázou a akceptuje protón z hydroxylovej skupiny aglykónu. Konzervovaná kyslá aminokyselina aspartát stabilizuje protónovaný histidín mechanizmom „nabíjacie relé“. Záporný náboj na β-fosfátovej skupine uvoľneného UDP je stabilizovaný ďalším histidínovým zvyškom. Histidín-aspartátová katalytická dyáda je medzi ľudskými UGT vysoko konzervovaná. Pre aktivitu UGT1A9 sú esenciálne histidín 37 a aspartát 143, pre UGT1A6 histidín 38 a aspartát 150 a UGT2B7 histidín 35 a aspartát 151. Pri UGT katalyzujúcich N-glukuronidáciu, konkrétne UGT1A4 a UGT2B10, katalytickú úlohu histidínu nahrádza prolínový alebo leucínový zvyšok.

#### 4.1.4. Genetické variácie UGT a nádorové ochorenia

Zmeny aktivity UGT potenciálne ovplyvňujú fyziologický stav organizmu, ako aj metabolickú rovnováhu a toxicitu exogénnych a endogénnych látok. Ako už bolo niekoľkokrát vyššie spomínané, UGT sa podieľajú na konjugácii širokej škály rôznorodých substrátov, z ktorých mnohé zohrávajú dôležitú úlohu v procese karcinogenézy. Bol identifikovaný značný počet *UGT1A* a *UGT1B* génových polymorfizmov, ktoré ako sa ukázalo, modulujú aktivitu promótoru *UGT* génu alebo enzýmovú aktivitu UGT (Tab. 9). Predpokladá sa, že výsledkom je nižšia schopnosť UGT konjugovať karcinogény a s tým spojené zvýšené riziko vzniku nádorových ochorení.

Pomerne veľký počet štúdií skúmal túto hypotézu a identifikovali niektoré polymorfizmy *UGT* génov ako rizikové faktory pre vznik karcinómu močového mechúra, karcinómu prsníka, kolorektálneho karcinómu, karcinómu endometria, karcinómu pažeráka, karcinómu hlavy a krku, karcinómu pečene, karcinómu pľúc, karcinómu prostaty atď.

Najintenzívnejšie študovaným *UGT* SNP je polymorfný génový lokus *UGT1A1*. Promótorová oblasť (TATA box) *UGT1A1* génu obsahuje polymorfné miesto s variabilným počtom (od 5 do 9) dinukleotidových repetícií (TA). Medzi počtom dinukleotidových repetícií a enzýmovou aktivitou UGT1A existuje inverzná korelácia. Najbežnejší genotyp v populácii je 6/6 *UGT1A1*\*1, charakterizovaný šiestimi homozygotnými dinukleotidovými repetíciami. Prítomnosť 7/7 *UGT1A1*\*28 genotypu, typická pre pacientov s Gilbertovým syndrómom, je charakteristická len 30-50% účinnosťou glukuronidácie oproti normálu.

Genotyp *UGT1A1*\*28 sa spája so zníženou elimináciou SN-38, ktorý je aktívnym metabolitom irinotekanu, ktorý sa používa na liečbu kolorektálneho karcinómu. Chýbajú poznatky o klinickom význame ostatných variantov (5/5, 8/8 a 9/9 tandemových opakovaní). Frekvencia výskytu jednotlivých variantných alel je heterogénna s najvyšším výskytom u africkej populácie (23%), stredným u kaukazskej populácie (11-13%) a s najnižším výskytom u ázijskej populácie (3%). Ďalšie popísané polymorfizmy *UGT1A* sa väčšinou vyskytujú v exónoch 1-5, ale prítomné sú aj v intrónoch. Polymorfizmy v exóne 1 *UGT1A1*\*6 (G71R), *UGT1A1*\*7 (Y486D) a *UGT1A1*\*27 (P229Q) významne prispievajú k miernej až stredne závažnej hyperbilirubínemii. Polymorfizmy v géne *UGT1A7* môžu zvyšovať riziko toxicity, nakoľko genotypy *UGT1A7*\*3 a *UGT1A7*\*4 sa spájajú s podstatne nižšou metabolizáciou benzo[a]pyrénu v porovnaní s genotypmi *UGT1A7*\*1 a *UGT1A7*\*2.



**Tabuľka 9** Génové polymorfizmy ľudských UGT

|                   | Nukleotidová zámena                         | Zmena aminokyseliny     |
|-------------------|---|-------------------------|
| <b>UGT1A1</b>     |   |                         |
| <i>UGT1A1</i> *1  | Divý typ                                    | Žiadna                  |
| <i>UGT1A1</i> *6  | G <sup>211</sup> A                          | Gly <sup>71</sup> →Arg  |
| <i>UGT1A1</i> *7  | T <sup>1456</sup> G                         | Tyr <sup>486</sup> →Asp |
| <i>UGT1A1</i> *27 | C <sup>686</sup> A                          | Pro <sup>229</sup> →Gln |
| <i>UGT1A1</i> *28 | TAATA7                                      | Transkripcia            |
| <b>UGT1A3</b>     |   |                         |
|                   | A <sup>17</sup> G                           | Gln <sup>6</sup> →Arg   |
|                   | T <sup>31</sup> C                           | Trp <sup>11</sup> →Arg  |
|                   | C <sup>133</sup> T                          | Arg <sup>45</sup> →Trp  |
|                   | T <sup>140</sup> C                          | Val <sup>47</sup> →Ala  |
| <b>UGT1A4</b>     |   |                         |
|                   | C <sup>70</sup> A                           | Pro <sup>24</sup> →Thr  |
|                   | T <sup>142</sup> G                          | Leu <sup>48</sup> →Val  |
|                   | C <sup>31</sup> T                           | Arg <sup>11</sup> →Trp  |
| <b>UGT1A6</b>     |   |                         |
|                   | T <sup>19</sup> G                           | Ser <sup>7</sup> →Ala   |
|                   | G <sup>269</sup> A                          | Arg <sup>90</sup> →His  |
|                   | C <sup>308</sup> A                          | Ser <sup>103</sup> →X   |
|                   | A <sup>541</sup> G                          | Thr <sup>181</sup> →Ala |
|                   | A <sup>552</sup> C                          | Arg <sup>184</sup> →Ser |
| <b>UGT1A7</b>     |   |                         |
|                   | G <sup>343</sup> A                          | Gly <sup>115</sup> →Ser |
|                   | T <sup>387</sup> G                          | Asn <sup>129</sup> →Lys |
|                   | C <sup>391</sup> A                          | Arg <sup>131</sup> →Lys |
|                   | G <sup>392</sup> A                          | Arg <sup>131</sup> →Lys |
|                   | G <sup>514</sup> C                          | Glu <sup>139</sup> →Asp |
|                   | T <sup>622</sup> C                          | Trp <sup>208</sup> →Arg |
| <b>UGT1A8</b>     |   |                         |
| <i>UGT1A8</i> *2  | C <sup>518</sup> G                          | Ala <sup>173</sup> →Gly |
| <i>UGT1A8</i> *3  | G <sup>830</sup> A                          | Gly <sup>277</sup> →Tyr |
| <b>UGT1A9</b>     |   |                         |
|                   | -109 do -98 A(T) <sub>n</sub> AT;<br>n=9/10 |                         |
|                   | G <sup>8</sup> A                            | Cys <sup>3</sup> →Tyr   |
|                   | T <sup>98</sup> C                           | Met <sup>33</sup> →Thr  |
|                   | G <sup>153</sup> A                          | Arg <sup>51</sup> →Arg  |
|                   | G <sup>588</sup> T                          | Gly <sup>196</sup> →Gly |
|                   | T <sup>726</sup> G                          | Tyr <sup>242</sup> →X   |
|                   | G <sup>766</sup> A                          | Asp <sup>256</sup> →Asn |
| <b>UGT1A10</b>    |   |                         |
|                   | G <sup>177</sup> A                          | Met <sup>59</sup> →Ile  |
|                   | G <sup>415</sup> A                          | Glu <sup>139</sup> →Lys |
|                   | C <sup>605</sup> T                          | Thr <sup>202</sup> →Ile |
|                   | C <sup>719</sup> T                          | Cys <sup>240</sup> →Met |
|                   | C <sup>730</sup> A                          | Leu <sup>244</sup> →Ile |

UGT2B7 sa v pečeni podieľa na metabolizácii morfinu a liekov obsahujúcich karboxylové kyseliny. Bolo identifikovaných osem polymorfizmov v proximálnom promótoře *UGT2B7* (-66 T/C, -79 G/A, -102 T/C, -268 A/G, -842 G/A, -1054 T/C, -1241 T/C a -1248 A/G). Mnohé

z týchto polymorfizmov sa dedia spolu, avšak zatiaľ sa nepreukázalo, že by tieto polymorfizmy významne menili glukuronidáciu morfinu u ľudí.

Ako je známe, steroidné hormóny zohrávajú významnú úlohu pri vzniku karcinómu prsníka, endometria a karcinómu prostaty, preto polymorfizmy v *UGT* génoch metabolizujúcich estrogény (*UGT1A1*, *UGT1A6* a *UGT2B4*) a androgény (*UGT2B15* a *UGT2B17*) môžu zvyšovať riziko vzniku týchto nádorových ochorení. Génové polymorfizmy *UGT1A6*, *UGT1A7*, *UGT2B7* a *UGT2B17* vedú k nižšej metabolizácii karcinogénov prítomných v cigaretovom dyme a sú rizikovými faktormi pre vznik karcinómu pľúc, karcinómu orofaryngu a karcinómu močového mechúra. Podrobný zoznam *UGT* génových polymorfizmov je dostupný na stránke:

<https://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/ugt-alleles-nomenclature/>.

Okrem vyššie spomínaných genetických faktorov (SNP), expresia a aktivita *UGT* je ovplyvnená aj epigenetickými faktormi (DNA metylácia, acetylácia histónov atď.) a negenetickými regulačnými faktormi (jadrové receptory, signálne dráhy, stimulácia zápalu, patologické stavy). *UGT* enzýmy sú indukovateľné a ich expresia je regulovaná receptormi/transkripčnými faktormi, ktoré sú aktivované xenobiotikami, karcinogénmi, stresovými signálmi a hormónmi. Príkladom transkripčných faktorov, ktoré ovplyvňujú expresiu *UGT* je hepatocytový jadrový faktor 1 $\alpha$  a 4 (HNF1 $\alpha$  a HNF4, Hepatocyte Nuclear Factor Family), homeobox kaudálneho typu 2 (Cdx2, Caudal Homeodomain Factor) a Forkhead Box A1 (FOXA1), ktorý je hlavným regulátorom bazálnej a od hormónov-závislej aktivácie expresie *UGT*.

Medzi receptory ovplyvňujúce expresiu a funkčnú kapacitu *UGT* enzýmov sa zaraďujú aj vyššie spomínané receptory, a to AhR, CAR a PXR (kapitola 3.1.4). AhR indukuje *UGT1A6* a *UGT1A9*, CAR a PXR sprostredkujú indukciu *UGT1A1*. Ďalšími faktormi, ktoré môžu ovplyvniť aktivitu niektorých *UGT* enzýmov je životný štýl (strava, fajčenie atď.), vek, pohlavie, choroby a etnicita.

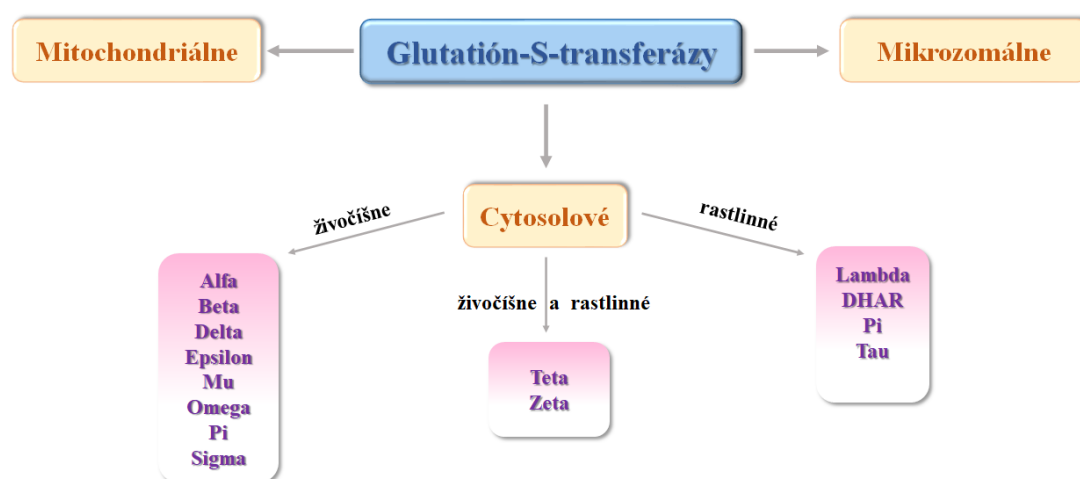
Bolo dokázané, že zvýšená expresia *UGT* v nádorových bunkách vedie k zvýšenej glukuronidácii a k rýchlejšej eliminácii protinádorových liekov, čo v konečnom dôsledku môže viesť k vzniku chemoresistencie. Detailná charakterizácia genetických variantov *UGT* by mala byť nápomocná pri farmakologickej optimalizácii terapie. Napríklad pacienti s genetickou predispozíciou nízkej aktivity *UGT1A1* majú zvýšené riziko toxicity pri liečbe irinotekanom a preto sa odporúča redukovať štartovaciu dávku lieku z dôvodu zvýšenia bezpečnosti pacienta.

Významný inhibičný alebo indukčný efekt na aktivitu *UGT* majú rôzne lieky, exogénne a endogénne látky, pričom niektoré z nich môžu byť zároveň metabolizované *UGT*. Príkladom

sú žľčové kyseliny, ktoré môžu byť metabolizované UGT1A3, UGT2B4 a UGT2B7, zároveň však pôsobia ako inhibítory takmer všetkých izoformiem UGT. Nakoľko sa izoformy UGT vyznačujú podobnou štruktúrou génu a proteínu, niektoré induktory aj inhibítory môžu pôsobiť na viacero izoformiem UGT. Mnohé induktory UGT môžu zvyšovať expresiu aj iných biotransformačných enzýmov, napríklad CYP. Je potrebné si uvedomiť, že interakcia medzi substrátmi, induktormi a inhibítormi je komplexná a jej poznanie môže byť veľmi nápomocné pri interpretácii interakcií liekov a rôznych liekmi indukovaných syndrómov.

## 4.2. GLUTATIÓN-S-TRANSFERÁZY

Glutatión-S-transferázy (GST, EC 2.5.1.18) sú multifunkčné enzýmy zohrávajúce dôležitú úlohu v procese detoxikácie exogénnych a endogénnych metabolitov, zabezpečujú ochranu buniek voči oxidačnému stresu, ako aj podieľajú sa na syntéze leukotriénov, prostaglandínov a steroidných hormónov. Predstavujú veľmi širokú rodinu enzýmov, ktoré sa delia do tried na základe sekvencie aminokyselín, terciárnej/kvartérnej štruktúry, imunologických a kinetických vlastností. GST boli identifikované u rôznych organizmov, ako sú baktérie, kvasinky, plesne, hmyz, rastliny, ryby, vtáky, potkany a ľudia. Rozdeľujú sa do troch základných rodín: rozpustné cytosolové, mitochondriálne a štruktúrne odlišné membránovo-viazané mikrozomálne GST (Obr. 19).



**Obrázok 19** Hlavné triedy GST

Pozn. DHAR, dehydroaskorbát reduktáza

#### 4.2.1. Klasifikácia a charakterizácia GST

Klasifikácia rozpustných GST je založená na podobnosti v štruktúre génu a v sekvencii aminokyselín. Štandardizovaná nomenklatúra GST u ľudí bola navrhnutá v roku 1992. Nomenklatúra konkrétnej GST obsahuje veľké písmeno gréckej abecedy označujúce triedu, nasleduje arabská číslica označujúca podtriedu (1, 2, 3 atď.) a v niektorých prípadoch aj malé písmeno označujúce alelické varianty toho istého génu (a, b, c, atď.). Cytosólové a mitochondriálne GST tvoria diméry a sú katalyticky aktívne v homo- alebo heterodimérnom stave (napr. GSTA1-2 je enzým zložený z podjednotky 1 a 2 triedy A).

V súčasnosti identifikované triedy cytosólových GST sú: alfa, beta, delta, epsilon, zeta, teta, mu, nu, pi, sigma, tau a omega. U ľudí popísané cytosólové GST izoenzýmy sú alfa, mu, omega, pi, sigma, teta a zeta (Tab. 10). GST sa v rámci jednej triedy vyznačujú viac ako 40% identickou sekvenciou aminokyselín a medzi rôznymi triedami GST je to menej ako 25%. Mitochondriálne GST sú evolučne blízke cytosólovým GST a označujú sa ako trieda kapa.

Mikrozomálne GST sa označujú ako MAPEG – s membránou asociované proteíny metabolizmu eikozanoidov a glutatiónu (Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione Metabolism). Rodina MAPEG sa rozdeľuje do štyroch podtried (I-IV), ktoré sa vyznačujú menej ako 20% identickou sekvenciou aminokyselín. U ľudí bolo identifikovaných šesť MAPEG izoenzýmov, ktoré patria do podtried I, II a IV.

Nie všetky GST sú u ľudí exprimované vo všetkých tkanivách (Tab. 10), pričom ich expresia a aktivita je tiež ovplyvnená vekom a pohlavím. Cytosólové GST tvoria približne 4% z celkových rozpustných proteínov v pečeni. Napríklad GSTA sa nachádza v signifikantom množstve v pečeni dospelých jedincov, aj plodu. GSTP1 je vysoko exprimovaná v tkanive plodu, ale s vekom jej expresia klesá a hladiny GSTP1 v pečeni dospelého jedinca sú nízke. GSTT sa nenachádzajú v pečeni ľudského plodu, ale nachádzajú sa v pečeni dospelých jedincov a GSTM boli identifikované aj v pečeni plodu, aj dospelého jedinca. Expresia GST môže byť indukovaná niektorými substrátmi prirodzene sa vyskytujúcimi v ovocí a zelenine, čo predstavuje prirodzený adaptačný mechanizmus voči chemickému stresu indukovanému elektrofilnými substrátmi. Navyše, interindividuálne fenotypové rozdiely v aktivitách GST izoforiem môžu byť zapríčinené génovými polymorfizmami.

V minulosti bol za „univerzálny“ substrát GST považovaný 1-chlór-2,4-dinitrobenzén (CDNB). Ako sa však ukázalo, aj napriek prekrývajúcej sa substrátovej špecifite GST, neexistuje substrát, ktorý by bol metabolizovaný všetkými GST a niektoré z GST sú schopné metabolizovať iba konkrétny substrát (Tab. 10). Rôzne elektrofilné zlúčeniny sú substrátmi

GST. Patria sem rôznorodé zlúčeniny, ako sú ketóny, chinóny, sulfoxidy, estery, peroxidy a ozonidy. Chemoterapeutiká (busulfán, cis-platina, kyselina etakrynová, cyklofosfamid, tiotepa), priemyselné chemikálie, herbicídy, pesticídy (akroleín, lindán, malatión, tridifan) sú detoxikované GST. Epoxidy a iné reaktívne medziprodukty vznikajúce z environmentálnych prokarcinogénov (aflatoxín B1, PAU, styren, benzo[a]pyrén, heterocyklické amíny) sú tiež eliminované prostredníctvom rozpustných GST. Okrem enzymatickej aktivity, cytosólové GST (GSTA) sú schopné viazať rôzne hydrofóbne ligandy (napr. hormóny) a prispievajú tak k ich vnútrobunkovému transportu.

