

## Metabolizam ksenobiotika



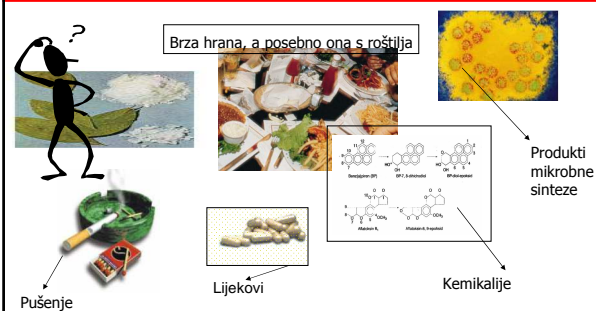
Prof.dr.sc. Ljubica Glavaš-Otrovac

## Značaj u biomedicini

- Poznavanje metabolizma ksenobiotika je izuzetno važno u razumijevanju
  - farmakologije
  - toksikologije
  - istraživanja raka
  - uvođenja lijekova u kliničku praksu

## Osnovna podjela ksenobiotika od medicinskog značaja

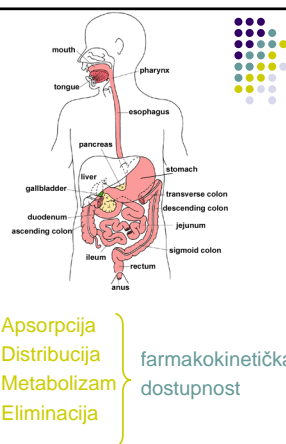
- lijekovi
- kemijski karcinogeni
- različiti toksikanti (pesticidi)



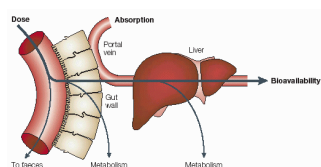
- Postoji više od 200.000 kemikalija u okolišu proizvedenih od strane čovjeka.

- Mnoge od tih supstancija se metaboliziraju (kemijski mijenjaju) u tijelu čovjeka, gdje je jetra glavni organ uključen njihov metabolizam.

- Neki od ksenobiotika izlučuju se nepromijenjeni.



## Ulazak ksenobiotika u organizam preko gastrointestinalnog trakta



U jetri se događaju brojne metaboličke transformacije.

Metabolizam preobražaja ksenobiotika se može podijeliti u 2 faze:

- Faza 1.:** Reakcije oksidacije su jedne od najvažnijih reakcija pri transformaciji ili preobražaju ksenobiotika. Provede ih: CITOKROM P-450 VRSTE (MONOOKSIGENAZE)

Ti enzimi također mogu katalizirati reakcije deaminacije, dehalogenacije, desulfuriranja, epoksidacije, peroksigenacije i reakcije redukcije.

## Faza 2.:

nakon faze 1 - hidroksilirane ili na neki drugi način promijenjene supstancije prevode pomoću specifičnih enzima u različite polarne metabolite reakcijama:

1. konjugacije s glukuronskom kiselinom, sulfatima, acetatima, glutationom ili s nekim aminokiselinama
2. metilacijom

- Glavna svrha provođenja faze 2. u metabolizmu ksenobiotika je:
  - povećanje njihove polarosti (topivosti u vodi), a time je olakšano i izlučivanje iz organizma.
- Hidrofobni ksenobiotici koji se ne mogu prevesti u polaran oblik zadržavaju se u adipoznom tkivu.

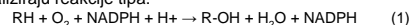
## Citokromi P450

Nad-obitelj enzima citokroma P450 ima ključnu ulogu u metabolizmu ksenobiotika.

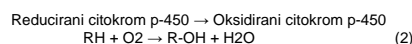
Gotovo se svi ksenobiotici transformiraju u organizmu pomoću tih enzima.

Enzimi CYP P450 su izuzetno strukturno polimorfni (razlike su nađene u kodirajućoj regiji).

