

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

ИНТЕГРИСАНЕ АКАДМЕСКЕ СТУДИЈЕ ФАРМАЦИЈЕ

Б13 - Медицинска хемија 1

Биотрансформација молекула лекова

Проф. др Слободан Новокмет

Осма недеља наставе

Зимски семестар 2016/2017. године

Реакције друге фазе метаболизма

- Реакције друге фазе метаболизма, коњугације, подразумевају везивање група или молекула за лек или метаболит.
- Реакције коњугације се обично одвијају као последњи корак метаболизма пре елиминације, мада се могу одвијати у било ком тренутку у току метболизма лека.
- Производи настали коњугацијом, коњугати, су растворни у води, елиминишу се путем урина и/или жучи и најчешће су фармаколошки неактивни, мада постоје и изузеци.
- Ензими који учествују у процесу коњугације везују за метаболит или молекул лека мале ендogene молекуле (глукуронска киселина, глицин, глутамин) који су поларни и јонизују.

Реакције друге фазе метаболизма

- Остале реакције друге фазе метаболизма, метиловање и ацетиловање, не повећавају растворљивост молекула у води, али утичу на фармаколошку активност лека.
- Улога глутатиона у другој фази метаболизма је да се веже за хемијски реактивне молекуле и спречи њихову интеракцију са значајним биомакромолекулима као што су ДНК, РНК и протеини.
- Реакције друге фазе представљају **реакције детоксикације** у метаболизму лекова

Реакције друге фазе метаболизма

- Карактеристично за највећи број коњугација је да се глукуронска киселина, сулфатна група, метил- и ацетил-група почетно активирају у облику коензима пре трансфера или везивања за акцепторску групу супстрата, уз посредовање одговарајућег ензима - **трансферазе**. У случају коњугације са глицином и глутамином почетно се активира сам супстрат.
- Многи ендогени молекули као што су билирубин, стероиди, катехоламини, хистамин такође подлежу реакцијама коњугације и користе исте коензиме, с тим што су ове реакције посредоване много специфичнијим трансферазама.

Реакције друге фазе метаболизма

- У реакције коњугације се убрајају:
 - ацетиловање,
 - метиловање,
 - грађење коњугата са:
 - глукуронском киселином,
 - глицином,
 - глутамином,
 - глутатионом (меркаптопуринском киселином) и
 - сулфатима.
- Поред ових реакција у реакције друге фазе метаболизма се убрајају и реакције коњугације са гликозидима, фосфатима, другим аминокиселинама, као и конверзија цијанида до тиоцијаната, међутим ове реакције су од мањег значаја у метаболизму лекова.

1. Реакције коњугације са глукуронском киселином

- Глукуронидација је најчешћа реакција коњугације у метаболизму лекова из неколико разлога:
 - (1) D-глукуронска киселина *in vivo* настаје из D-глюкозе, има је у довољним количинама у организму,
 - (2) велики број функционалних група интерагује са глукуронском киселином уз посредовање ензима,
 - (3) глукуронил група (са јонизованом карбоксилном групом $pK_a = 3,2$ и поларном хидроксилном групом) везана за молекул лека или метаболит значајно повећава растворљивост коњугата у води.

1. Реакције коњугације са глукуронском киселином

- β -глукурониди настају преко две корака:
 1. синтезом коензим донора уридин-5`-дифосфо- α -D-глукуронска киселина (UDPGA);
 2. трансфером глукуронске киселине са коензима на супстрат.
- Трансфер глукуронске киселине је катализован ензимом UDP-глукуронилтрансфераза. Глукуронски коњугати имају β -конфигурацију или β -везу у позицији C-1.
- У зависности од хетероатома који се налази у позицији C-1 глукуронске киселине и учествује у грађењу везе, настали коњугати се класификују као O-, N-, S-,C- глукурониди.

1. Реакције коњугације са глукуронском киселином

- **O- глукурониди:**

- хидроксилна група: феноли, алкохоли, еноли, N-хидрокиламини и N-хидрокиламиди;
- карбоксилна група: арил-киселине, арилалкил-киселине.