**Tabuľka 10** Klasifikácia, tkanivová lokalizácia a substrátová špecificita ľudských GST izoforiem

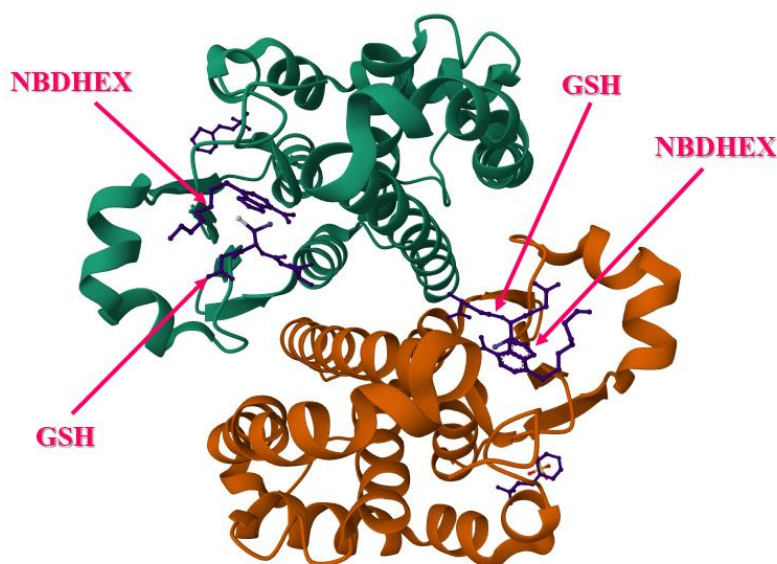
| Podjednotka                | MW<br>kDa | Chromozóm | Lokalizácia v tkanivách  | Preferované substráty              |
|----------------------------|-----------|-----------|--|------------------------------------|
| <b>Alfa</b>                |           |           |  |                                    |
| A1                         | 25,6      | 6p12      | Pečeň, semenníky, obličky, nadobličky, pankreas, pľúca, mozog, srdce                     | CDNB, DCNB, CHP, ECA               |
| A2                         | 26,0      | 6p12      | Pečeň, pankreas, semenníky, obličky, nadobličky, mozog, pľúca, srdce                     | CDNB, DCNB, ECA                    |
| A3                         | -         | ?         | Placenta   |                                    |
| A4                         | 25,7      | ?         | Tenké črevo, slezina   | 4-HNE, CDNB, CHP, ECA              |
| <b>Mu</b>                  |           |           |  |                                    |
| M1<br>(M1a, M1b)           | 26,7      | 1p13.3    | Pečeň, semenníky, mozog, nadobličky, obličky, pankreas, pľúca, srdce                     | trans-stilbén oxid, CDNB, DCNB     |
| M2                         | 26,0      | 1p13.3    | Mozog, semenníky, srdce, pankreas, obličky, nadobličky, pľúca, pečeň                     | dopachinón, CDNB, DCNB, ECA, CHP   |
| M3                         | 26,3      | 1p13.3    | Semenníky, mozog, slezina  | CDNB, DCNB, ECA, CHP               |
| M4                         | 26,0      | 1p13.3    | Pečeň, kostrový sval, srdce, mozog, pankreas, pľúca, obličky, placenta                   | CDNB, DCNB, ECA, CHP               |
| M5                         | 26,0      | 1p13.3    | Mozog, semenníky, pľúca  | CDNB                               |
| <b>Omega</b>               |           |           |  |                                    |
| GSTM01                     | 27,6      | 10q23-25  | Pečeň, srdce, kostrový sval, pankreas, obličky, mozog, pľúca, slezina                    | Kyselina arzénová                  |
| <b>Pi</b>                  |           |           |  |                                    |
| P1<br>(P1a, P1b, P1c, P1d) | 23,0      | 11q13     | Mozog, pľúca, srdce, semenníky, nadobličky, obličky, pankreas, pečeň,                    | BPDE, CDNB, DCNB, ECA, CHP         |
| <b>Sigma</b>               |           |           |  |                                    |
| GSTS1                      |           | 4q21-22   | Pečeň plodu, kostná dreň   | PGH <sub>2</sub> →PGD <sub>2</sub> |
| <b>Teta</b>                |           |           |  |                                    |
| T1                         | 27,0      | 22q11.2   | Obličky, pečeň, tenké črevo, mozog, slezina, prostata, pankreas, semenníky, srdce, pľúca | DCNB, ECA, CHP, dichlórmétán, EPNP |
| T2                         | 27,0      | 22q11.2   | Pečeň  | 1-naftyl sulfát, CDNB, CHP         |
| <b>Zeta</b>                |           |           |  |                                    |
| Z1                         | 24,2      | 14q24.3   | ?  | Kyselina dichlóroctová, CHP, ECA   |

Pozn. 1-chlór-2,4-dinitrobenzén, CDNB; 1,2-dichlór-4-nitrobenzén, DCNB; etyl kyanoacetát, ECA; 4-hydroxy-2-nonenal, 4-HNE; hydroperoxid kuménu, CHP; 1,2-epoxy-3-(p-nitrofenyl) propán, EPNP.

GST zohrávajú významnú pri ochrane lipidov, DNA a proteínov pred oxidačným poškodením voľnými radikálmi a podieľajú sa na eliminácii reaktívnych medziproduktov lipoperoxidácie (4-hydroxy-2-nonenalu), peroxidácie nukleotidov, ako aj peroxidácie katecholamínov (aminochrómu, dopachrómu, adrenochrómu).

#### 4.2.2. Štruktúra GST

Rozpustné formy GST existujú ako dimérne proteíny, pričom veľkosť každej z podjednotiek je približne 25 kDa (Tab. 10). V závislosti od počtu génov kódujúcich polypeptidové reťazce GST, izoenzýmy rovnakej triedy môžu existovať ako homodiméry alebo heterodiméry. V heterodimérnej forme sa vyskytujú najmä triedy GST-alfa a GST-mu. Na obrázku 20 je znázornená štruktúra ľudskej GSTP1-1 v komplexe s GSH a jej inhibítorom NBDHEX [6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yltio)hexanolom].



**Obrázok 20** Štruktúra ľudskeho GSTP1-1 v komplexe s GSH a jej inhibítorom NBDHEX [6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yltio)hexanol; databanka proteínov - PDB ID: 3GUS]

Každá GST obsahuje dve charakteristické domény I a II. Doména I sa nachádza na N-konci proteínu (1-80 aminokyselinových zvyškov) a je tvorená  $\beta$ -skladanými listami a  $\alpha$ -helixami. Doména I je pripojená k doméne II prostredníctvom krátkej spájajúcej sekvencie, ktorá sa nachádza medzi helixami  $\alpha_3$  a  $\alpha_4$ . Doména II (81-210 aminokyselinových zvyškov) začína na C-konci spájajúcej sekvencie, obsahuje päť a viac  $\alpha$ -helixov a H-miesto, na ktoré sa viažu

hydrofóbne substráty. Hydrofilné G-miesto, ktoré viaže fyziologický substrát glutatión, je súčasťou domény I a je štruktúrne konzervované u každej z GST izoformiem. U väčšiny tried GST, G-miesto obsahuje katalyticky esenciálny zvyšok tyrozínu (GST-alfa, GST-mu, GST-pi a GST-sigma), serínu (GST-teta a GST-zeta) alebo cysteínu (GST-omega), ktoré interagujú s tiolovou skupinou GSH, čím dochádza k zníženiu  $pK_a$  z 9 na cca. 6-7 a k stabilizácii nukleofilného tiolátu. Zistilo sa, že G-miesto tried GST-alfa, GST-mu a GST-pi je viac prístupné GSH ako v prípade tried GST-teta a GST-zeta. Je to dané tým, že hydroxylové skupiny tyrozínového a serínového zvyšku, ktoré sú prítomné v aktívnom mieste enzýmu, môžu vytvárať vodíkové väzby s atómom síry GSH, čo vedie k aktivácii enzýmu. V prítomnosti cysteínového zvyšku v aktívnom mieste GST-omega dochádza k tvorbe disulfidovej väzby s GSH, čím sa aktívne centrum enzýmu stáva nedostupným pre ďalšie reakcie.

Rozdiely v štruktúre medzi jednotlivými izoformami GST sú dané rozdielmi v rámci domény II. Rozdielne aminokyseliny v H-mieste GST sú zodpovedné za substrátovú špecifitu. Napríklad triedy GST-mu a GST-pi v doméne II obsahujú viac polárnych oblastí, ktoré im umožňujú reagovať s nabitými substrátmi, zatiaľ čo doména II triedy alfa je viac hydrofóbna.

#### 4.2.3. Katalytická aktivita GST

GST sa podieľajú detoxikácii xenobiotík ich konjugáciou s GSH, za vzniku vo vode rozpustnejšieho konjugátu glutatiónu (GSR, Obr. 21).

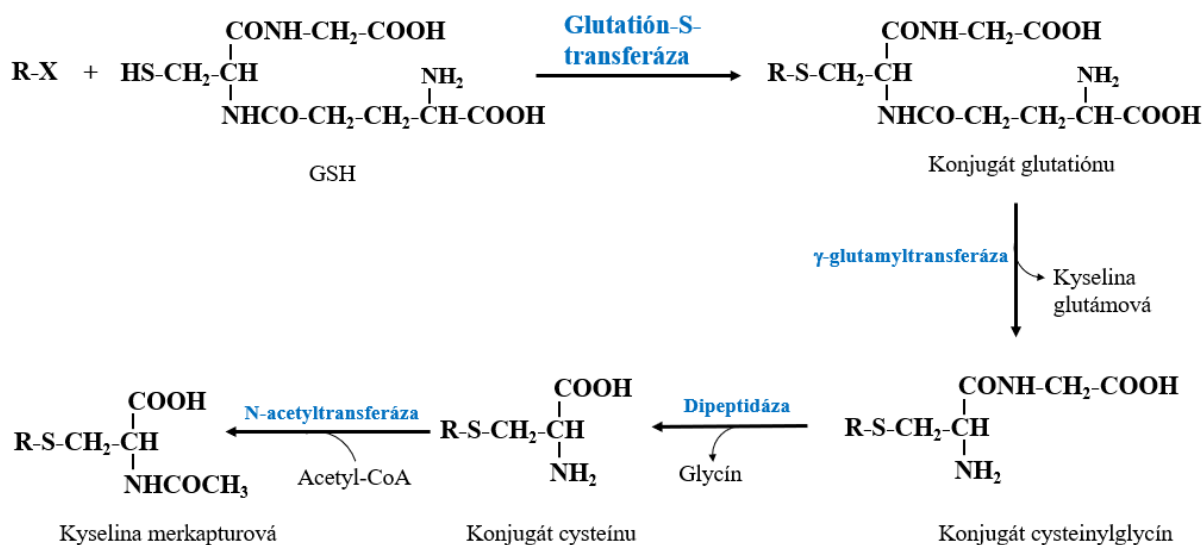


**Obrázok 21** Konjugáčna reakcia katalyzovaná GST

Úlohou GST je:

- väzba elektrofilného substrátu a GSH v jeho aktívnom mieste,
- aktivácia tiolovej skupiny GSH, čím je umožnený nukleofilný atak GSH na elektrofilný substrát (R-X).

Následne sú tieto polárnejšie konjugáty eliminované žľou, respektíve časť podlieha ďalším chemickým premenám (hydrolýza konjugátov prostredníctvom  $\gamma$ -glutamyltransferázy a aminopeptidázy M/cysteinyglycín dipeptidázy) za vzniku kyseliny merkapturovej (Obr. 22), ktorá je následne z organizmu vylúčená močom.



**Obr3zok 22** Synt3za kyseliny merkapturovej

Elektrofiln3 funk3n3 centrum substr3tu m33e byť uhl3k, dus3k, alebo s3ra. GST m33u katalyzovať nukleofiln3 aromatick3 substit3ciu, Michaelovu ad3ciu na  $\alpha,\beta$ -nenas3ten3 aldehydy a ket3ny, kruh otv3raj3ce štiepenie epoxidov, ktor3 ved3 k tvorbe GSH konjug3tov. GST tie3 katalyzuj3 redukciu hydroperoxidov, ktor3 vedie k tvorbe oxidovan3ho glutati3nu (GSSG). Tvorba tioesterovej v3zby medzi cyste3nov3m zvyškom GSH a elektrofilom zvy3ajne vedie k vzniku menej reakt3vneho a vo vode rozpustnejšieho konjug3tu glutati3nu. Avšak v pr3pade niektor3ch haloalk3nov (-3nov), ako napr. 1,2-dibr3met3nu a dichl3rmet3nu, konjug3cia s GSH m33e viesť k tvorbe vysoko reakt3vnych intermedi3tov s potenci3lnymi mutag3nnymi a karcinog3nnymi 33inkami.

Okrem detoxika3nej funkcie, GST katalyzuje redukciu zl33en3n obsahuj3cich peroxid (napr. hydroperoxydy karboxylov3ch kysel3n a fosfolipidov), ktor3 m33u byť toxick3 pre bunku. Peroxid3zov3 aktivita GST nezávis3 od sel3nu, ale vy3aduje redukovan3 GSH. Ide o dvojstupn3v3 reakciu. V prvom kroku doch3dza k enzymatickej redukcii peroxidu na alkohol za s3časnej tvorby hydroxylovan3ho glutati3nu (GSOH). V druhom kroku doch3dza k spont3nnej reakcii GSOH a GSH za vzniku vody a oxidovan3ho glutati3nu (GSSG).

GST tie3 zohr3va v3znamn3 3lohu v izomeriza3n3ch reakci3ch mnoh3ch biologicky v3znamn3ch molek3l. Fyziologick3m pr3kladom je premena kyseliny 13-cis retinovej na kyselinu all-trans retinov3, ktor3 je potrebn3 pre zvy3enie jej afinity k receptoru. Ďalším pr3kladom izomeriza3nej reakcie, na ktorej participuje GST, je premena prostaglan3nu PGH<sub>2</sub> na PGD<sub>2</sub> alebo PGE<sub>2</sub>.



#### 4.2.4. Ďalšie funkcie GST

V literatúre prvá opísaná GST bola pôvodne identifikovaná ako „ligandín“ vďaka svojej schopnosti kovalentne a nekovalentne interagovať s rôznymi zlúčeninami, ako sú steroidné hormóny, hormóny štítnej žľazy, žľčové kyseliny, bilirubín a hém, ktoré nie sú substrátmi GST. Predpokladá sa, že táto funkcia GST napomáha ďalším enzýmom pri katalyzovaní reakcií, ovplyvňuje aktivitu jadrových receptorov pre hormóny, ako aj napomáha transportu a exkrécii malých molekúl z buniek.

GST zohrávajú významnú úlohu pri regulácii mitogénom aktivovanej proteínkinázovej dráhy (MAPK) cez proteín:proteínové interakcie. Zistilo sa, že GSTP1 je endogénny inhibítor c-Jun N-terminálnej kinázy 1 (JNK1, c-Jun N-terminal kinase 1). V podmienkach bez stresu bola pozorovaná nízka aktivita JNK v dôsledku sekvestrácie proteínu v komplexe GSTP1:JNK. GSTP1 vo svojej monomérskej forme viaže c-Jun, ako aj JNK, pričom vzniká heterotrimérny komplex, ktorý inhibuje fosforyláciu c-Jun prostredníctvom JNK. Vplyvom extracelulárnych stimulov dochádza k disociácii komplexu a JNK môže fosforylovať c-Jun, ktorý je súčasťou transkripčného faktora AP1 (aktivátor proteínu 1). Následne dochádza k indukcii AP1 dependentných cieľových génov zahrnutých v odpovedi na stres, apoptózu a bunkovú proliferáciu. GSTP1 je tiež schopný viazať a inhibovať faktor 2 asociovaný s receptormi tumor nekrotizujúceho faktora (TRAF2, Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2), ktorý je „upstream“ aktivátorom JNK, čím dochádza k blokovaniu MAPK/JNK signálnej kaskády. Boli pozorované rozdiely v hladinách GSTP1-TRAF2 komplexu v bunkách, pričom maximum dosahovali v G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fáze a následne prudko poklesli v S, G<sub>2</sub> a M fáze.

GST sa podieľa na S-glutathionylácii proteínov, ku ktorej dochádza pri zvýšenej tvorbe ROS, čím sa zabráni ireverzibilnej oxidácii cysteínových zvyškov proteínov a narušeniu ich funkcie. Proces S-glutathionylácie proteínov môže prebiehať neenzymaticky, ako aj enzymaticky. Počas oxidačného stresu, dochádza k auto S-glutathionylácii GSTP1 na zvyškoch cysteínu v pozícii 47 a 101, ktorá následne ovplyvňuje katalytickú aktivitu enzýmu a jeho schopnosť viazať cieľové proteíny. S-glutathionylácia monoméru GSTP1 znižuje počet oblastí obsahujúcich  $\alpha$ -helixy, t.j. dochádza k zmene sekundárnej štruktúry, s následnou zmenou terciárnej a kvartérnej štruktúry, čím sa mení schopnosť GSTP1 interagovať s proteínmi. Príkladom S-glutathionylácie je vyššie uvedená regulácia komplexu GSTP1 a JNK1. Ďalšie proteíny, ktorých štruktúra a funkcia je modulovaná S-glutathionyláciou sú proteíny podieľajúce sa na metabolizme, cytoskeletálne proteíny a iónové kanály, signálne proteíny (kinázy a fosfatázy), transkripčné faktory, ras-proteíny a proteíny tepelného šoku (Hsp, Heat Shock Proteins).

#### 4.2.5. Genetické variácie GST a nádorové ochorenia

Gény kódujúce GST sú usporiadané v klastroch na rôznych chromozómoch. Väčšina z týchto génov je polymorfná, čo vedie k fenotypovej variabilite GST (Tab. 11). Najviac študovanými sú polymorfizmy v génoch pre *GSTM1*, *GSTT1* a *GSTP1*.