Citokrom p-450 su velika obitelj koja imaju u svom sastavu hem, i kataliziraju reakcije tipa:

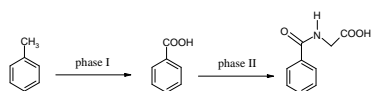


RH – različiti lijekovi, karcinogeni, zagađivači ili neke endogene supstancije kao što su steroidi i brojni drugi lipidi



## Metabolizam ksenobiotika uz CYP (citokrom P450)

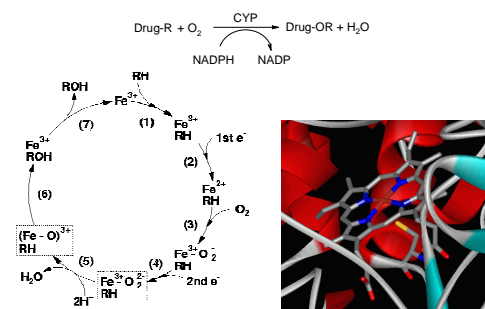
Tijekom prvog prolaska kroz jetru događaju se ekstenzivne kemijske transformacije lipoofilnih ili teških (MW >500) spojeva. Oni postaju značajno hidrofilniji i prema tome lakše se mogu izlučiti.



CYP enzimi sudjeluju u reakcijama monoksigenacije

## Metabolizam uz CYP

### Monoksigenacija supstrata



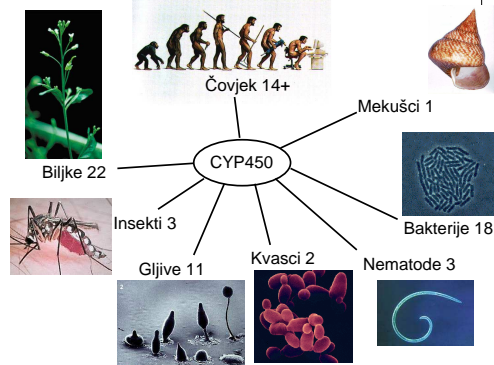
## Metabolizam pomoću CYP

Citokromi - monooksigenaze uključeni su u biosintezu steroida i masnih kiselina

Do danas je otkriveno 17 obitelji CYP i opisano oko 50 izooblika

klasifikacija: CYP 3 A 4 \* 15 A-B  
 obitelj >40% o sekvenci  
 ovisne homologije  
 izoenzim  
 podobitelj >55% o sekvenci  
 ovisne homologije  
 alel

## Obitelj gena citokroma P450



## Obitelj humanih CYP

**CYP 1-5, 7, 8, 11, 17, 19, 21, 24, 26, 27, 39, 46, 51**

### Funkcija:

metabolizam ksenobiotika: CYP 1, 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 3

metabolizam steroida: CYP 2G1, 7, 8B1, 11, 17, 19, 21, 27A1, 46, 51

metabolizam masnih kiselina - CYP 2J2, 4, 5, 8A1

vCYP 24 (vitamin D), 26 (retinoična kiselina), 27B1 (vitamin D), ...

13

## CYP

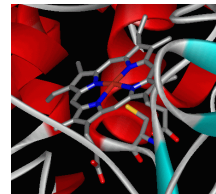
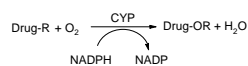
Izoenzim flavin-monooksigenaze

Alkohol dehidrogenaza

Aldehid oksidaza

Monoamin dehidrogenaza (MAO)

Oksidoredukcijski  
potencijal posredovan je  
porfirinskim željezom u  
aktivnom mjestu



14

## CYP

- terciarna struktura ima je visoko konzervirana unatoč razlikama u sekvenci

Superpozicija  
hCYP 2C9 (1OG5.pdb) i  
CYP 450 BM3 (2BMH.pdb)  
*Bacillus megaterium*



Za razliku od bakterijskih CYP, mikrosomalni CYP-ovi sisavaca imaju i dodatnu transmembransku uzvojnica koja služi kao sidro u membrani

15

## CYP

Strukture nekoliko Cyp sisavaca danas su detaljno određene i mogu se naći na:

Brookhaven Database:

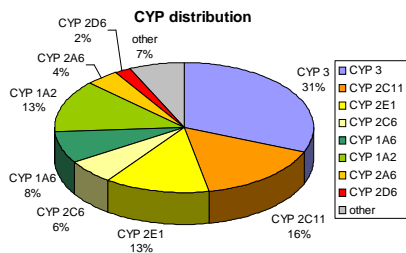
<http://www.pdb.mdc-berlin.de/pdb/>

1DT6.pdb	CYP 2C5	rabbit	Sep 2000
1OG5.pdb	CYP 2C9	human	Jul 2003
1PO5.pdb	CYP 2B4	rabbit	Oct 2003
1PQ2.pdb	CYP 2C8	human	Jan 2004