**Tabuľka 11** Génové polymorfizmy ľudských GST

|              | Alela             | Nukleotid/y v géne v rôznych pozíciách | Vplyv na proteín  |
|--------------|-------------------|--|---|
| <b>Alfa</b>  | <i>GSTA1</i> *A   | -631T/G, -567C, -69C, -52G             | „Referenčná“ hladina proteínu   |
|              | <i>GST1</i> *B    | -631G, -567G, -69T, -52A               | Nízka hladina proteínu  |
|              | <i>GSTA2</i> *A   | 328C, 335G, 588G, 629A                 | Pro <sup>110</sup> , Ser <sup>112</sup> , Lys <sup>196</sup> , Glu <sup>210</sup> |
|              | <i>GSTA2</i> *B   | 328C, 335G, 588G, 629C                 | Pro <sup>110</sup> , Ser <sup>112</sup> , Lys <sup>196</sup> , Ala <sup>210</sup> |
|              | <i>GST2</i> *C    | 328C, 335C, 588G, 629A                 | Pro <sup>110</sup> , Thr <sup>112</sup> , Lys <sup>196</sup> , Glu <sup>210</sup> |
|              | <i>GSTA2</i> *D   | 328C, 335G, 588T, 629C                 | Pro <sup>110</sup> , Ser <sup>112</sup> , Asn <sup>196</sup> , Ala <sup>210</sup> |
|              | <i>GSTA2</i> *E   | 328T, 335G, 588G, 629A                 | Ser <sup>110</sup> , Ser <sup>112</sup> , Lys <sup>196</sup> , Glu <sup>210</sup> |
| <b>Mu</b>    | <i>GSTM1</i> *A   | 519G                                   | Lys <sup>173</sup>  |
|              | <i>GSTM1</i> *B   | 519C                                   | Asn <sup>173</sup>  |
|              | <i>GSTM1</i> *0   | Delécia génu                           | Bez proteínu  |
|              | <i>GSTM1</i> *1×2 | Duplikácia génu                        | Zvýšená expresia M1 proteínu  |
|              | <i>GSTM3</i> *A   | Divý typ                               | „Referenčná“ hladina proteínu   |
|              | <i>GSTM3</i> *B   | 3 bp delécia v intróne 6               | Nezmenený proteín   |
|              | <i>GSTM4</i> *A   | Divý typ                               | „Referenčná“ hladina proteínu   |
|              | <i>GSTM4</i> *B   | T2517C zmena v intróne                 | Nezmenený proteín   |
| <b>Pi</b>    | <i>GSTP1</i> *A   | 313A, 341C, 555C                       | Ile <sup>105</sup> , Ala <sup>114</sup> , Ser <sup>185</sup>                      |
|              | <i>GSTP1</i> *B   | 313G, 341C, 555T                       | Val <sup>105</sup> , Ala <sup>114</sup> , Ser <sup>185</sup>                      |
|              | <i>GSTP1</i> *C   | 313G, 341T, 555T                       | Val <sup>105</sup> , Val <sup>114</sup> , Ser <sup>185</sup>                      |
|              | <i>GSTP1</i> *D   | 313A, 341T                             | Ile <sup>105</sup> , Val <sup>114</sup>   |
| <b>Sigma</b> | <i>GSTS1</i> *A   | IVS2 + 11 A                            | „Referenčná“ hladina proteínu   |
|              | <i>GSTS1</i> *B   | IVS2 + 11 C                            | Nezmenený proteín   |
| <b>Teta</b>  | <i>GSTT1</i> *A   | Divý typ                               | „Referenčná“ hladina proteínu   |
|              | <i>GSTT1</i> *0   | Delécia génu                           | Bez proteínu  |
|              | <i>GSTT2</i> *A   | 415A                                   | Met <sup>139</sup>  |
|              | <i>GSTT2</i> *B   | 415G                                   | Ile <sup>139</sup>  |

**Tabuľka 11 pokračovanie** Génové polymorfizmy ľudských GST

|              | Alela           | Nukleotid/y v géne v rôznych pozíciách | Vplyv na proteín  |
|--------------|-----------------|--|---|
| <b>Zeta</b>  | <i>GSTZ1</i> *A | 94A, 124A, 245C                        | Lys <sup>32</sup> , Arg <sup>42</sup> , Thr <sup>82</sup> |
|              | <i>GSTZ1</i> *B | 94A, 124G, 245C                        | Lys <sup>32</sup> , Gly <sup>42</sup> , Thr <sup>82</sup> |
|              | <i>GSTZ1</i> *C | 94G, 124G, 245C                        | Glu <sup>32</sup> , Gly <sup>42</sup> , Thr <sup>82</sup> |
|              | <i>GSTZ1</i> *D | 94G, 124G, 245T                        | Glu <sup>32</sup> , Gly <sup>42</sup> , Met <sup>82</sup> |
| <b>Omega</b> | <i>GSTO1</i> *A | 419C, 464-IVS4 + 1 AAG                 | Ala <sup>140</sup> , Glu <sup>155</sup>                   |
|              | <i>GSTO1</i> *B | 419C, 464 deletované                   | Ala <sup>140</sup> , Glu <sup>155</sup> deletované        |
|              | <i>GSTO1</i> *C | 419A, 464-IVS4 + 1 AAG                 | Asp <sup>140</sup> , Glu <sup>155</sup>                   |
|              | <i>GSTO1</i> *D | 419A, 464 deletované                   | Asp <sup>140</sup> , Glu <sup>155</sup> deletované        |
|              | <i>GSTO2</i> *A | 424A                                   | Asn <sup>142</sup>  |
|              | <i>GSTO2</i> *B | 424G                                   | Asp <sup>142</sup>  |

Neprítomnosť aktivity GSTM1 a GSTT1 je spôsobená kompletnou deléciou *GSTM1* a *GSTT1* génu. Homozygotnú deléciu *GSTM1* génu má 40-60% populácie a *GSTT1* homozygotná delécia sa vyskytuje v populácii od 12-60%. *GSTP1* gén sa vyskytuje v dvoch rozdielnych funkčných variantoch, u ktorých dochádza k zámene izoleucínu za valín v kodóne 105 (A→G) a alanínu za valín v kodóne 114 (C→T) Výsledkom sú štyri *GSTP1* alely: divý typ *GSTP1*\*A (Ile<sup>105</sup>+Ala<sup>114</sup>), *GSTP1*\*B (Val<sup>105</sup>+Ala<sup>114</sup>), *GSTP1*\*C (Val<sup>105</sup>+Val<sup>114</sup>) a *GSTP1*\*D (Ile<sup>105</sup>+Val<sup>114</sup>). Predpokladá sa, že táto zámena aminokyselín vedie k zníženiu enzýmovej aktivity GSTP1 a tým pravdepodobne k zníženej ochrane buniek pred cytotoxickými a karcinogénnymi účinkami xenobiotík.

V menšej miere sú tiež študované polymorfizmy ďalších tried GST. Podľa NCBI/dbSNP databázy najštudovanejšie *GST* gény (*GSTM*, *GSTT*, *GSTP* a *GSTA*) obsahujú okolo 3200 SNP, pričom prevažná väčšina z nich sú SNP vyskytujúce sa v intrónoch (85%) a zvyšok sa nachádza v kódujúcej oblasti génov s dopadom na štruktúru a funkciu exprimovaného GST enzýmu.

Epidemiologické štúdie poukazujú na to, že individuálne rozdiely v odpovedi pacientov na protinádorovú terapiu sú dané rozdielmi v metabolizovaní liekov, génovými polymorfizmami a ich funkčným dopadom, rôznou expozíciou karcinogénmi a diverzitou populácie ako sú rasa a etnicita. Zistilo sa, že u hyperproliferatívnych nádorových buniek zvýšená expresia a aktivita GST (najmä GSTP1) vedie k vzniku rezistencie na chemoterapeutiká. Predpokladaným mechanizmom je synergická interakcia GST s efluxnými pumpami, čo môže viesť k zvýšenej detoxikácii chemoterapeutík. Preto GST predstavujú vhodný terapeutický cieľ a mohli by poskytnúť vhodnú platformu na vývoj nových protinádorových liekov. V prípade, ak zvýšená

expresia GST v nádore vedie k zníženiu účinku chemoterapeutika, jednou z možností by mohla byť aplikácia inhibítorov GST. Pri vývoji nových liekov sa berie do úvahy fakt, že protinádorové lieky nie sú fyziologickými substrátmi GST, preto prolieky môžu obsahovať glutatión alebo štruktúru podobnú glutatiónu. Analógy GSH sa získavajú modifikáciou  $\gamma$ -glutamylu, cysteínu a glycínu alebo funkcionalizáciou cysteínu, čím dôjde k inhibícii GST. Pri aktivácii proliekov sa konjugáty s GSH vytvárajú nepriamo.

### 4.3. SULFOTRANSFERÁZY

Biologicky relevantné sulfátové konjugáty boli prvýkrát identifikované a charakterizované Eugenom Baumanom v roku 1876, ktorý izoloval tieto konjugáty z moču pacienta, ktorému bola podávaná kyselina karbolová (fenol) ako antiseptikum. Sulfonácia (sulfácia, sulfurylácia) katalyzovaná sulfotransferázami (SULT, EC 2.8.2) je významnou konjugáčnou reakciou II. fázy biotransformácie, pri ktorej dochádza k prenosu sulfonylovej skupiny z endogénneho donora sulfátu, 3'-fosfoadenozyl-5'-fosfosulfátu (PAPS), na endogénne ako aj exogénne zlúčeniny. SULT zabezpečuje nielen elimináciu xenobiotík, ale zároveň aj moduláciu biologickej aktivity a inaktiváciu/elimináciu endogénnych látok, ako sú tyroidné hormóny, steroidy a katecholamíny.

Sulfonácia zohráva tiež významnú úlohu pri transporte steroidov. Sulfátové estery steroidov by mohli byť „transportnou formou“ niektorých steroidov, ako sú 17 $\beta$ -estradiol a dehydroepiandrosterón. Tieto „inaktívne“ sulfáty sa viažu na proteíny a sú transportované v krvi k cieľovým tkanivám, kde dochádza k ich desulfatácii prostredníctvom sulfatáz. Z uvedeného vyplýva význam tejto reakcie v regulácii biosyntézy androgénov a estrogénov. Avšak v niektorých prípadoch, sulfonácia prokarcinogénov a protoxických zlúčenín vedie k tvorbe aktívnych metabolitov, ktoré môžu poškodzovať makromolekuly, ako napríklad DNA.

#### 4.3.1. Klasifikácia a charakterizácia SULT

U cicavcov boli popísané dve triedy SULT, membránové a cytosólové. Membránové SULT sú prítomné v membránach Golgiho aparátu a podieľajú sa na metabolizovaní endogénnych makromolekúl, ako sú sacharidy a proteíny. Nepodieľajú sa na metabolizovaní xenobiotík.

Cytosólové SULT metabolizujú xenobiotiká, ako aj malé endogénne zlúčeniny, ako sú spomínané tyroidné hormóny, steroidy a neurotransmitery.

Blanchard a kol. v roku 2004 navrhol systematickú nomenklatúru pre cytosólové SULT. Klasifikácia rozpustných SULT je založená na podobnosti v štruktúre génu a v sekvencii aminokyselín. SULT, ktoré sa vyznačujú 45% identickou sekvenciou aminokyselín sa zaraďujú do rovnakej rodiny a v rámci podrodiny je potrebná 60% identická sekvencia aminokyselín. Rodiny SULT sa označujú arabskými číslicami (napr. SULT1, SULT2) a potom nasleduje označenie podrodiny pomocou veľkého písmena (napr. SULT1A). Jednotlivé izoformy v rámci podrodiny sa identifikujú pomocou čísla, ktoré nasleduje za označením podrodiny (napr. SULT1A1). Alely sú označené hviezdičkou a arabskou číslicou za izoformou génu (napr. SULT2A1\*1A). U ľudí bolo doteraz identifikovaných približne jedenásť cytosólových SULT (Tab. 12).

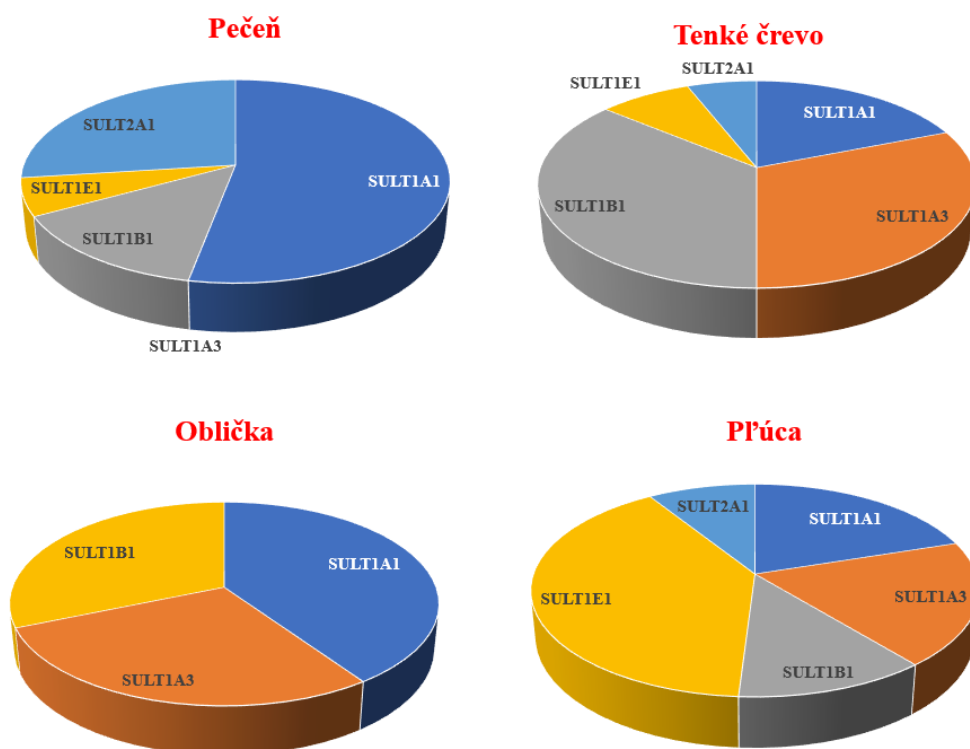
**Tabuľka 12** Charakterizácia ľudských SULT

| SULT izoenzymy | Mr (kDa) | Chromozóm | Lokalizácia v tkanivách          | Preferované substráty |
|----------------|----------|-----------|----------------------------------|-----------------------|
| SULT1A1        | 32       | 16p11.2   | Pečeň (vysoká expresia)          | Fenoly                |
| SULT1A2        | 32,5     | 16p11.2   | Pečeň                            | Fenoly                |
| SULT1A3        | 34       | 16p11.2   | Jejunum a sliznica hrubého čreva | Katecholamíny         |
| SULT1B1        | 33       | 4q13.3    | Hrubé črevo                      | Tyroidné hormóny      |
| SULT1C1        | 33,3     | 2q12.3    | Obličky, žalúdok, štítna žľaza   | Arylhydroxylamíny     |
| SULT1C2        | 34       | 2q12.3    | Obličky, pľúca                   | Arylhydroxylamíny     |
| SULT1E1        | 33,5     | 4q13.3    | Pečeň, endometrium, jejunum      | Estrogény             |
| SULT2A1        | 33,5     | 19q13.32  | Pečeň, nadobličky, jejunum       | Hydroxysteroidy       |
| SULT2B1        | 39       | 19q13.32  | Placenta, prostata, trachea      | Hydroxysteroidy       |
| SULT4A1        | 33       | 22q13.2   | Mozog                            | Neznáme               |

Cytosólové SULT sa rozdeľujú do dvoch základných tried, arylsulfotransferázy (SULT1) a hydroxysteroidsulfotransferázy (SULT2). SULT1 trieda sa rozdeľuje do piatich podtried, a to SULT1A (1A1, 1A2 a 1A3), SULT1B (1B1), SULT1C (1C1, 1C2 a 1C3), SULT1D a SULT1E (1E1). SULT2 trieda sa rozdeľuje do dvoch podtried, SULT2A (SULT2A1) a SULT2B (SULT2B1a a SULT2B1b). SULT4A1 a SULT6B1 sú jedinými členmi triedy SULT4 a SULT6.

SULT sú prítomné v mnohých tkanivách. Na obrázku 23 je znázornená expresia najvýznamnejších cytosólových SULT v rôznych tkanivách. SULT1A1 je exprimovaná najmä v pečeni. SULT1B1 je prítomná v pečeni, v tenkom a v hrubom čreve a v leukocytoch.

SULT1A3 nie je prítomná v pečeni. SULT1C bola identifikovaná v tkanive pečene, pľúc a obličiek ľudského plodu a predpokladá sa, že predstavuje hlavný detoxikačný systém u vyvíjajúceho sa ľudského plodu, nakoľko do 20 týždňa tehotenstva nebola detegovaná aktivita UGT v pečeni plodu. Vysoká expresia SULT1E1 bola zistená v pečeni a v jejune. Hlavnými miestami expresie SULT2A1 sú pečeň, nadobličky, vaječníky a dvanástnik. SULT2B sú exprimované v ľudskej prostate, placentе, nadobličkách, vaječníkoch, pľúcach, obličkách a v hrubom čreve.



**Obrázok 23** Relatívna expresia ľudských SULT v pečeni, tenkom čreve, obličkách a v pľúcach (prevzaté z Riches Z, a kol. Drug Metab Dispos. 37: 2255-2261, 2009)

Najdôležitejším detoxikačným enzýmom u ľudí z tejto rodiny enzýmov je SULT1A1. Vyplýva to zo širokého spektra ňou eliminovaných xenobiotík, kinetických vlastností a vysokej expresie SULT1A1 v pečeni. SULT1A1 sa tiež označuje ako fenolsulfotransferáza (P-PST) alebo termostabilná fenolsulfotransferáza (TS-PST1). Je zodpovedná za sulfokonjugáciu látok ako sú monocyklické fenoly, naftoly, aromatické amíny, benzylalkohol, dopamín a jódtýronín.

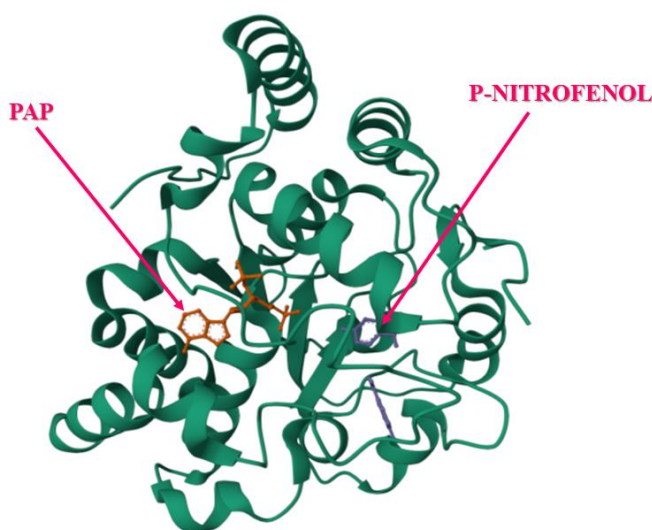
Fyziologická funkcia SULT1A2 nebola zatiaľ popísaná. Podieľa sa na sulfokonjugácii niektorých aromatických hydroxylamínov, pričom vznikajúce sulfokonjugáty sú chemicky reaktívne a mutagénne. Metabolizuje tiež 2-naftol a 4-nitrofenol. SULT1A3 sa v minulosti

označovala ako termolabilná fenolsulfotransferáza (TL-PST) a monoaminosulfotransferáza (M-PST). SULT1A3 zohráva špecifickú úlohu pri sulfonácii katecholamínov, t.j. podieľa sa na regulácii hladín neurotransmiterov. Dopamín sa často využíva ako selektívny substrát na meranie aktivity SULT1A3. Jej ďalšími substrátmi sú noradrenalin, katecholy, monocyklické fenoly a aromatické zlúčeniny.

Substrátová špecifita SULT1B1 je obmedzená na tyroidné hormóny a malé fenolové zlúčeniny, ako sú 1-naftol a 4-nitrofenol. SULT1C1 sa podieľa na konjugácii jódtyronínu a SULT1C2 konjuguje 4-nitrofenol a N-hydroxy-2-acetylaminofluoren. SULT1E1 sa tiež označuje ako estrogénsulfotransferáza, nakoľko sa podieľa na metabolizovaní estrogénov a na regulácii ich aktivity. Konjuguje tiež jódtyronín, pregnenolón, 1-naftol, naringenin, genistein a 4-hydroxytamoxifen. SULT2A1 sa označuje tiež ako dehydroepiandrosterónsulfotransferáza a konjuguje hydroxysteroidy, ako sú dehydroepiandrosterón, androgén, žľové kyseliny a estrón. SULT2A a SULT2B triedy metabolizujú podobné substráty, napr. dehydroepiandrosterón. U SULT4A1 a SULT6B1 zatiaľ neboli identifikované žiadne nimi metabolizované substráty.

#### 4.3.2. Štruktúra SULT

Väčšina SULT proteínov existuje ako homodiméry, aj keď u hlodavcov boli zistené aj heterodimérne formy. Každá z podjednotiek obsahuje 284-365 aminokyselín. SULT sú globulárne proteíny, s charakteristickým päťvláknovým paralelným  $\beta$ -skladaným listom obklopeným  $\alpha$ -helixami (Obr. 24).