16

## CYP

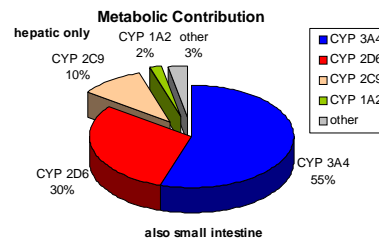
- ❖ Glavnina se nalazi u jetri, no neki se nalaze i na stijenci tankog crijeva.
- ❖ CYP sisavaca vezani su za membranu endoplazmatskog retikuluma



17

## CYP

CYP 3A4, CYP 2D6 i CYP 2C9 sudjeluju u metabolizmu ksenobiotika.



18

### Specifičnost za supstrat

CYP 1A2	verapamil, imipramine, amitriptyline, caffeine (arylamine <i>N</i> -oxidation)
CYP 2A6	nicotine
CYP 2B6	cyclophosphamid
CYP 2C9	diclofenac, naproxen, piroxicam, warfarin
CYP 2C19	diazepam, omeprazole, propranolol
CYP 2D6	amitriptyline, captopril, codeine, mianserin, chlorpromazine
CYP 2E1	dapsone, ethanol, halothane, paracetamol
CYP 3A4	alprazolam, cisapride, terfenadine, ...

<http://medicine.iupui.edu/flockhart/>

19

### Polimorfizmi u genima za CYP

„Svaki čovjek se razlikuje od drugog čovjeka više ili manje“

Fenotipovi mogu biti različiti na osnovi aktivnosti ili sadržaja eksprimiranih CYP.

Genotip je određen sekvencom DNA.

Čovjek ima 2 seta kromosoma - što znači da isti genotip može dati različita fenotipska obilježja

U ovisnosti o metaboličkoj aktivnosti, razlikujemo 3 glavna tipa metabolizatora:

■ **intenzivni metabolizant** (normalan)

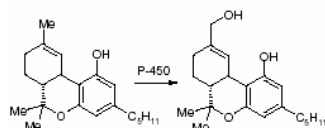
■ **slab metabolizant**

■ **ultra-brz metabolizant** (povećan metabolizam ksenobiotika)

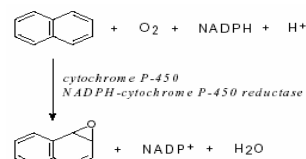
Lit: K. Nagata et al. *Drug Metabol. Pharmacokin* 3 (2002) 167

20

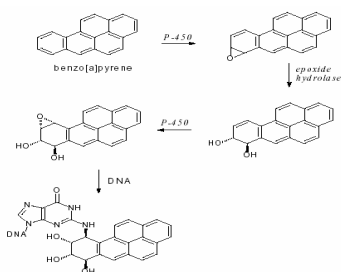
Kao primjer, citokrom P-450 posreduje pri oksidaciji  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol-a i to na poziciji alila:



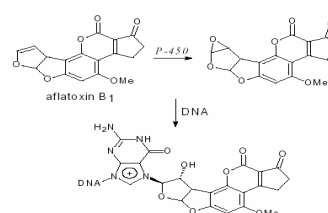
Metabolizam tetrahydrokanabinola



Metabolizam naftalena



Mehanizam karcinogeneze benzopirena



Mehanizam karcinogeneze aflatoksina

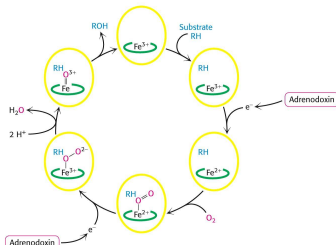
### Hidroksilacija kolesterola citokrom P<sub>450</sub> monooksigenaza

Reakcije hidroksilacije vrlo su značajne u sintezi kolesterola iz skvalena i pretvaranju kolesterola u žučne soli i steroidne hormone

Kisik se za potrebe reakcije hidroksilacije aktivira pomoću **citokrom P450 oksigenaza**. Ti na membranu vezani proteini sadrže hem kao prostetičku skupinu

Kao reduens u reakcije ulazi NADPH, koji prenosi elektron na flavoprotein koji ga zatim prenosi na adrenodoksin, protein koji sadrži nehemsko željezo.