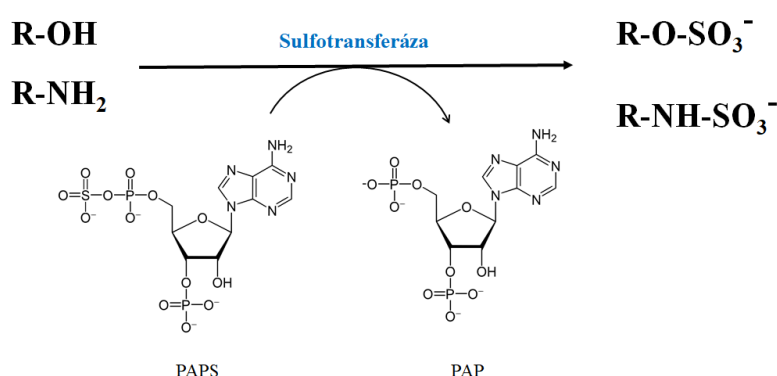


**Obrázok 24** Štruktúra ľudského SULT1A1 v komplexe s PAP a p-nitrofenolom (databanka proteínov - PDB ID: 1LS6)

Dve esenciálne oblasti sú nevyhnutné pre katalytickú aktivitu SULT, a to PAPS väzbové miesto (vysoko konzervované) a substrát viažuce miesto, ktoré je unikátne pre každú SULT. Beta-skladaný list tvorí PAPS väzbové miesto a jadro katalytického miesta. U cytosólových SULT, PAPS väzbové miesto je tvorené motívmi reťazec-slučka-helix a reťazec-otočka-helix. Slučka, tiež označovaná ako PSB-slučka, interaguje s 5'-fosfátom PAPS a helix 6 motívu reťazec-otočka-helix, ktorý je paralelný s PBS slučkou, interaguje s 3'-fosfátom PAPS. PAPS väzbové miesto obsahuje dve vysoko konzervované oblasti (YPKSGTXW blízko k N-koncu a RKGXXGDWK blízko ku C-koncu). Najväčšia štruktúrna variabilita SULT sa uplatňuje v rámci väzbového miesta pre substrát. U ľudských SULT1A1 a SULT1A3, ktoré sa vyznačujú 93% identickou sekvenciou aminokyselín a rozdielnou substrátovou špecifitou sa zistilo, že oblasť I (84-89) a II (143-148) sú zodpovedné za ich substrátovú špecifitu.

#### 4.3.3. Katalytická aktivita SULT

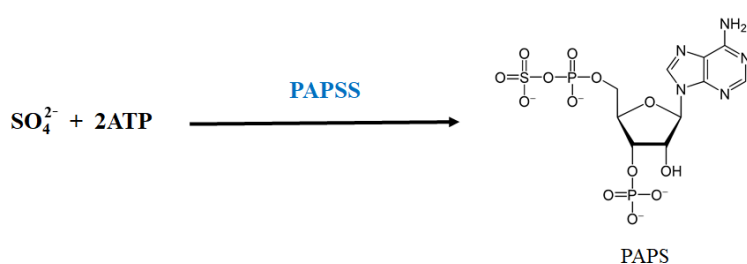
SULT katalyzujú prenos sulfonylovej skupiny z endogénneho donora sulfátu, ktorým je PAPS na hydroxylovú skupinu, tiolovú skupinu, aminoskupinu alebo N-oxid skupinu rôznych akceptorových molekúl za vzniku konjugátov sulfátu a PAP (3'-fosfoadenozyl-5'-fosfátu) bez tvorby intermediátov (Obr. 25). Vznikajúce negatívne nabité sulfátové konjugáty sú viac rozpustné vo vode ako prekursorové molekuly a sú transportované z buniek prostredníctvom ATP-dependentných exportných púmp spájaných s mnohonásobnou liekovou rezistenciou a následne sú vylučované z organizmu prostredníctvom žlče a moča.



**Obrázok 25** Konjugačná reakcia katalyzovaná SULT



Pre aktivitu SULT je esenciálna dostatočná intracelulárna koncentrácia PAPS. PAPS je syntetizovaný v cytosóle v dvojstupňovej reakcii z ATP a anorganického sulfátu za katalýzy bifunkčného enzýmu 3'-fosfoadenozyl-5'-fosfosulfátsyntázy (PAPSS, Obr. 26). PAPSS obsahuje N-koncovú adenozin-5'-fosfosulfát (APS) kinázovú doménu a C-koncovú ATP sulfurylázovú doménu, ktoré sú spojené krátkym nepravidelným linkerom. Existujú dve izoformy tohto enzýmu, PAPSS-1 a PAPSS-2, ktoré sú exprimované v rôznych tkanivách. PAPSS-1 mRNA sa nachádza najmä v mozgu a PAPSS-2 je vysoko exprimovaná v pečeni. Nasyntetizovaný PAPS je využitý buď cytosólovými SULT, alebo je transportovaný do Golgiho aparátu.



**Obrázok 26** Syntéza PAPS

#### 4.3.4. Genetické variácie SULT a nádorové ochorenia

Molekulárno-epidemiologické štúdie poukázali na vplyv genetických variácií, najmä SNP, na aktivitu SULT (Tab. 13). Funkčné SNP v SULT génoch majú potenciál meniť farmakokinetický/farmakodynamický profil liekov metabolizovaných prostredníctvom SULT, čím v konečnom dôsledku môže dochádzať k zmenám v účinnosti terapie.

V roku 1996 bol identifikovaný jeden z bežných genetických variantov *SULT1A1*, pri ktorom dochádza k zámene aminokyselín arginínu za histidín v pozícii 213 translatovaného proteínu. Divý typ sa označuje *SULT1A1\*1* (Arg<sup>213</sup>) a variantná forma sa označuje *SULT1A1\*2* (His<sup>213</sup>). V kaukasskej populácii sa *SULT1A1\*2* vyskytuje s frekvenciou 31-37%. V prípade variantu proteínu s His<sup>213</sup> bolo dokázané, že dochádza k zníženiu aktivity a termostability enzýmu. Bola dokázaná pozitívna asociácia *SULT1A1\*2* polymorfizmu so zvýšeným rizikom vzniku niektorých nádorových ochorení, ako sú karcinóm prsníka, karcinóm pľúc, karcinóm pažeráka, karcinóm žalúdka atď. Niektoré štúdie naopak poukázali na znížené riziko vzniku karcinómu močového mechúra a kolorektálneho karcinómu so *SULT1A1\*2* polymorfizmom. Predpokladá sa, že *SULT1A1\*2* vedie k zníženej afinite enzým k rôznym karcinogénom (napr. N-hydroxyarylamínom z cigaretového dymu), a tým zníženiu ich sulfonácie a bioaktivity.

V promótorovej oblasti *SULT1A1* boli identifikované ďalšie SNP, ktoré sú spojené so zmenou aktivity tohto enzýmu. Tieto polymorfizmy sú vo väzbe s ďalšími polymorfizmami ako aj so *SULT1A1\*1*. Haplotypová analýza tiež ukázala, že medzi rôznymi populáciami existuje značná variabilita vo frekvencii haplotypov. V roku 2007 boli popísané zmeny v počte kópii génu *SULT1A1* (CNV, Copy number variation), ktoré sa spájajú so zmenou v aktivite enzýmu. Ukázalo sa, že afroamerická populácia ma vyššie CNV ako kaukazská populácia, čo sa spája s vyššou aktivitou SULT1A1 krvných doštičiek u tejto populácie.

Polymorfizmy *SULT2* génov nie sú tak detailne študované ako *SULT1* génov. Bol identifikovaný *SULT2A1\*1* divý genotyp a dva polymorfizmy, ktoré vedú k zámene aminokyselín Thr<sup>90</sup>Ser a Leu<sup>159</sup>Val. *SULT2A1\*2* a *SULT2A1\*3* kódujú enzýmy, ktoré majú nižšiu aktivitu. U *SULT2B1* bolo charakterizovaných päť variantov enzýmov, ktorých aktivity sa pohybujú od 64-88% pre divý typ *SULT2B1a* a od 76-98% *SULT2B1b*.

**Tabuľka 13** Génové polymorfizmy ľudských SULT

|                       | Nukleotidová zámena                                       | Zmena aminokyseliny   |
|-----------------------|---|---|
| <b><i>SULT1A1</i></b> |   |   |
| <i>SULT1A1*1</i>      | Divý typ  | Žiadna  |
| <i>SULT1A1*2</i>      | G <sup>638</sup> A  | Arg <sup>213</sup> →His   |
| <i>SULT1A1*3</i>      | A <sup>667</sup> G  | Met <sup>223</sup> →Val   |
| <i>SULT1A1*4</i>      | G <sup>110</sup> A  | Arg <sup>37</sup> →Gly  |
| <b><i>SULT1A2</i></b> |   |   |
| <i>SULT1A2*1</i>      | A <sup>17</sup> G   | Gln <sup>6</sup> →Arg   |
| <i>SULT1A2*2</i>      | T <sup>20</sup> C, A <sup>704</sup> C                     | Ile <sup>7</sup> →Thr Asn <sup>235</sup> →Thr                               |
| <i>SULT1A2*3</i>      | C <sup>56</sup> T   | Pro <sup>19</sup> →Leu  |
| <i>SULT1A2*4</i>      | T <sup>20</sup> C, C <sup>550</sup> T, A <sup>704</sup> C | Ile <sup>7</sup> →Thr<br>Arg <sup>184</sup> →Cys<br>Asn <sup>235</sup> →Thr |
| <i>SULT1A2*5</i>      | T <sup>20</sup> C, A <sup>704</sup> C                     | Ile <sup>7</sup> →Thr   |
| <i>SULT1A2*6</i>      | A <sup>704</sup> C  | Asn <sup>235</sup> →Thr   |
| <b><i>SULT1C1</i></b> |   |   |
| <i>SULT1C2*1</i>      | Divý typ  | Žiadna  |
| <i>SULT1C2*2</i>      | T <sup>763</sup> G  | Ser <sup>193</sup> →Ala   |
| <i>SULT1C2*3</i>      | A <sup>179</sup> C  | Asp <sup>60</sup> →Val  |
| <i>SULT1C2*4</i>      | G <sup>218</sup> A  | Arg <sup>73</sup> →Gln  |
| <i>SULT1C2*5</i>      | C <sup>332</sup> T  | Ser <sup>111</sup> →Phe   |
| <b><i>SULT2A1</i></b> |   |   |
| <i>SULT2A1*1</i>      | Divý typ  | Žiadna  |
| <i>SULT2A1*I</i>      | T <sup>170</sup> C  | Met <sup>57</sup> →Thr  |
| <i>SULT2A1*II</i>     | A <sup>557</sup> T  | Glu <sup>186</sup> →Val   |
| <i>SULT2A1*III</i>    | T <sup>170</sup> C, A <sup>557</sup> T                    | Met <sup>57</sup> →Thr<br>Glu <sup>186</sup> →Val                           |

## 4.4. N-ACETYLTRANSFERÁZY

Arylamín N-acetyltransferázy (NAT, EC 2.3.1.5) patria do rodiny vysoko konzervovaných enzýmov, ktoré sú prítomné u prokaryotov aj eukaryotov. NAT katalyzujú N-, O- a N,O-acetyláciu širokého spektra arylamínov, heterocyklických amínov, hydrazínov, karcinogénov a liekov, čo vedie k ich detoxikácii alebo bioaktivácii. Koenzýmom NAT je acetylkoenzým A (acetyl-CoA). Na rozdiel od reakcií katalyzovaných UGT, GST alebo SULT, acetylácia nie je spojená so zvýšením rozpustnosti xenobiótika, ale uľahčuje jeho elimináciu z organizmu. V niektorých prípadoch môže acetylácia substrátu viesť k jeho aktivácii. Napríklad aromatické amíny môžu byť detoxikované, ako aj aktivované prostredníctvom NAT. Ich detoxikácia nastáva vtedy, ak sú ihneď acetylované na zodpovedajúce amidy, čím je menej pravdepodobné, že dôjde k ich aktivácii prostredníctvom CYP. K aktivácii aromatických amínov dochádza vtedy, ak sú najskôr hydroxylované prostredníctvom CYP za vzniku hydroxyaromatických amínov a potom premieňané na estery, ktoré sú spontánne premieňané na nestabilné a vysokoreaktívne zlúčeniny.

### 4.4.1. Klasifikácia a charakterizácia NAT

U ľudí existujú dva NAT izoenzýmy, NAT1 a NAT2, kódované génmi, ktoré sú lokalizované na chromozóme 8p22. Ide o cytosólové enzýmy. Bol tiež identifikovaný pseudogén *NATP* obsahujúci predčasný stop kodón. *NAT1* aj *NAT2* sú otvorené čítacie rámce bez intrónov s 870 párami báz kódujúce aktívne proteíny s veľkosťou 34 kDa. Nukleotidové sekvencie oboch *NAT* génov sú identické na 87% a aminokyselinové sekvencie proteínov, ktoré kódujú sú identické na 81%. Tieto dva enzýmy sa líšia distribúciou v tkanivách. NAT2 je prítomný hlavne v pečeni a v čreve a je zodpovedný za detoxikáciu xenobiótik. NAT1 je prítomný takmer vo všetkých tkanivách a tiež v nádorových bunkách, kde zohráva úlohu nielen v procese mutagenézy, ale tiež prispieva k rezistencii niektorých nádorov voči chemoterapeutikám. NAT2 nie je experimentovaný v tkanivách plodu v prenatalnom období a naopak expresia NAT1 sa zistila v tkanivách pľúc, obličiek a nadobličiek plodu.

NAT1 a NAT2 sú charakteristické odlišnou, ale prekrývajúcou sa substrátovou špecifitou. Vo všeobecnosti kyselina *p*-aminobenzoová (PABA) a *p*-kyselina aminosalicyllová (PAS) sa považujú za špecifické substráty NAT1. Sulfametazín, prokaínamid, dapson a sulfonamidy sú primárne acetylované NAT2. Niektoré zlúčeniny ako napríklad 2-aminofluorén sú substráty NAT1 aj NAT2. Je potrebné zdôrazniť, že aj keď sa tieto substráty bežne používajú na

rozlíšenie medzi NAT1 a NAT2 aktivitou, relatívny príspevok obidvoch NAT enzýmov k acetylácii substrátov závisí aj od koncentrácie substrátu, hladiny exprese enzýmu, jeho indukcie atď. Endogénnym substrátom NAT1 je p-aminobenzoylglutamát, ktorý je produktom katabolizmu kyseliny listovej. Doteraz nebol identifikovaný žiaden endogénny substrát NAT2.

Aktivita NAT1 môže byť ovplyvnená voľnými radikálmi. Zistilo sa, že NAT1 je reverzibilne inaktivovaná fyziologickými koncentráciami  $H_2O_2$ , ktorý spôsobuje oxidačnú modifikáciu katalytického cysteínu. Podobne pôsobia aj S-nitrózotioły, ktoré sú dôležitou triedou voľných radikálov odvodených od dusíka, o ktorej sa predpokladá, že sú zapojené do nitrozačných reakcií za fyziologických podmienok. Preto redoxný stav katalytického cysteínu sa zdá byť kľúčovým faktorom, ktorý riadi aktivitu enzýmu NAT1 v prítomnosti voľných radikálov.

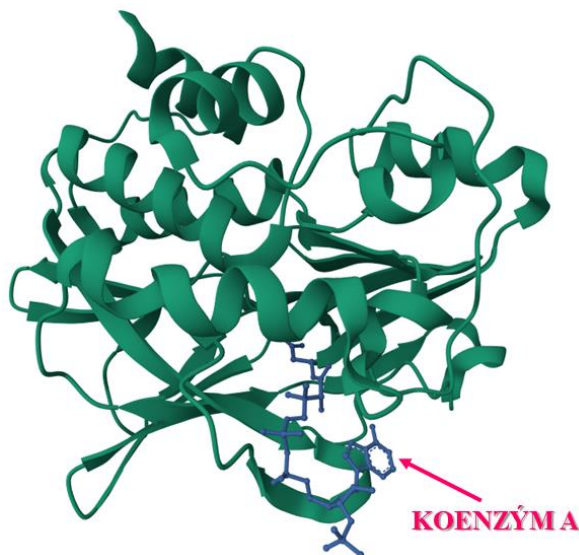
#### 4.4.2. Štruktúra NAT

Sekundárna a terciárna štruktúra NAT je vysoko konzervovaná od prokaryotov až po eukaryoty. Na obrázku 27 je znázornená štruktúra NAT2 v komplexe s koenzýmom A. Ľudské NAT obsahujú tri domény. N-terminálna doména obsahuje päť  $\alpha$ -helixov ( $\alpha 1$ - $\alpha 5$ ) a jeden krátky  $\beta$ -skladaný list medzi helixami  $\alpha 2$  a  $\alpha 3$ . Druhá doména pozostáva z desiatich  $\beta$ -skladaných listov ( $\beta 2$ - $\beta 11$ ) a dvoch krátkych  $\alpha$ -helixov ( $\alpha 6$  a  $\alpha 7$ ). Tieto dve domény sú pripojené prostredníctvom  $\alpha$ -helikálnej interdomény (helixy  $\alpha 8$ - $\alpha 10$ ) k tretej doméne, ktorú tvoria štyri antiparalelné  $\beta$ -reťazce ( $\beta 12$ - $\beta 15$ ) a helix  $\alpha 11$ . Helix  $\alpha 11$  predchádza povrchom proteínu smerom ku skrytému C-koncu do tesnej blízkosti katalytickej triády Cys-His-Asp a je schopný interagovať s acetyl-CoA.

Väzbové miesto pre acetyl-CoA sa nachádza v hlbkej štrbine medzi helixami  $\alpha 8$ - $\alpha 10$  interdomény (spája doménu II s doménou III) a  $\beta$ -barelom (doména II). Acetyl-CoA sa viaže na aktívne miesto v ohnutej konformácii, pričom tiolová skupina koenzýmu A smeruje ku katalytickému Cys<sup>68</sup>, čomu napomáhajú  $\beta$ -merkaptetoetylamin a pantotenát. Väzba acetyl-CoA na aktívne miesto je sprostredkovaná najmä hydrofóbnymi interakciami a vodíkovými väzbami. K vhodnej orientácii acetyl-CoA v aktívnom mieste tiež prispievajú van der Waalsove sily a vodíkové väzby medzi aminokyselinami a kyselinou pantoténovou, difosfátovou skupinou a adenínom koenzýmu A.

Substrátové väzbové miesto sa prekrýva vo veľkej miere s väzbovým miestom pre acetyl-CoA. Toto zistenie je v súlade s reakčným mechanizmom, kedy sa kofaktor a substrát viažu na enzým sekvenčným spôsobom („ping-pongový“ kinetický mechanizmus). Substrát sa viaže v

hlbokej štrbine medzi helikálnou interdoménou a doménou II. Substrátové väzbové miesto pozostáva najmä z hydrofóbnych aminokyselín, čo súhlasí s tým, že NAT preferujú hydrofóbne substráty.

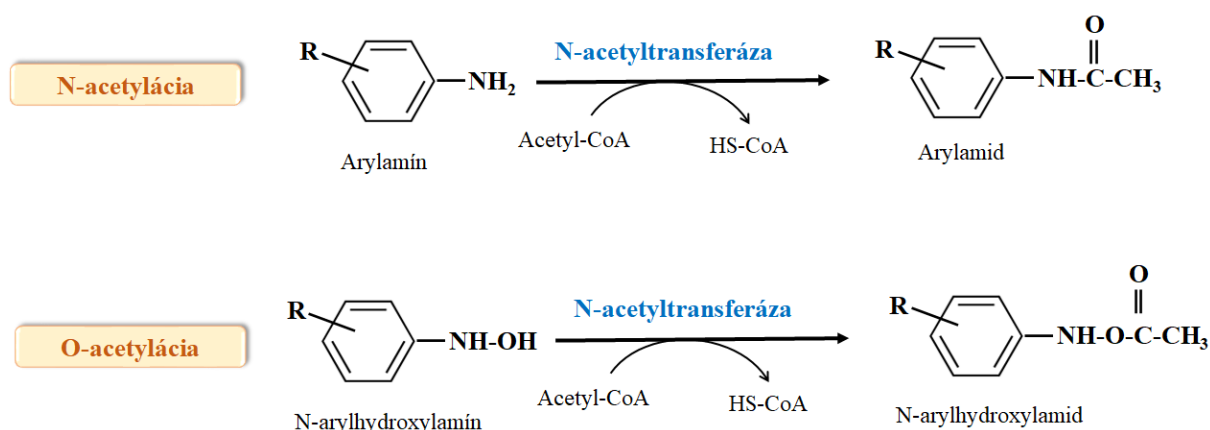


**Obrázok 27** Štruktúra ľudského NAT2 v komplexe s koenzýmom A (databanka proteínov - PDB ID: 2PFR)

#### 4.4.3. Katalytická aktivita NAT

Pre acetyláciu substrátov prostredníctvom NAT je esenciálna prítomnosť tiolovej skupiny aminokyseliny Cys<sup>68</sup>, ktorý sa priamo podieľa na prenose acetylu. Acetylačná reakcia prebieha „bi-bi ping-pongovým“ reakčným mechanizmom v dvoch po sebe nasledujúcich krokoch. V prvom kroku dochádza k prenosu acetylovej skupiny z acetyl-CoA na aminokyselinu Cys<sup>68</sup> enzýmu a následne v ďalšom kroku prenosu acetylu na primárny amín akceptorového substrátu. Prenos acetylu v NAT je uľahčený katalytickou triádou Cys-His-Asp (Cys<sup>68</sup>-His<sup>107</sup>-Asp<sup>122</sup> u ľudských NAT), ktorá je prísne konzervovaná u všetkých známych NAT od baktérií až po ľudí. Triáda stabilizuje tiolovú formu cysteínu, ktorý iniciuje reakciu nukleofilným atakom na karbonyl acetylu v acetyl-CoA.

N-acetylácia arylamínu na arylamid a O-acetylácia N-arylhydroxylamínu na N-arylhydroxylamid sú znázornené na obrázku 28.



**Obrázok 28** Reakcie katalyzované NAT

#### 4.4.4. Genetické variácie NAT a nádorové ochorenia

N-acetylačný polymorfizmus bol prvýkrát identifikovaný u pacientov, ktorým sa podával liek proti tuberkulóze, izoniazid. U niektorých pacientov sa potvrdil nižší terapeutický účinok lieku a v moči sa zistila prítomnosť neúčinnnej konjugovanej formy lieku. Neskoršie štúdie potvrdili tieto prvé pozorovania, ako aj hypotézu, že *NAT* polymorfizmy vedú k interindividuálnym rozdielom v metabolizácii liekov a boli navrhnuté potenciálne kategórie „pomalých“ a „rýchlych“ acetylátorov. U pomalých acetylátorov sa potvrdila toxicita lieku a tiež nižšia hladina acetylovaného produktu, N-acetyl-izoniazidu v moči. Vysoká frekvencia *NAT1* a *NAT2* acetylačného polymorfizmu v ľudskej populácii v spojitosti s expozíciou aromatickými a heterocyklickými amínmi naznačuje, že *NAT1* a najmä *NAT2* acetylátorové genotypy sú dôležitými modifikátormi náchylnosti na vznik nádorových ochorení, ako sú karcinóm močového mechúra, karcinóm hrubého čreva, karcinóm pečene, karcinóm prsníka, karcinóm prostaty, karcinóm hlavy a krku atď.

Aktuálna nomenklatúra *NAT1* a *NAT2* alel zverejnená medzinárodnou komisiou je na internetovej stránke <http://nat.mbg.duth.gr/>. V tabuľke 14 sú uvedené *NAT2* alely a príslušné fenotypy. Referenčné alely *NAT1* a *NAT2* (*NAT1*\*4 a *NAT2*\*4) sú spojené s fenotypom „rýchly“ acetylátor. V kódujúcej oblasti *NAT2* génu bolo charakterizovaných sedem nesynonymických mutácií (missense mutácia, mutácia meniaci zmysel;  $G^{191}A$ ,  $T^{341}C$ ,  $A^{434}C$ ,  $G^{590}A$ ,  $A^{803}G$ ,  $A^{845}C$  a  $G^{857}A$ ) a päť tichých mutácií ( $T^{111}C$ ,  $C^{282}T$ ,  $C^{481}T$ ,  $C^{759}T$  a  $A^{803}G$ ).

**Tabuľka 14** Ľudské *NAT2* alely

| Alela           | Fenotyp | Nukleotidová záměna  | Změna aminokyseliny  |
|-----------------|---------|--|--|
| <i>NAT2*4</i>   | Rýchly  | Žiadna   | Žiadna   |
| <i>NAT2*5A</i>  | Pomalý  | T <sup>341</sup> C, C <sup>481</sup> T   | Ile <sup>114</sup> →Thr  |
| <i>NAT2*5B</i>  | Pomalý  | T <sup>341</sup> C, C <sup>481</sup> T, A <sup>803</sup> G                     | Ile <sup>114</sup> →Thr<br>Lys <sup>268</sup> →Arg                           |
| <i>NAT2*5C</i>  | Pomalý  | T <sup>341</sup> C, A <sup>803</sup> G   | Ile <sup>114</sup> →Thr<br>Lys <sup>268</sup> →Arg                           |
| <i>NAT2*5D</i>  | Pomalý  | T <sup>341</sup> C   | Ile <sup>114</sup> →Thr  |
| <i>NAT2*5E</i>  | Pomalý  | T <sup>341</sup> C, G <sup>590</sup> A   | Ile <sup>114</sup> →Thr<br>Arg <sup>197</sup> →Gln                           |
| <i>NAT2*5F</i>  | Pomalý  | T <sup>341</sup> C, C <sup>481</sup> T, T <sup>759</sup> T, A <sup>803</sup> G | Ile <sup>114</sup> →Thr<br>Lys <sup>268</sup> →Arg                           |
| <i>NAT2*6A</i>  | Pomalý  | C <sup>282</sup> T, G <sup>590</sup> A   | Arg <sup>197</sup> →Gln  |
| <i>NAT2*6B</i>  | Pomalý  | G <sup>590</sup> A   | Arg <sup>197</sup> →Gln  |
| <i>NAT2*6C</i>  | Pomalý  | C <sup>282</sup> T, G <sup>590</sup> A, A <sup>803</sup> G                     | Arg <sup>197</sup> →Gln<br>Lys <sup>268</sup> →Arg                           |
| <i>NAT2*6D</i>  | Pomalý  | T <sup>111</sup> C, C <sup>282</sup> T, G <sup>590</sup> A,                    | Arg <sup>197</sup> →Gln  |
| <i>NAT2*7A</i>  | Pomalý  | G <sup>857</sup> A,  | Lys <sup>286</sup> →Glu  |
| <i>NAT2*7B</i>  | Pomalý  | C <sup>282</sup> T, G <sup>857</sup> A,  | Lys <sup>286</sup> →Glu  |
| <i>NAT2*10</i>  | Neznámy | G <sup>499</sup> A   | Glu <sup>167</sup> →Lys  |
| <i>NAT2*11</i>  | Neznámy | C <sup>481</sup> T   | Žiadna   |
| <i>NAT2*12A</i> | Rýchly  | A <sup>803</sup> G   | Lys <sup>268</sup> →Arg  |
| <i>NAT2*12B</i> | Rýchly  | C <sup>282</sup> T, A <sup>803</sup> G   | Lys <sup>268</sup> →Arg  |
| <i>NAT2*12C</i> | Rýchly  | C <sup>481</sup> T, A <sup>803</sup> G   | Lys <sup>268</sup> →Arg  |
| <i>NAT2*13</i>  | Rýchly  | C <sup>282</sup> T   | Žiadna   |
| <i>NAT2*14A</i> | Pomalý  | G <sup>191</sup> A   | Arg <sup>64</sup> →Gln   |
| <i>NAT2*14B</i> | Pomalý  | G <sup>191</sup> A, C <sup>282</sup> T   | Arg <sup>64</sup> →Gln   |
| <i>NAT2*14C</i> | Pomalý  | G <sup>191</sup> A, T <sup>341</sup> C, C <sup>481</sup> T, A <sup>803</sup> G | Arg <sup>64</sup> →Gln<br>Ile <sup>114</sup> →Thr                            |
| <i>NAT2*14D</i> | Pomalý  | G <sup>191</sup> A, C <sup>282</sup> T, G <sup>590</sup> A,                    | Arg <sup>64</sup> →Gln<br>Arg <sup>197</sup> →Gln                            |
| <i>NAT2*14E</i> | Pomalý  | G <sup>191</sup> A, A <sup>803</sup> G   | Arg <sup>64</sup> →Gln<br>Lys <sup>268</sup> →Arg                            |
| <i>NAT2*14F</i> | Pomalý  | G <sup>191</sup> A, T <sup>341</sup> C, A <sup>803</sup> G                     | Arg <sup>64</sup> →Gln<br>Arg <sup>114</sup> →Thr<br>Lys <sup>268</sup> →Arg |
| <i>NAT2*14G</i> | Pomalý  | G <sup>191</sup> A, C <sup>282</sup> T, A <sup>803</sup> G                     | Arg <sup>64</sup> →Gln<br>Lys <sup>268</sup> →Arg                            |
| <i>NAT2*17</i>  | Pomalý  | A <sup>434</sup> C   | Gln <sup>145</sup> →Pro  |
| <i>NAT2*18</i>  | Neznámy | A <sup>845</sup> C   | Lys <sup>282</sup> →Thr  |
| <i>NAT2*14G</i> | Pomalý  | C <sup>190</sup> T   | Arg <sup>64</sup> →Trp   |

Genotypizácia siedmich najbežnejších polymorfizmov ( $G^{191}A$ ,  $T^{341}C$ ,  $G^{590}A$ ,  $G^{857}A$ ,  $A^{803}G$ ,  $C^{282}T$  a  $C^{481}T$ ) sa využíva pri predikcii fenotypu. Alely *NAT2* obsahujúce  $G^{191}A$ ,  $T^{341}C$ ,  $A^{434}C$ , a/alebo  $G^{590}A$  sú spojené s fenotypom „pomalý“ acetylátor. Fenotyp „pomalý“ acetylátor obsahuje jeden alebo viacero z týchto polymorfizmov – *NAT2*\*5, *NAT2*\*6, *NAT2*\*7 a *NAT2*\*14 a ich podtypov. *NAT2*\*12 je spojený s fenotypom „rýchly“ acetylátor.

Frekvencie *NAT2* alel sa líšia medzi etnickými skupinami. *NAT2*\*4 alela sa vyskytuje u 20-25% kaukazskej populácie, 36-41% afroamerickej populácie a 50% ázijskej populácie, pričom u japonskej populácie sa blíži k 70%. *NAT2*\*5 alely a jej podtypy sú najfrekventovanejšie u kaukazskej populácie (44%) a afroamerickej populácie (25-27%). Zistilo sa, že *NAT2*\*6 alely sú pomerne rovnomerne zastúpené medzi etnickými skupinami. *NAT2*\*7 alely sú frekventované u ázijskej populácie a *NAT2*\*14 najmä u afroamerickej populácie (8-9%). Tieto alely neboli identifikované u kaukazskej populácie.

Zatiaľ čo *NAT2* polymorfizmy sú intenzívne študované, funkčný význam *NAT1* polymorfizmov je študovaný menej. V lokuse *NAT1* génu boli identifikované nukleotidové substitúcie, inzercie a delécie. Ukázalo sa, že len niektoré z nich vedú k zámene aminokyselín a k zmene aktivity enzýmu.

Niektoré štúdie poukázali na mutagénny účinok heterocyklických amínov (napr. 2-amino-3-metylimidazol[4,5-f]chinolínu; 2-amino-1-metyl-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridínu) vznikajúcich pri varení mäsa a rýb. Zistilo sa, že najskôr dochádza k ich oxidácii prostredníctvom CYP1A2 a následná acetylácia vedie k zvýšeniu ich mutagénneho potenciálu.

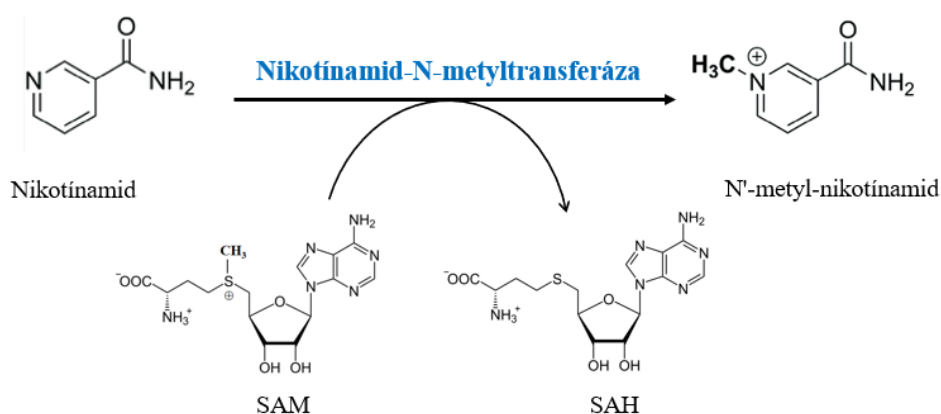
Napriek veľkému počtu štúdií zaoberajúcich sa vzťahom medzi *NAT* polymorfizmami a rizikom vzniku nádorových ochorení, publikované výsledky nie sú jednoznačné z viacerých dôvodov: nízky počet účastníkov v štúdiách; mnohé štúdie často zahŕňajú pacientov s rôznym etnickým pôvodom, ktorí vykazujú rôzne frekvencie rizikových alel; nedostatok informácií ohľadom expozície karcinogénmi; použité rôzne metódy genotypizácie atď. Potvrdila sa asociácia určitých *NAT1* polymorfizmov s karcinómom pľúc, karcinómom hrubého čreva, karcinómom močového mechúra a *NAT2* polymorfizmov s karcinómom pľúc, karcinómom pečene, karcinómom hrubého čreva, karcinómom močového mechúra, ako aj non-Hodgkinovým lymfómom. Preto na rozšírenie nášho súčasného chápania úlohy acetylačných polymorfizmov *NAT1* a *NAT2* s rizikom vzniku nádorových ochorení sú potrebné rozsiahlejšie a komplexnejšie molekulárno-epidemiologické štúdie, ktoré by skúmali úlohu genotypov a/alebo fenotypov *NAT1* a *NAT2* spolu s ďalšími polymorfizmami biotransformačných enzýmov.



## 4.5. ĎALŠIE ENZÝMY II. FÁZY BIOTRANSFORMÁCIE

### 4.5.1. Metyltransferázy

Metylácia je vo všeobecnosti menej významnou cestou biotransformácie xenobiótík. Metyltransferázy (MT) sú cytosólové enzýmy, ale môžu byť prítomné aj v ER. Na rozdiel od väčšiny iných konjugačných reakcií vznikajúci metylovaný produkt je menej polárny ako substrát a výsledkom sú buď neaktívne alebo aktívne zlúčeniny. MT sa podieľajú na metabolizme malých endogénnych molekúl (napr. neurotransmiterov), zohrávajú významnú úlohu v metabolizme makromolekúl (napr. nukleových kyselín) a pri biotransformácii niektorých liekov. Endogénne, ako aj exogénne zlúčeniny môžu podliehať N-, O-, S-metylácii. Kofaktorom metylačných reakcií je S-adenozylmetionín (SAM), ktorý vzniká kondenzáciou ATP a L-metionínu. Konjugačné reakcie katalyzované MT zahŕňajú prenos metylovej skupiny naviazanej na sulfóniový ión SAM na funkčnú skupinu substrátu za vzniku metylovaného produktu a S-adenozylhomocysteínu (SAH, Obr. 29).



**Obrázok 29** Metylácia nikotínamidu katalyzovaná nikotínamid-N-metyltransferázou

Bolo identifikovaných niekoľko N-metyltransferáz, medzi ktoré sa zaraďujú indoletylamín-N-metyltransferáza (INMT, EC 2.1.1.49), nikotínamid-N-metyltransferáza (NNMT, EC 2.1.1.1), histamín-N-metyltransferáza (HNMT, EC 2.1.1.8), fenyletanolamín-N-metyltransferáza (PNMT, EC 2.1.1.28) a ďalšie. INMT katalyzuje N-metyláciu tryptamínu a štruktúrne podobných zlúčenín. Je exprimovaná v pľúcach, štítnej žľaze, nadobličkách, srdci a vo svaloch, nie však v mozgu. NNMT je cytosólový enzým a katalyzuje N-metyláciu

nikotínamidu, pyridínov a ďalších štruktúrnych analógov. Je exprimovaná prevažne v pečeni, menej v obličkách, pľúcach, placentе a v srdci. HNMT je cytosólový enzým, ktorý katalyzuje metyláciu imidazolového kruhu histamínu. Je exprimovaná najmä v pečeni a v obličkách, menej v slezine, hrubom čreve, prostate, vaječníkoch, mozgu, prieduškách a v priedušnici.

Génové polymorfizmy *HNMT* môžu viesť k interindividuálnym rozdielom v metabolizme histamínu a dávajú sa do súvislosti s mnohými chorobami, ako sú alergia, astma a niektoré neuropsychiatrické ochorenia. PNMT zohráva významnú úlohu pri neuroendokrinnnej regulácii a pri regulácii krvného tlaku. Je jedným z enzýmov biosyntézy katecholamínov, katalyzuje N-metyláciu neurotransmitera noradrenalínu za vzniku adrenalínu. Je vysoko exprimovaná najmä v dreni nadobličiek. Niektoré zo štúdií poukázali na to, že génové polymorfizmy v promótorovej oblasti *PNMT* génu môžu byť spojené so zvýšeným rizikom vzniku Alzheimerovej choroby alebo so skorým nástupom sclerosis multiplex.

O-metylácia fenolov a katecholov je katalyzovaná dvoma rôznymi enzýmami, fenol-O-metyltransferázou (POMT, EC 2.1.1.25) a katechol-O-metyltransferázou (COMT, EC 2.1.1.6). POMT katalyzuje prenos metylovej skupiny SAM na hydroxylovú skupinu fenolu za vzniku anizolu. Tento enzým je lokalizovaný v mikrozómoch pečene, pľúc a ďalších tkanív. COMT sa podieľa na inaktivácii katecholamínov (adrenalínu, noradrenalínu, dopamínu), ako aj katecholestrogénov. Existujú dve formy ľudského COMT, rozpustná cytosólová forma (S-COMT) a forma viazaná v membránach drsného ER (MB-COMT). S-COMT je exprimovaná najmä v pečeni, čreve a v obličkách a MB-COMT je exprimovaná najmä v CNS. Funkčné polymorfizmy v génoch kódujúcich S-COMT a MB-COMT sa študujú vo vzťahu k rôznym neurologickým poruchám, ako je napríklad schizofrénia alebo Parkinsonova choroba.