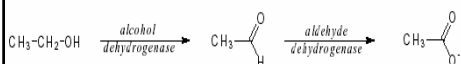
Adrenodoksin prenosi elektron i reducira Fe<sup>3+</sup> u Fe<sup>2+</sup> u hemu. Bez tog elektrona P450 ne veže kisik.



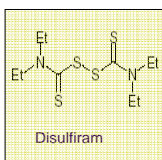
### Mitohondrijski p-450 sustav

- se razlikuje od mikrosomalnog po tome što koristi NADPH-vezan flavoprotein – pa se nazivaju flavinske monooksigenaze (FMO).
- slično citokromu P-450 imaju mješovitu ulogu oksidaza i zatijevaju kisik i NADPH kao kosupstrate.
- Ovi enzimi primarno kataliziraju oksidaciju nukleofilnih skupina kao što su amini i tioli.

### Metabolizam etilnog alkohola



Oba enzima traže NADP+ ili NAD+ kao kosupstrate.



Enzim aldehid dehidrogenaza se inhibira fungicidom disulfiramom, koji se u klinici koristi u terapiji alkoholizma.

Pacijent se sprječava u konzumiranju alkohola na razini acetaldehida, koji se vrlo brzo akumulira i izaziva glavobolju i mučninu i povraćanje.

### Faza 2.

#### REAKCIJE KONJUGACIJE U SVRHU PREOBRAZBE KSENOBIOTIKA U OBLIK PODESAN ZA IZLUČIVANJE

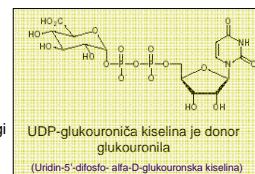
Postoji 5 tipova reakcija faze 2. metabolizma ksenobiotika:

#### 1. Glukouronidacija:

Reakciju kataliziraju **glukouronil transferaze**, prisutne u ER i citosolu.

Molekule poput 2-acetilaminofluoren, anilin, benzoična kiselina, meprobromat, fenol i mnogi steroidi se izlučuju kao glukouronidi.

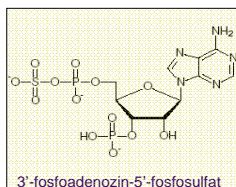
Glukouronidi se mogu vezati na kisik, dušik ili sumporom bogate skupine što čini glukouronidaciju jednom od najčešćih reakcija konjugacije.



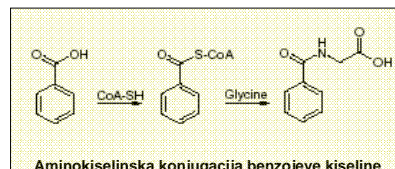
#### 2. Sulfoniranje:

Neki alkoholi, akrilamini i fenoli se sulfuriraju uz enzim **sulfotransferazu** i kosupstrat 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat (PAPS), koji donosi sulfatnu skupinu

Donor sulfata u drugim reakcijama (primjer: sulfuriranje steroida, glukozaminoglikana, glukopipida i glukoproteina) je adenzin 3'-fosfat-5'-fosfosulfat (aktivni sulfat)



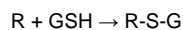
#### 3. Konjugacija karboksilnih kiselina s aminokiselinama (najčešće glicinom) preko njihovih tiolesterata.



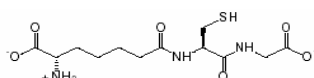
Reakciju katalizira **aminoacid N-aciltransferazu**

#### 4. Konjugacija s glutationom

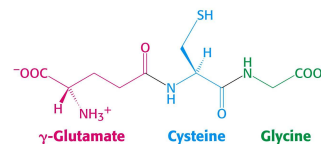
Glutation je tripeptid (gama-glutamilcisteinilglicin). Brojni potencijalno toksični elektrofilni ksenobiotici su konjugirani na nukleofilni GSH reakcijom:



R – elektrofilni ksenobiotik



Glutation,  $\gamma$ -glutamil peptid, služi kao sulfhidrilni pufer i antioksidant

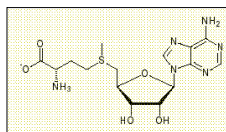


Glutation je tripeptid koji ima izuzetno važnu ulogu u stanicj jer štiti crvene krvne stanice od oksidativnog oštećenja tako da služi kao sulfhidrilni pufer.