Tiol-S-metyltransferáza (TMT, EC 2.1.1.9) je membránovo viazaný enzým, ktorý katalyzuje S-metyláciu alifatických tiolových zlúčenín. Tiopurín-S-metyltransferáza (TPMT, EC 2.1.1.67) je cytosólový enzým, ktorý katalyzuje S-metyláciu aromatických a heterocyklických tiolových zlúčenín vrátane protinádorových liekov a imunosupresív (napr. 6-merkaptopurínu, 6-tioguanínu a azatioprínu). Génové polymorfizmy *TPMT* sa spájajú s interindividuálnymi rozdielmi v toxicite tiopurínových liekov a ich terapeutickú účinnosti.

#### 4.5.2. Konjugácia xenobiotík s aminokyselinami

Xenobiotiká obsahujúce karboxylovú skupinu, akými sú mnohé široko používané liečivá (napr. simvastatín, kyselina valproová alebo kyselina acetylsalicylová), herbicídy, insekticídy a konzervačné látky v potravinách môžu byť konjugované s aminokyselinami. Okrem toho mnohé xenobiotiká sú metabolizované na karboxylové kyseliny, ktoré môžu byť tiež následne konjugované s aminokyselinami. Či dané xenobiotikum bude konjugované s aminokyselinou závisí od sterickej zábrany okolo karboxylovej skupiny a od substituentov na aromatickom kruhu alebo na alifatickom bočnom reťazci.

Vo všeobecnosti sa konjugácia karboxylových kyselín s aminokyselinami líši od ostatných konjugáčnych reakcií a je spojená s enzýmovým systémom, ktorý zahŕňa:

- počiatočnú aktiváciu karboxylovej skupiny s ATP za vzniku acyladenylátu a difosfátu,
- reakcia acyladenylátu s koenzýmom A (CoA-SH) za vzniku „vysokoenergetického medziproduktu“ xenobiotikum-acyl-CoA,
- väzba aktivovanej acylovej skupiny na aminoskupinu akceptorovej aminokyseliny za súčasnej regenerácie CoA-SH.

Žľčové kyseliny sú konjugované podobným sekvenčným mechanizmom, avšak enzýmy sú lokalizované v ER a peroxizómoch a v prípade konjugácie karboxylových kyselín xenobiotík enzýmy sú prítomné najmä v mitochondriách pečene a obličiek.

Najbežnejšími aminokyselinami, ktoré sú konjugované s xenobiotikami sú glycín, taurín a glutamát. Glycín-N-acyltransferáza (GLYAT, EC 2.3.1.13) je enzým zodpovedný za konjugáciu xenobiotík, najmä benzoátov prítomných v rastlinnej potrave, s glycínom. V rastlinnej potrave sú tiež prítomné polyfenoly, ktoré sú baktériami črevnej flóry fermentované na benzoát, 3- a 4-hydroxybenzoáty a zodpovedajúce hydroxyfenylpropionáty. Po absorpcii v čreve, sú tieto zlúčeniny transportované do pečene, kde sú konjugované s CoA-SH pomocou špecifickej CoA-ligázy. Následne GLYAT konjuguje xenobiotikum-acyl-CoA s glycínom. Približne 83-90% benzoátu z potravy je vylučovaného ako konjugáty s glycínom. Pri hepatocelulárnom karcinóme bolo dokázané, že GLYAT nie je exprimovaná v nádorových bunkách, ale jej expresia sa zistila v susediacich zdravých hepatocytoch, čo môže viesť k akumulácii xenobiotikum-acyl-CoA, ktorý môže okrem toxických účinkov narušiť tvorbu energie v mitochondrii.

## 5. ELIMINÁCIA XENOBIOTÍK A ICH METABOLITOV Z ORGANIZMU

Posledným krokom metabolizácie xenobiotík je transport konjugátov a iných metabolitov z bunky prostredníctvom transportérov a ich následná exkrécia z organizmu. Tento krok sa často označuje ako III. fáza biotransformácie, aj keď je potrebné si uvedomiť, že popisuje transport molekuly cez membránu bez zmeny jej chemickej štruktúry. Existujú dve hlavné cesty vylúčenia xenobiotík a ich metabolitov z organizmu – renálna exkrécia a exkrécia prostredníctvom žlče. Pľúcna exkrécia je dôležitá pre elimináciu anestetických plynov a pár a tiež niektorých ďalších liekov. Ďalší spôsob eliminácie niektorých xenobiotík je prostredníctvom slín, potu a materského mlieka.

Mechanizmy renálnej exkrécie sú:

- *Filtrácia.* Substráty, ktoré sú polárne alebo nabité, a málo sa viažu na plazmatické proteíny sú primárne eliminované prostredníctvom glomerulárnej filtrácie (napr. aminoglykozidové antibiotiká).
- *Sekrécia.* Niektoré xenobiotiká sú odstránené z plazmy a vylučované do proximálnych tubulov obličiek prostredníctvom aktívneho transportu na základe náboja danej zlúčeniny. Prvý systém transportuje slabé kyseliny a druhý zásadité zlúčeniny. Tieto transportné systémy sú relatívne neselektívne a xenobiotiká s podobným nábojom súťažia o transport. Hlavnými sekrečnými transportérmi obličky sú SLC transportéry a ABC transportéry.
- *Reabsorbcia.* Lipofilné zlúčeniny sú reabsorbované v tubuloch a málo eliminované prostredníctvom obličiek. Reabsorbcia sa uskutočňuje v smere koncentračného gradientu z tubulárnej tekutiny do plazmy, pričom reabsorbcia slabých elektrolytov je vysoko závislá od pH.

Pečeň zohráva veľmi významnú úlohu pri odstraňovaní xenobiotík z krvi po ich absorpcii z GIT. Veľké, lipofilné zlúčeniny, ktoré sa viažu na proteíny sú vylučované prostredníctvom žlče. Stupeň exkrécie xenobiotika prostredníctvom žlče ovplyvňujú mnohé faktory, ako sú napríklad molekulová hmotnosť xenobiotika, prítomnosť polárnych skupín, chemická štruktúra xenobiotika atď.

Transportéry zabezpečujúce translokáciu xenobiotík a ich metabolitov cez membránu obsahujú transmembránové domény a jednu alebo viac väzbových domén pre substrát. Transport je aktívny a uskutočňuje sa proti koncentračnému gradientu. Vo všeobecnosti sa na

ňom podieľajú SLC transportéry (mnoholiekové a toxíny extrudujúce proteíny, MATE) a rodina kaziť viažucich ATP (ABC transportéry). ABC transportéry sa tiež označujú ako efluxné transportéry, sú závislé od ATP a pumpujú xenobiotiká/lieky von z bunky. Transportéry SLC transportujú substráty v oboch smeroch a využívajú elektrochemický gradient. Substráty sú transportované uľahčeným transportom alebo sekundárnym aktívnym transportom.

## 5.1. ABC TRANSPORTÉRY

ABC transportéry predstavujú širokú rodinu membránových transportérov, receptorov a iónových kanálov. Rozdeľujú sa do siedmych rodín (A-G). Tvorí ich 49 proteínov, pričom 20 z nich je prítomných v plazmatickej membráne a podieľa sa na transporte xenobiotík a ich metabolitov. Mnohé z ľudských ABC proteínov sú efluxné transportéry, pričom tri z nich P-glykoproteín (P-gp), proteíny mnoholiekovej rezistencie (MRP) a proteín rezistencie karcinómu prsníka (BCRP) sú hlavnými efluxnými transportérmi zodpovednými za mnoholiekovú rezistenciu (Tab. 15).

**Tabuľka 15** Základná charakteristika ABC transportérov

| Proteín     | Gén           | Veľkosť (AK) | Lokalizácia v membráne |
|-------------|---------------|--------------|------------------------|
| MDR1 (P-GP) | <i>ABCB1</i>  | 1280         | Apikálna               |
| MDR2        | <i>ABCB4</i>  | 1279         | Apikálna               |
| BESP        | <i>ABCB11</i> | 1321         | Apikálna               |
| MRP1        | <i>ABCC1</i>  | 1531         | Bazolaterálna          |
| MRP2        | <i>ABCC2</i>  | 1545         | Apikálna               |
| MRP3        | <i>ABCC3</i>  | 1527         | Bazolaterálna          |
| MRP4        | <i>ABCC4</i>  | 1325         | Bazolaterálna          |
| MRP5        | <i>ABCC5</i>  | 1437         | Bazolaterálna          |
| MRP6        | <i>ABCC6</i>  | 1503         | Apikálna               |
| MRP7        | <i>ABCC10</i> | 1492         | Apikálna               |
| MRP8        | <i>ABCC11</i> | 1382         | Apikálna               |
| MRP9        | <i>ABCC12</i> | 1356         | —                      |
| BCRP        | <i>ABCG2</i>  | 655          | Apikálna               |

Prvým identifikovaným transportérom liekov bol **P-glykoproteín (P-gp)**, známy tiež ako MDR1 proteín (multidrug resistance 1 protein). Je kľúčovým členom ABCB1 rodiny. Je lokalizovaný v apikálnej membráne polarizovaných buniek, napríklad v bunkách črevnej sliznice, v hepatocytoch (v membráne smerujúcej k žľčovodu), v bunkách proximálnych tubulov (kefkové okraje) a v endotelových bunkách kapilár mozgu a semenníkov; t.j. v

klúčových miestach, ktoré zahŕňajú príjem a vylučovanie xenobiotík. P-gp exportuje substrát z bunky pomocou energie získanej hydrolýzou ATP, pričom stechiometria je 0,3~3 molekuly ATP na jednu molekulu substrátu. Preferenčne sú transportované zlúčeniny obsahujúce zásaditý atóm dusíka a dve planárne aromatické domény, avšak P-gp sa podieľa tiež na transporte lipofilných amfipatických zlúčenín. Okrem eliminácie cudzorodých látok sa P-gp podieľa na transporte hormónov a lipidov, reprodukcii, bunkovej imunite a regulácii objemu buniek. P-gp sprostredkúva transport širokého spektra substrátov a liekov (veľkosti od 300 do 2000 Da), vrátane chemoterapeutík, inhibítorov HIV proteázy, imunosupresív, antiarytmík, blokátorov vápnikových kanálov, analgetík, antihistaminík, antibiotík, prírodných produktov, fluorescenčných farbív a pesticídov. Transport substrátov sprostredkovaný P-gp môže byť inhibovaný určitými zlúčeninami, ktoré sa označujú ako „reverzné činidlá“ alebo „inhibítory P-gp“ s potenciálnym farmakologickým využitím v medicíne. Existuje niekoľko možných mechanizmov pôsobenia týchto inhibítorov cez narušenie hydrolýzy ATP, zmeny exprese P-gp až po reverzibilnú/ireverzibilnú kompetíciu o P-gp väzbové miesto.

Druhú, nemenej dôležitú rodinu transportérov ABC predstavuje rodina ABCC1, zahŕňajúca **MRP1** a **MRP2 proteíny**. MRP1 proteín je vysoko exprimovaný v bazolaterálnej membráne polarizovaných epitelových buniek obličky (distálny tubul a glomeruly), čreva, mozgu, pľúc, semenníkov, placentárnych endotelových buniek a v pečeni (nižšie hladiny). Podieľa sa na transporte štruktúrne rôznorodých amfipatických organických aniónov konjugovaných s GSH, glukuronátom a sulfátom. Môže sa tiež podieľať na transporte nekonjugovaných protinádorových liekov prostredníctvom kotransportného mechanizmu s GSH.

Substráty MRP2 proteínu sú veľmi podobné substrátom MRP1 proteínu, zabezpečuje ATP-dependentný transport organických aniónov, vrátane konjugátov so sulfátom, glukuronátom (bilirubíndiglukuronid) a GSH. Líšia sa lokalizáciou v membráne, MRP2 je lokalizovaný v apikálnej membráne hepatocytov, buniek črevnej sliznice, buniek proximálnych tubulov obličiek a buniek syncytiotrofoblastu. Táto orientácia umožňuje MRP2 riadiť exkréciu xenobiotík do žlče, stolice a moču.

MRP3 sa podieľa na transporte širokého spektra organických aniónov so značne sa prekrývajúcou špecifitou s inými transportérmi, vrátane MRP1 a MRP2. MRP3 sa podieľa na extrúzii monovalentných žľových kyselín (taurocholát a glykocholát). Ďalšími preferovanými substrátmi sú konjugáty glukuronátu. Podobne ako MRP1, aj MRP3 je lokalizovaný v bazolaterálnej membráne polarizovaných buniek pečene, nadobličiek, placenty, semenníkov, čreva, žlčníka a jeho expresia je nižšia v pankrease, obličkách a v pľúcach.

Najvyššia expresia MRP4 je v prostate, nižšia v pľúcach, kostrovom svale, pankrease, slezine, týmuse, semenníkoch, vaječníkoch a v tenkom čreve. Jedinečnou charakteristikou MRP4 je jeho duálna lokalizácia v polarizovaných bunkách. MRP4 sa môže nachádzať v apikálnej, ako aj v bazolaterálnej membráne cieľových buniek v závislosti od bunky a tkaniva. Ďalšou jedinečnou vlastnosťou MRP4 okrem transportu liekov je transport širokého spektra endogénnych molekúl vrátane cyklických nukleotidov, ADP, eikozanoidov, urátov, konjugovaných steroidných hormónov, folátu, žľových kyselín, GSH, čím sa podieľa na mnohých fyziologických, ako aj patofyziologických procesov v organizme.

Hlavnou funkciou MRP5 proteínu je transport cyklických nukleotidov a ich analógov. MRP5 proteín je exprimovaný v nízkych hladinách vo väčšine tkanív, ako je kostrový sval, srdce, mozog a rohovka. V polarizovaných bunkách je MRP5 proteín prednostne lokalizovaný v bazolaterálnej membráne.

Najvyššie hladiny exprese MRP6 proteínu sú v pečeni a v obličkách. Podobne ako MRP1 a MRP3, aj MRP6 sa nachádza v bazolaterálnej membráne polarizovaných endotelových a epitelových buniek. Podieľa sa na transporte organických aniónov, nie však glukuronidov.

MRP7 je exprimovaný v pankrease, hrubom čreve, koži a v semenníkoch. Transportuje fyziologické substráty vrátane glukuronidov a GSH. MRP8 je lokalizovaný v apikálnej membráne polarizovaných epitelových buniek. Je exprimovaný v axónoch neurónov centrálného a periférneho nervového systému človeka a sprostredkúva eflux neuromodulačných steroidov, ako je napríklad DHEAS. Okrem toho, MRP8 proteín sa môže podieľať na transporte cyklických nukleotidov (cGMP a cAMP), žľových kyselín, steroidov konjugovaných so sulfátom/glukuronátom, alebo iných konjugovaných organických aniónov.

**Proteín rezistencie karcinómu prsníka (BCRP; Breast Cancer Resistance Protein)** je členom ABCG rodiny a je kódovaný *ABCG2* génom. BCRP je polovičným ABC transportérom, ktorý vyžaduje dimerizáciu dvoch BCRP proteínov, aby bol plne funkčný. BCRP bol prvýkrát identifikovaný v bunkových líniiach karcinómu prsníka rezistentných na doxorubicín (MCF-7/AdrVp). Zistilo sa, že BCRP je exprimovaný v mnohých ľudských tkanivách, ako je črevo, pečeň, obličky, semenníky, maternica, placenta, laktujúca mliečna žľaza a CNS.

Eliminuje široké spektrum protinádorových liekov, konjugáty sulfátu a glukuronátu, steroly a xenobiotiká, prírodné zlúčeniny a toxíny, fluorescenčné farbivá, fotosenzibilizátory (napr. feoforbid A a protoporfyrín IX) a niektoré antibiotiká. BCRP tiež transportuje konjugované organické anióny vrátane endogénnych látok (estrón-3-sulfát, DHEAS a estradiol-17 $\beta$ -D-glukuronid). Vo všeobecnosti konjugáty sulfátov sú lepšími substrátmi BCRP ako konjugáty

glukuronátu alebo GSH. Okrem toho, nukleotidy a ich monofosfáty sú tiež substrátmi BCRP. Mnohé z BCRP substrátov sú substrátmi aj P-gp a podobne, mnohé P-gp inhibítory sú tiež BCRP inhibítormi. Niekoľko štúdií poukázalo na to, že BCRP by mohol byť prognostickým markerom niektorých nádorových ochorení. Značný počet klinických štúdií sledoval vzťah medzi expresiou BCRP a prevalenciou rôznych nádorových ochorení, vrátane hematologických malignít. Mnohé z týchto štúdií poukázali na pozitívnu koreláciu medzi zvýšenou expresiou BCRP a zlou prognózou niektorých nádorových ochorení.

## **5.2. MNOHOLIEKOVÉ A TOXÍNY EXTRUDUJÚCE PROTEÍNY (MATE)**

Mnoholiekové a toxíny extrudujúce proteíny (MATE; Multidrug and Toxin Extrusion Proteins) patria do rodiny SLC transportérov. MATE sú elektroneutrálne antiportéry  $H^+$ /organických katiónov a  $NH_4Cl$  stimuluje ich transportnú aktivitu. Hnacou silou MATE je  $H^+$  gradient ( $[H^+]_{vnútri} > [H^+]_{von}$ ), ktorý sa udržiava prostredníctvom  $Na^+/H^+$  výmenníka a/alebo  $H^+$  pumpy.

Delia sa do dvoch tried MATE1 a MATE2. Zostrihové varianty MATE2 sú MATE2-B a MATE2-K. MATE1 je vysoko exprimovaný najmä v lumenálnych membránach renálnych tubulov a žľazových kanálikov, a menej v nadobličkách, kostrových svaloch, semenníkoch a v placentе počas prvého trimestra. MATE2-K je exprimovaný v obličkách. Zistilo sa, že hladiny mRNA MATE1 a MATE2-K v obličkách sú podobné, obidva transportéry sú lokalizované v membránach kefkového lemu proximálnych tubulov obličiek a zohrávajú významnú úlohu pri tubulárnej sekrécii katiónových liekov do moča. MATE2-B sú exprimované vo všetkých tkanivách okrem obličiek, pričom ich fyziologická úloha nie je známa.

MATE1 a MATE2-K sa vyznačujú veľmi podobnou substrátovou špecifitou. Substrátmi MATE1 a MATE2-K sú organické katióny, ako napríklad tetraetylamónium; 4',6-diamidino-2-fenylindol; 1-metyl-4-fenylpyridínium; niektoré lieky a mnohé toxíny. Ich substrátmi sú aj niektoré endogénne zlúčeniny ako je kreatinín, dopamín, estrón-3-sulfát, guanidín, N-metylnikotínamid a tiamín. Tieto zlúčeniny sú tiež často substrátmi OCT, ktoré sú lokalizované v bazolaterálnej membráne zodpovedajúcich buniek, čo naznačuje spoluprácu MATE s OCT na eliminácii týchto organických katiónov.



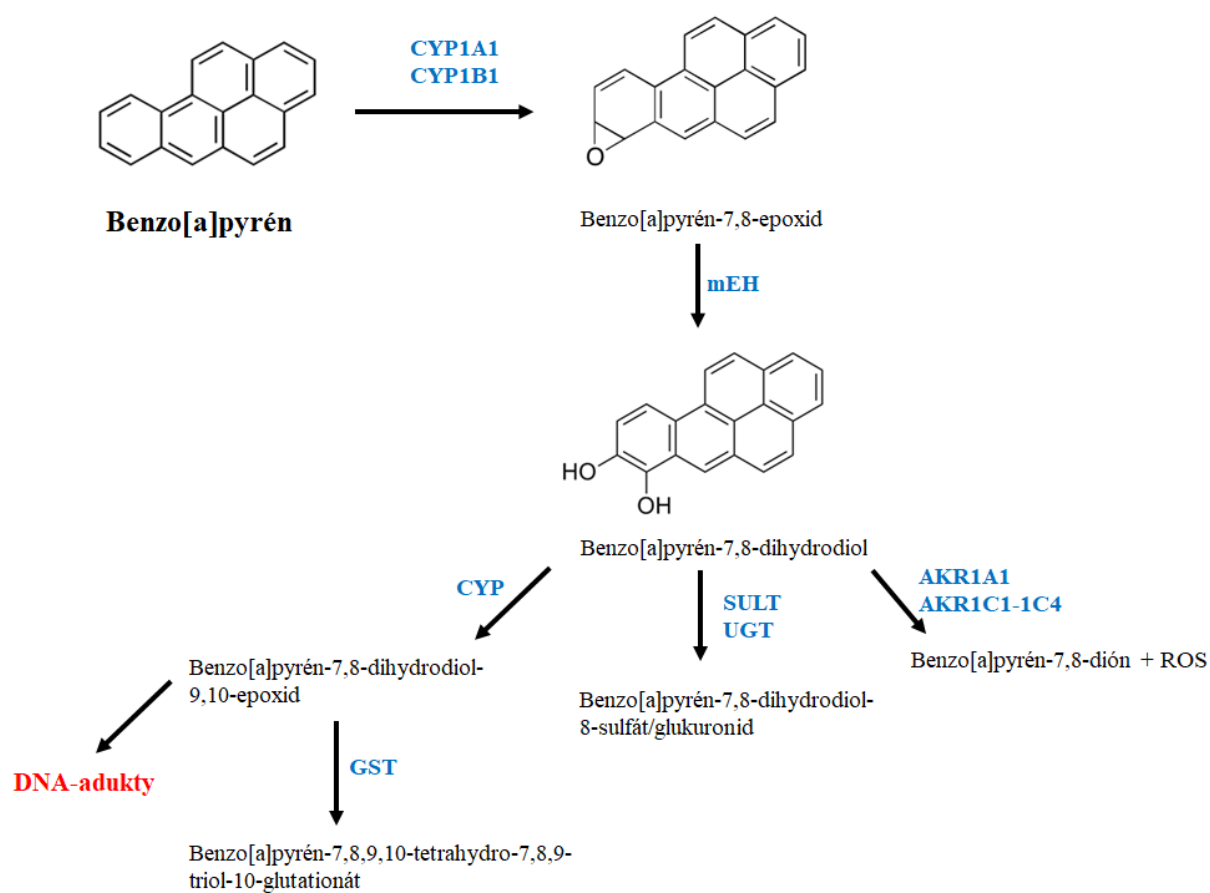
## 6. ELIMINÁCIA VYBRANÝCH XENOBIOTÍK A ICH METABOLITOV PROSTREDNÍCTVOM BIOTRANSFORMAČNÝCH ENZÝMOV

### 6.1. BIOTRANSFORMÁCIA BENZO[a]PYRÉNU

Benzo[a]pyrén patrí do skupiny PAU a Medzinárodnou agentúrou pre výskum rakoviny ([www.iarc.who.int](http://www.iarc.who.int)) bol klasifikovaný ako karcinogén I. triedy. Vzniká pri nedokonalom spaľovaní organických materiálov pri vysokých teplotách. Je prítomný v uhoľnom dechte, v cigaretovom dyme, vo výfukových plynách, ako aj v grilovaných a v údených potravinách. Do ovzdušia sa tiež uvoľňuje pri požiaroch lesov, ako aj pri vulkanickej činnosti.

Hlavné cesty metabolizácie benzo[a]pyrénu sú zhrnuté na obrázku 30. Prvým krokom metabolizácie benzo[a]pyrénu je jeho oxidácia v polohe 7 a 8 najmä prostredníctvom CYP1A1 za vzniku toxického metabolitu benzo[a]pyrén-7,8-epoxidu. Ten je následne hydroxylovaný mEH za vzniku benzo[a]pyrén-7,8-dihydrodiolu, ktorý môže podliehať ďalšej oxidácii katalyzovanej CYP, ktorou sa tvorí ultimátny karcinogén – benzo[a]pyrén-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid. Ukázalo sa, že v bunkovom jadre sa diol-epoxidy môžu kovalentne viazať na DNA, čím vznikajú deoxyguanozín-DNA adukty, ktoré môžu viesť k chybnnej replikácii a tumorigenéze.

Produkty vznikajúce oxidáciou benzo[a]pyrénu sú následne konjugované s GSH, glukuronátom, sulfátom, čím vznikajú príslušné konjugáty, ktoré sú vďaka svojej hydrofilnej povahe účinne eliminované z organizmu.

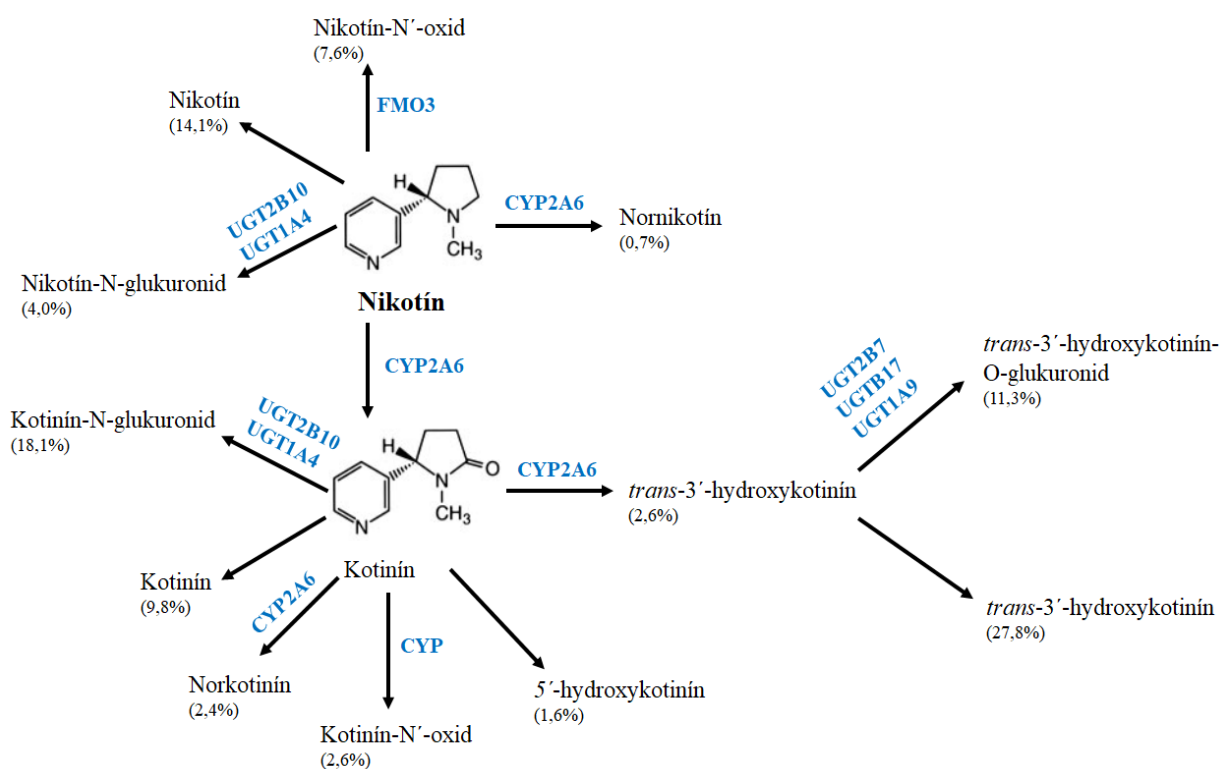


**Obrázok 30** Hlavné cesty metabolizácie benzo[a]pyrénu (prevzaté z Decker M a kol. Arch Toxicol. 83: 297-318, 2009)

## 6.2. BIOTRANSFORMÁCIA NIKOTÍNU

Hlavné cesty metabolizácie nikotínu sú zhrnuté na obrázku 31. U ľudí, 70-80% nikotínu je metabolizovaného C-oxidáciou na kotinín a v menšej miere N-oxidáciou na nikotín-N'-oxid. Nikotín podlieha tiež N-demetylácií a N-glukuronidácii. Kotinín je ďalej hydroxylovaný na *trans*-3'-hydroxykotinín a 5'-hydroxykotinín. Kotinín podlieha tiež N-oxidácii za vzniku kotinín-N'-oxidu a N-glukuronidácii za vzniku kotinín-N-glukuronidu. *Trans*-3'-hydroxykotinín je ďalej O-glukuronidovaný na *trans*-3'-hydroxykotinín-O-glukuronid.

Boli identifikované aj ďalšie minoritné metabolity nikotínu, ktoré však predstavujú menej ako 10% celkového metabolizmu nikotínu. Stanovenie nikotínu, kotinínu, *trans*-3'-hydroxykotinínu a ich zodpovedajúcich konjugátov s glukuronátom v moči reprezentujú približne 85-95% z celkového príjmu nikotínu. Na metabolizácii nikotínu sa podieľajú enzýmy CYP, aldehydoxidázy, FMO3, amín-N-metyltransferázy a UGT.

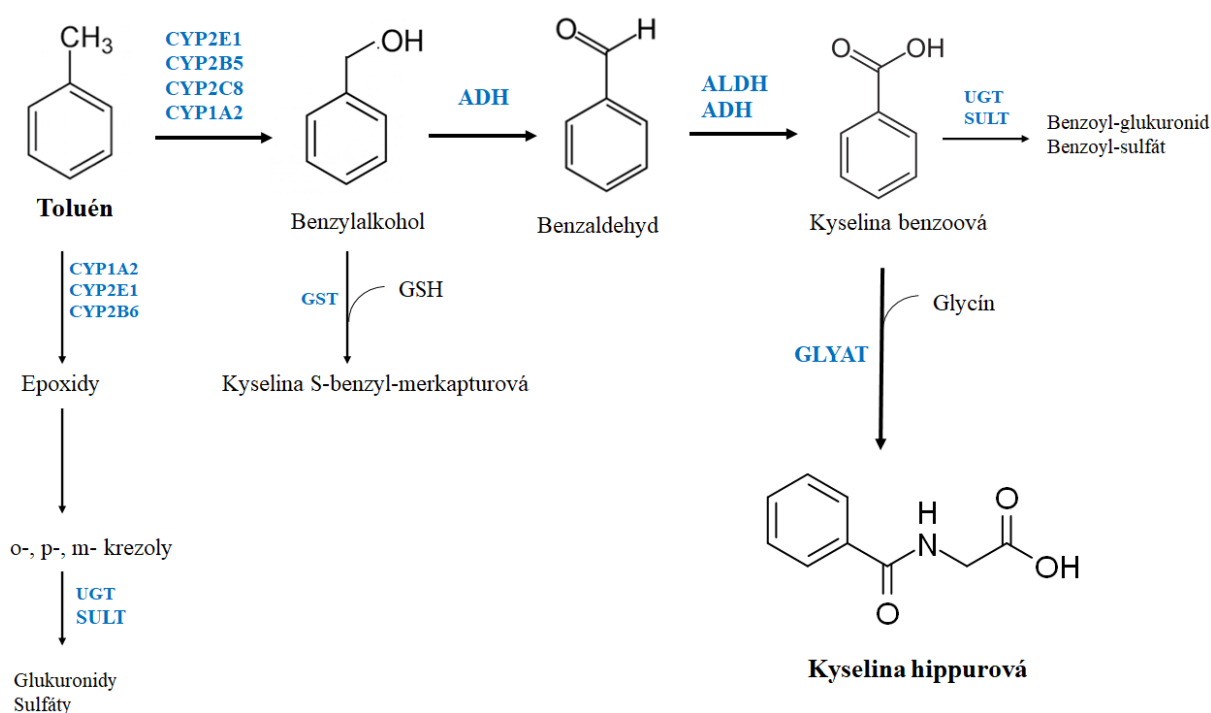


**Obrázok 31** Hlavné cesty metabolizácie nikotínu u ľudí. % = molárne percento (%) detegovaného nikotínu a jeho metabolitov v moči fajčiarov (prevzaté z Tricker AR. Toxicology. 183: 151-173. 2003)

### 6.3. BIOTRANSFORMÁCIA TOLUÉNU

Toluén (metylbenzén) je bezfarebná, prchavá kvapalina s charakteristickým sladkým zápachom. Používa sa ako organické rozpúšťadlo v priemysle pri výrobe plastov, chemickej syntéze a výrobe benzínu. Toluén je prchavá kvapalina (t. j. pri izbovej teplote sa stáva parou), má psychoaktívne účinky, keď je úmyselne vdychovaný v čistej forme alebo z mnohých komerčných produktov, ako sú rozpúšťadlá, benzín, farby, laky, riedidlá atď. Hladiny toluénu 500 ppm sa považujú za nebezpečné pre život a zdravie (Public Health Statement for Toluene, 2015).

Hlavné cesty metabolizácie toluénu sú zhrnuté na obrázku 32. Väčšina absorbovaného toluénu (80%) je oxidovaného v pečeni rôznymi CYP izoenzýmami na benzylalkohol, ktorý sa premieňa na kyselinu benzoovú v dvoch krokoch katalyzovaných ADH a ALDH. Kyselina benzoová sa následne konjuguje s glycínom za vzniku kyseliny hippurovej (83-94% metabolitov v moči), alebo s glukuronátom za vzniku benzylglukuronidu (3-9 % metabolitov v moči). Minoritne tiež prebieha hydroxylácia kruhu, pričom vznikajú 2,3- a 3,4-epoxidy, prekursorzy o-, m- a p-krezolu.

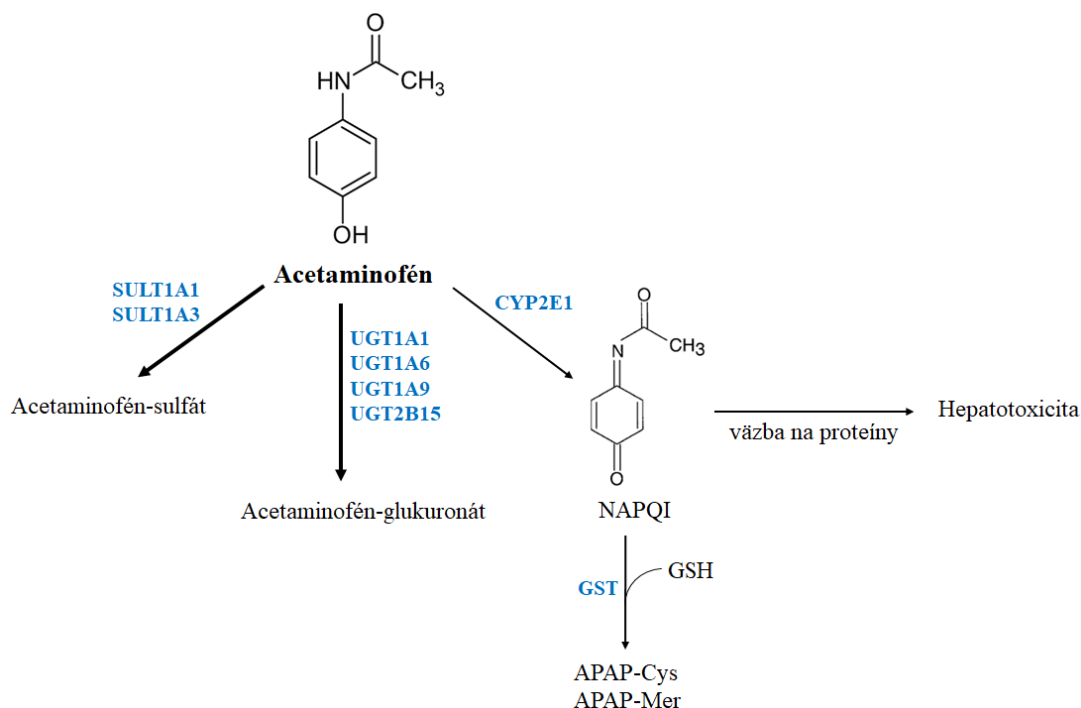


**Obrázok 32** Hlavné cesty metabolizácie toluénu u ľudí (prevzaté z Hubková B a kol. Interdiscip Toxicol. 11: 22-26, 2018)

## 6.4. BIOTRANSFORMÁCIA ACETAMINOFÉNU

Acetaminofén (N-acetyl-p-aminofenol, APAP alebo paracetamol, PARA) je široko používané analgetikum a antipyretikum od detí až po dospelých. Hlavným orgánom, ktorý sa podieľa na metabolizácii APAP je pečeň a v menšej miere obličky a črevo. Hlavné cesty metabolizácie APAP sú zhrnuté na obrázku 33. APAP je metabolizovaný na farmakologicky neaktívne konjugáty glukuronidu (52-57% metabolitov v moči) a sulfátu (30-44% metabolitov v moči). Približne 5-10% APAP sa oxiduje na reaktívny metabolit N-acetyl-p-benzochinónimín (NAPQI) a menej ako 5% sa vylučuje nezmenený.

Vznikajúci NAPQI sa viaže na tiolovú skupinu cysteínu GSH za vzniku APAP-GSH, ktorý sa po premene vylučuje močom ako konjugáty cysteínu (APAP-Cys) a kyseliny merkapturovej (APAP-Mer). NAPQI je vysoko reaktívny, môže sa viazať na proteíny a spôsobiť poškodenie hepatocytu. Dochádza k tomu najmä pri častom užívaní vysokých dávok APAP a tiež u chronických alkoholikov, u ktorých je APAP prednostne oxidovaný na NAPQI, z dôvodu indukcie CYP2E1 alkoholom.

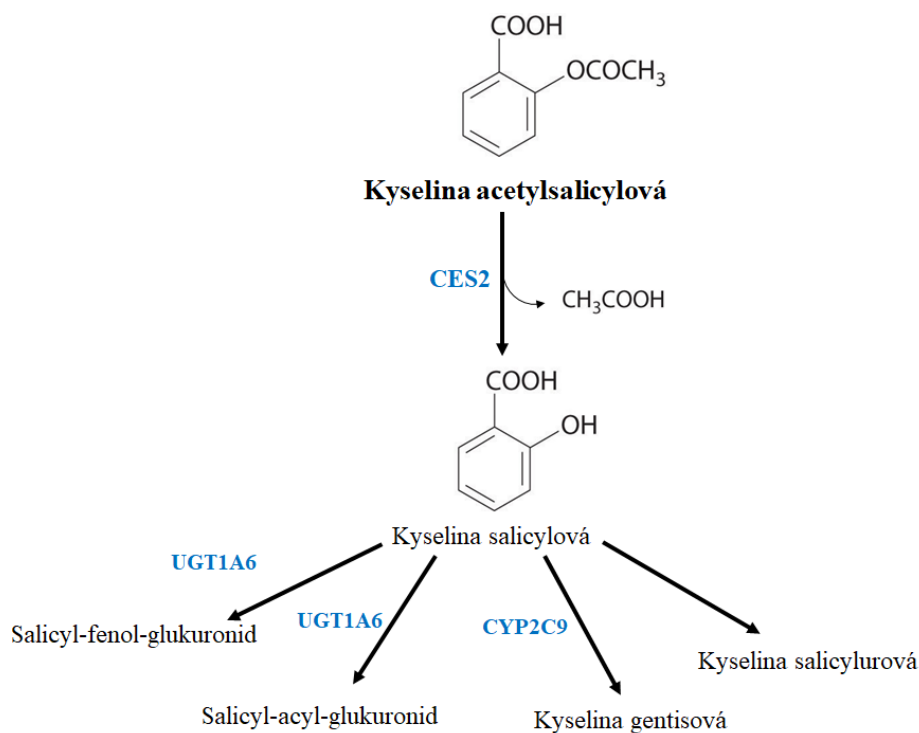


**Obrázok 33** Hlavné cesty metabolizácie acetaminofénu u ľudí (prevzaté z Mazaleuskaya LL a kol. Pharmacogenet Genomics. 25: 416-426, 2015)

## 6.5. BIOTRANSFORMÁCIA KYSELINY ACETYLSALICYLOVEJ

Kyselina acetylsalicylová (aspirín) má analgetické, protizápalové a antipyretické vlastnosti. Hlavné cesty metabolizácie kyseliny acetylsalicylovej sú zhrnuté na obrázku 34. V čreve, pečeni a v erythrocytoch je rýchlo hydrolyzovaná enzymaticky (karboxylesterázou 2) alebo neenzymaticky na kyselinu salicylovú (kyselinu 2-hydroxybenzoovú) a kyselinu octovú.