#### 5. Metilacija

Manje je značajna u procesu transformacije ksenobiotika

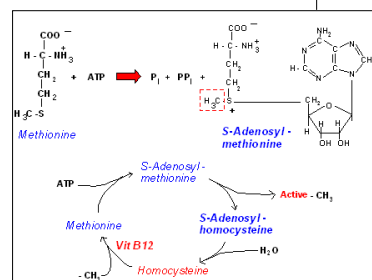
Tioli, fenoli i amini se mogu metabolizirati uz S-adenozil-metionin



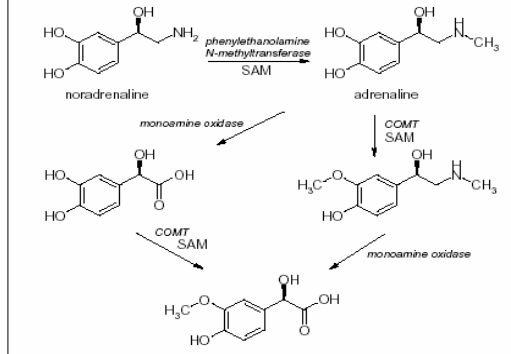
S-adenozilmetionin je aktivirani oblik metilne skupine

U reakcijama biosinteze: „fosfatidilkolina

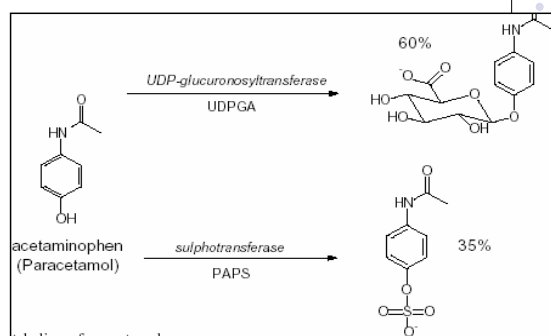
- adrenalina
- kreatina
- cisteina
- acetilkolina



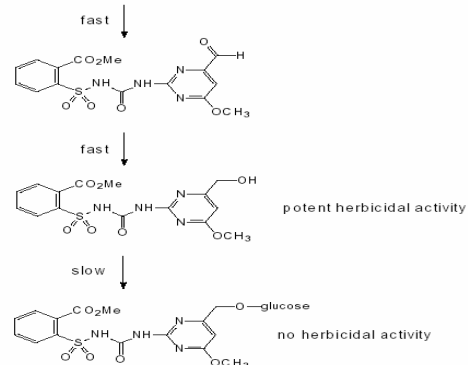
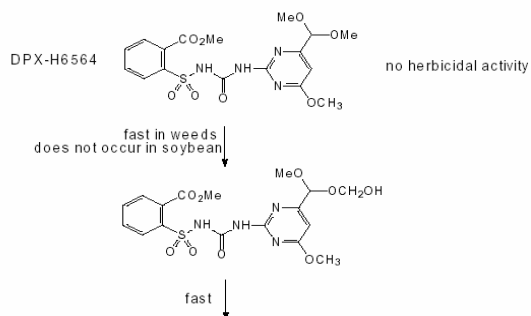
#### Metabolizam adrenalina



#### Metabolizam paracetamola



### Metabolizam DPX-H6564



### AKTIVNOST ENZIMA KOJI SUDJELUJU U METABOLIZMU KSENOBIOTIKA

- postoje značajne razlike u aktivnostima enzima između vrsta
- postoje značajne razlike u aktivnosti enzima među pojedincima, od koje su mnoge zbog genetičkih faktora
- aktivnost nekih od tih enzima je različita i povezana sa spolom i starošću
- unos različitih ksenobiotika, kao što su fenobarbital, poloklorirani bifenili ili neki ugljikovodici, mogu prouzročiti indukciju enzima
- metaboliti nekih ksenobiotika mogu inhibirati aktivnosti ksenobiotik-metabolizirajućih enzima.