Hlavnou cestou eliminácie kyseliny salicylovej je jej konjugácia s glycínom za vzniku kyseliny salicylurovej a jej konjugátov s glukuronátom – salicyl-fenol-glukuronidu a salicyl-acyl-glukuronidu. Minoritnou cestou metabolizácie kyseliny salicylovej je jej hydroxylácia za vzniku kyseliny gentisovej (kyselina 2,5-hydroxybenzoová) a kyseliny 2,3-dihydroxybenzoovej. Malé množstvo kyseliny salicylovej je vylučované z organizmu v nezmenenej forme.



**Obrázok 34** Hlavné cesty eliminácie kyseliny acetylsalicylovej u ľudí (prevzaté z Li JP a kol. J Pharm Biomed Anal. 138: 109-117, 2017)

## 7. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Caldwell J, Gardner I, Swales N. An introduction to drug disposition: the basic principles of absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Toxicol Pathol.* 23: 102-114, 1995.
- Chhabra RS. Intestinal absorption and metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect.* 33: 61-69, 1979.
- Liska DJ. The detoxification enzyme systems. *Altern Med Rev.* 3: 187-198, 1998.
- ADME-Enabling Technologies in Drug Design and Development, First Edition. Edited by Donglu Zhang and Sekhar Surapaneni. © 2012 John Wiley & Sons, Inc. Published 2012 by John Wiley & Sons, Inc. Appendix Drug Metabolizing Enzymes and Biotransformation Reactions 545 Natalia Penner, Caroline Woodward, and Chandra Prakash, 545-565.
- Bukowska B, Mokra K, Michałowicz J. Benzo[a]pyrene-Environmental Occurrence, Human exposure, and Mechanisms of Toxicity. *Int J Mol Sci.* 23: 6348, 2022.
- Guengerich, F. P. Human cytochrome P450 enzymes in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry* (ed. Ortiz de Montellano, P.) Springer International Publishing, 2015, 523-785.
- Collins SL, Patterson AD. The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism. *Acta Pharm Sin B.* 10: 19-32, 2020.
- Caldwell J, Gardner I, Swales N. An introduction to drug disposition: the basic principles of absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Toxicol Pathol.* 23: 102-114, 1995.
- Tajiri K, Shimizu Y. Liver physiology and liver diseases in the elderly. *World J Gastroenterol.* 19: 8459-8467, 2013.
- Mini E, Nobili S. Pharmacogenetics: implementing personalized medicine. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 6: 17-24, 2009.
- Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity, Xiaodong Liu, Guoyu Pan (Eds). Springer Singapore, January 2019. ISBN 978-9-81-137646-7, 978-9-81-137647-4. 588s.
- Döring B, Petzinger E. Phase 0 and phase III transport in various organs: combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug Metab Rev.* 46: 261-282, 2014.
- Nigam SK, Bush KT, Martovetsky G, Ahn SY, Liu HC, Richard E, Bhatnagar V, Wu W. The organic anion transporter (OAT) family: a systems biology perspective. *Physiol Rev.* 95: 83-123, 2015.
- Nigam SK, Granados JC. OAT, OATP, and MRP Drug Transporters and the Remote Sensing and Signaling Theory. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 63: 637-660, 2023.
- Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol.* 165: 1260-1287, 2012.
- Wang JF, Zhang CC, Chou KC, Wei DQ. Structure of cytochrome p450s and personalized drug. *Curr Med Chem.* 16: 232-244, 2009.
- Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev.* 105: 2253-2277, 2005.
- Behrendorff JBYH. Reductive Cytochrome P450 Reactions and Their Potential Role in Bioremediation. *Front Microbiol.* 12: 649273, 2021.

Tornio A, Backman JT. Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update. *Adv Pharmacol.* 83: 3-32, 2018.

Zhao M, Ma J, Li M, Zhang Y, Jiang B, Zhao X, Huai C, Shen L, Zhang N, He L, Qin S. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *Int J Mol Sci.* 22: 12808, 2021.

Song Y, Li C, Liu G, Liu R, Chen Y, Li W, Cao Z, Zhao B, Lu C, Liu Y. Drug-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes Have Multifarious Influences on Treatment Outcomes. *Clin Pharmacokinet.* 60: 585-601, 2021.

Tanner JA, Tyndale RF. Variation in CYP2A6 Activity and Personalized Medicine. *J Pers Med.* 7: 18, 2017.

Lieber CS, DeCarli LM. Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: In vitro characteristics and adaptive properties in vivo *J Biol Chem* 245: 2505-2512, 1970.

Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med.* 2008 44: 723-738, 2008.

Harjumäki R, Pridgeon CS, Ingelman-Sundberg M. CYP2E1 in Alcoholic and Non-Alcoholic Liver Injury. Roles of ROS, Reactive Intermediates and Lipid Overload. *Int J Mol Sci.* 22: 8221, 2021.

Zhou SF. Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. *Curr Drug Metab.* 9: 310-322, 2008.

Buzková H, Pechandová K, Slanar O, Perlík F. Genetic polymorphism of cytochrome P450 and methods for its determination. *Prague Med Rep.* 107: 383-393, 2006.

Rodriguez-Antona C, Gomez A, Karlgren M, Sim SC, Ingelman-Sundberg M. Molecular genetics and epigenetics of the cytochrome P450 gene family and its relevance for cancer risk and treatment. *Hum Genet.* 127: 1-17, 2010.

Stipp MC, Acco A. Involvement of cytochrome P450 enzymes in inflammation and cancer: a review. *Cancer Chemother Pharmacol.* 87: 295-309, 2021.

Ionescu C, Caira MR. Pathways of biotransformation—phase I reactions. In: *Drug metabolism: current concepts.* Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, 41-128, 2005.

Cashman JR, Zhang J. Human flavin-containing monooxygenases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 65-100, 2006.

Cashman JR. Role of flavin-containing monooxygenase in drug development. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 4: 1507-1521, 2008.

Perez-Paramo YX, Chen G, Ashmore JH, Watson CJW, Nasrin S, Adams-Haduch J, Wang R, Gao YT, Koh WP, Yuan JM, Lazarus P. Nicotine-*N'*-Oxidation by Flavin Monooxygenase Enzymes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 28: 311-320, 2019.

Phillips IR, Shephard EA. Drug metabolism by flavin-containing monooxygenases of human and mouse. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 13: 167-181, 2017.

Phillips IR, Shephard EA. Flavin-containing monooxygenases: mutations, disease and drug response. *Trends Pharmacol Sci.* 29: 294-301, 2008.

Phillips IR, Shephard EA. Flavin-containing monooxygenases: new structures from old proteins. *Nat Struct Mol Biol.* 27: 3-4, 2020.

Nicoll CR, Bailleul G, Fiorentini F, Mascotti ML, Fraaije MW, Mattevi A. Ancestral-sequence reconstruction unveils the structural basis of function in mammalian FMOs. *Nat Struct Mol Biol.* 27: 14-24, 2020.



Krueger SK, Williams DE. Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacol Ther.* 106: 357-387, 2005.

Hodgson, E. Introduction to Biotransformation (Metabolism). *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, 865-875, 2010.

Wang CC, Billett E, Borchert A, Kuhn H, Ufer C. Monoamine oxidases in development. *Cell Mol Life Sci.* 70(4): 599-630, 2013.

Bansal N, Kanwar SS. Peroxidase(s) in environment protection. *ScientificWorldJournal.* 24: 714639, 2013.

Bilal M, Rasheed T, Iqbal HMN, Yan Y. Peroxidases-assisted removal of environmentally-related hazardous pollutants with reference to the reaction mechanisms of industrial dyes. *Sci Total Environ.* 644: 1-13, 2018.

de Oliveira FK, Santos LO, Buffon JG. Mechanism of action, sources, and application of peroxidases. *Food Res Int.* 143: 110266, 2021.

Khan AA, Rahmani AH, Aldebasi YH, Aly SM. Biochemical and pathological studies on peroxidases -an updated review. *Glob J Health Sci.* 6: 87-98, 2014.

Edenberg HJ, McClintick JN. Alcohol Dehydrogenases, Aldehyde Dehydrogenases, and Alcohol Use Disorders: A Critical Review. *Alcohol Clin Exp Res.* 42:2281-2297, 2018.

Orywal K, Szmitkowski M. Alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in malignant neoplasms. *Clin Exp Med.* 17: 131-139, 2017.

Li B, Yang K, Liang D, Jiang C, Ma Z. Discovery and development of selective aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) inhibitors. *Eur J Med Chem.* 209: 112940, 2021.

Dalvie D, Di L. Aldehyde oxidase and its role as a drug metabolizing enzyme. *Pharmacol Ther.* 201: 137-180, 2019.

Pang X, Tang C, Guo R, Chen X. Non-cytochrome P450 enzymes involved in the oxidative metabolism of xenobiotics: Focus on the regulation of gene expression and enzyme activity. *Pharmacol Ther.* 233: 108020, 2022.

Williams EM, Little RF, Mowday AM, Rich MH, Chan-Hyams JV, Copp JN, Smaill JB, Patterson AV, Ackerley DF. Nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy: insights and advances toward clinical utility. *Biochem J.* 471: 131-53, 2015.

Ryan A. Azoreductases in drug metabolism. *Br J Pharmacol.* 174: 2161-2173, 2017.

Penning TM. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chem Biol Interact.* 234: 236-246, 2015.

Penning TM, Jonnalagadda S, Trippier PC, Rižner TL. Aldo-Keto Reductases and Cancer Drug Resistance. *Pharmacol Rev.* 73: 1150-1171, 2021.

Malátková P, Maser E, Wsól V. Human carbonyl reductases. *Curr Drug Metab.* 11: 639-658, 2010.

Forrest GL, Gonzalez B. Carbonyl reductase. *Chem Biol Interact.* 129: 21-40, 2000.

Laizure SC, Herring V, Hu Z, Witbrodt K, Parker RB. The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? *Pharmacotherapy.* 33: 210-222, 2013.

Di L. The Impact of Carboxylesterases in Drug Metabolism and Pharmacokinetics. *Curr Drug Metab.* 20: 91-102, 2019.

Edin ML, Zeldin DC. Regulation of cardiovascular biology by microsomal epoxide hydrolase. *Toxicol Res.* 37: 285-292, 2021.

Morisseau C, Hammock BD. Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 53: 37-58, 2013.

Decker M, Arand M, Cronin A. Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling. *Arch Toxicol.* 83: 297-318, 2009.

Omiecinski CJ, Hassett C, Hosagrahara V. Epoxide hydrolase-polymorphism and role in toxicology. *Toxicol Lett.* 112-113: 365-370, 2000.

Meech R, Hu DG, McKinnon RA, Mubarakah SN, Haines AZ, Nair PC, Rowland A, Mackenzie PI. The UDP-Glycosyltransferase (UGT) Superfamily: New Members, New Functions, and Novel Paradigms. *Physiol Rev.* 99: 1153-1222, 2019.

Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI. The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. *Int J Biochem Cell Biol.* 45: 1121-1132, 2013.

Kasteel EEJ, Darney K, Kramer NI, Dorne JLCM, Lautz LS. Human variability in isoform-specific UDP-glucuronosyltransferases: markers of acute and chronic exposure, polymorphisms and uncertainty factors. *Arch Toxicol.* 94: 2637-2661, 2020.

Oda S, Fukami T, Yokoi T, Nakajima M. A comprehensive review of UDP-glucuronosyltransferase and esterases for drug development. *Drug Metab Pharmacokinet.* 30: 30-51, 2015.

Mackenzie PI, Gregory PA, Lewinsky RH, Yasmin SN, Height T, McKinnon RA, Gardner-Stephen DA. Polymorphic variations in the expression of the chemical detoxifying UDP glucuronosyltransferases. *Toxicol Appl Pharmacol.* 207(2 Suppl): 77-83, 2005.

Stachulski AV, Meng X. Glucuronides from metabolites to medicines: a survey of the in vivo generation, chemical synthesis and properties of glucuronides. *Nat Prod Rep.* 30: 806-848, 2013.

Liu Y, Coughtrie MWH. Revisiting the Latency of Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferases (UGTs)-How Does the Endoplasmic Reticulum Membrane Influence Their Function? *Pharmaceutics.* 9: 32, 2017.

Kiang TK, Ensom MH, Chang TK. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther.* 106: 97-132, 2005.

Jarrar Y, Lee SJ. The Functionality of UDP-Glucuronosyltransferase Genetic Variants and their Association with Drug Responses and Human Diseases. *J Pers Med.* 11: 554, 2021.

Vaish S, Gupta D, Mehrotra R, Mehrotra S, Basantani MK. Glutathione S-transferase: a versatile protein family. *3 Biotech.* 10: 321, 2020.

Mohana K, Achary A. Human cytosolic glutathione-S-transferases: quantitative analysis of expression, comparative analysis of structures and inhibition strategies of isozymes involved in drug resistance. *Drug Metab Rev.* 49: 318-337, 2017.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione S-transferases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 45: 51-88, 2005.

Sawicki R, Singh SP, Mondal AK, Benes H, Zimniak P. Cloning, expression and biochemical characterization of one Epsilon-class (GST-3) and ten Delta-class (GST-1) glutathione S-transferases from *Drosophila melanogaster*, and identification of additional nine members of the Epsilon class. *Biochem J.* 370(Pt 2): 661-669, 2003

Board PG, Anders MW. Human glutathione transferase zeta. *Methods Enzymol.* 401: 61-77, 2005.

Rossjohn J, McKinsty WJ, Oakley AJ, Verger D, Flanagan J, Chelvanayagam G, Tan KL, Board PG, Parker MW. Human theta class glutathione transferase: the crystal structure reveals a sulfate-binding pocket within a buried active site. *Structure*. 6: 309-322, 1998.

Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermiin LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrnyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem*. 275: 24798-247806, 2000.

Jakobsson PJ, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hutchinson A, Persson B. Common structural features of MAPEG - a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci*. 8: 689-692, 1999.

Singh RR, Reindl KM. Glutathione S-Transferases in Cancer. *Antioxidants (Basel)*. 10: 701, 2021.

Mohana K, Achary A. Human cytosolic glutathione-S-transferases: quantitative analysis of expression, comparative analysis of structures and inhibition strategies of isozymes involved in drug resistance. *Drug Metab Rev*. 49: 318-337, 2017.

Kurogi K, Rasool MI, Alherz FA, El Daibani AA, Bairam AF, Abunnaja MS, Yasuda S, Wilson LJ, Hui Y, Liu MC. SULT genetic polymorphisms: physiological, pharmacological and clinical implications. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 17: 767-784, 2021.

Hempel N, Gamage N, Martin JL, McManus ME. Human cytosolic sulfotransferase SULT1A1. *Int J Biochem Cell Biol*. 39: 685-689, 2007.

Blanchard RL, Freimuth RR, Buck J, Weinshilboum RM, Coughtrie MW. A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily. *Pharmacogenetics*. 14: 199-211, 2004.

Suiko M, Kurogi K, Hashiguchi T, Sakakibara Y, Liu MC. Updated perspectives on the cytosolic sulfotransferases (SULTs) and SULT-mediated sulfation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 81: 63-72, 2017.

Nowell S, Falany CN. Pharmacogenetics of human cytosolic sulfotransferases. *Oncogene*. 25: 1673-1678, 2006.

Wang LQ, James MO. Inhibition of sulfotransferases by xenobiotics. *Curr Drug Metab*. 2006

Gamage NU, Duggleby RG, Barnett AC, Tresillian M, Latham CF, Liyou NE, McManus ME, Martin JL. Structure of a human carcinogen-converting enzyme, SULT1A1. Structural and kinetic implications of substrate inhibition. *J Biol Chem*. 278: 7655-7662, 2003.

Glatt H, Boeing H, Engelke CE, Ma L, Kuhlmann A, Pabel U, Pomplun D, Teubner W, Meinel W. Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects. *Mutat Res*. 482: 27-40, 2001.

Zhou X, Ma Z, Dong D, Wu B. Arylamine N-acetyltransferases: a structural perspective. *Br J Pharmacol*. 169: 748-760, 2013.

Grant DM. Structures of human arylamine N-acetyltransferases. *Curr Drug Metab*. 9: 465-470, 2008.

Sim E, Walters K, Boukouvala S. Arylamine N-acetyltransferases: from structure to function. *Drug Metab Rev*. 40: 479-510, 2008.

Sim E, Abuhammad A, Ryan A. Arylamine N-acetyltransferases: from drug metabolism and pharmacogenetics to drug discovery. *Br J Pharmacol*. 171: 2705-2725, 2014.

Hein DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res.* 506-507: 65-77, 2002.

Mitchell SC. N-acetyltransferase: the practical consequences of polymorphic activity in man. *Xenobiotica.* 50: 77-91, 2020.

Walker K, Ginsberg G, Hattis D, Johns DO, Guyton KZ, Sonawane B. Genetic polymorphism in N-Acetyltransferase (NAT): Population distribution of NAT1 and NAT2 activity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 12: 440-472, 2009.

Walraven JM, Zang Y, Trent JO, Hein DW. Structure/function evaluations of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2. *Curr Drug Metab.* 9: 471-486, 2008.

Jančová, P., Šiller, M., 'Phase II Drug Metabolism', in J. Paxton (ed.), *Topics on Drug Metabolism*, IntechOpen, London. 22 Feb. 2012 Crossref, doi:10.5772/29996.

Knights KM, Sykes MJ, Miners JO. Amino acid conjugation: contribution to the metabolism and toxicity of xenobiotic carboxylic acids. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 3: 159-168, 2007.

Badenhorst CP, van der Sluis R, Erasmus E, van Dijk AA. Glycine conjugation: importance in metabolism, the role of glycine N-acyltransferase, and factors that influence interindividual variation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 9: 1139-1153, 2013.

Döring B, Petzinger E. Phase 0 and phase III transport in various organs: combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug Metab Rev.* 46: 261-282, 2014.

Mollazadeh S, Sahebkar A, Hadizadeh F, Behravan J, Arabzadeh S. Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors. *Life Sci.* 214: 118-123, 2018.

Liu X, Pan G, editors. *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity*. Singapore: Springer Singapore; 2019, s. 580.

Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene.* 22: 7537-7552, 2003.

Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *AAPS J.* 17: 65-82, 2005.

Claxton DP, Jagessar KL, Mchaourab HS. Principles of Alternating Access in Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) Transporters. *J Mol Biol.* 433: 166959, 2021.

Damme K, Nies AT, Schaeffeler E, Schwab M. Mammalian MATE (SLC47A) transport proteins: impact on efflux of endogenous substrates and xenobiotics. *Drug Metab Rev.* 43: 499-523, 2011.