- **N- глукурониди:**

- ариламино, алкиламино, амидо, сулфонамидо групе, терцијарна амино група.

- **S- глукурониди:**

- сулфхидрилна група

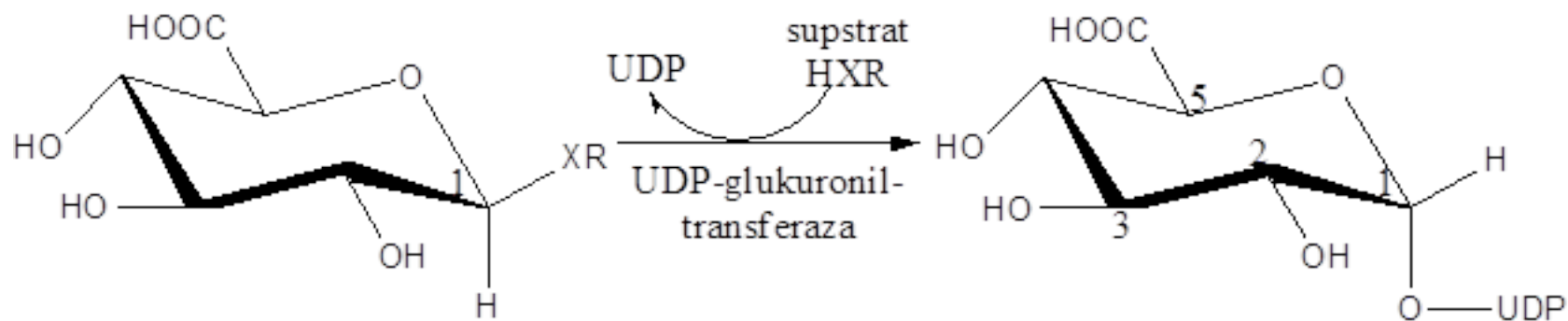
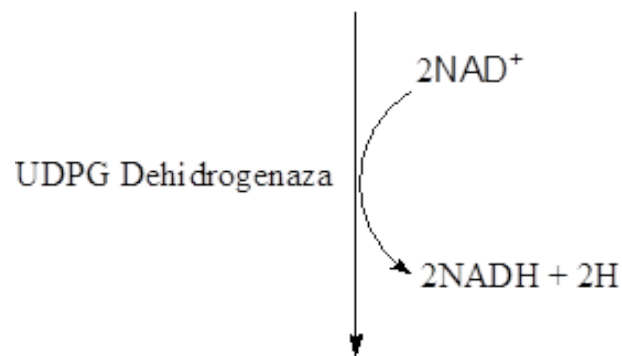
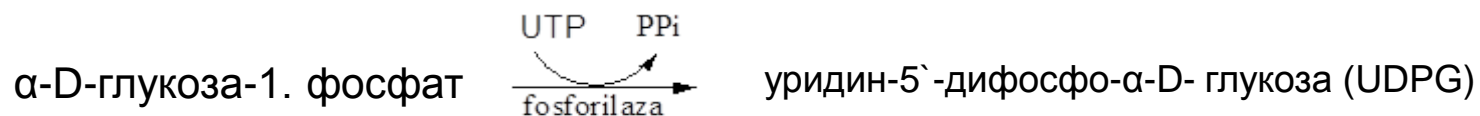
- **C- глукурониди:**

- 3,5-пирозолидиндион

1. Реакције коњугације са глукуронском киселином

- **О-глукурониди** настају коњуговањем преко хидроксилне и карбоксилне групе. Феноли и алкохоли најчешће подлежу процесу глукуронидације у метаболизму лекова. Ређе се јавља глукуронидација хидроксилних група енола, N-хидроксиламина и N-хидроксиламида.
- **N-глукуронидацији** подлежу ароматични и алифатични амини, амиди и сулфонамиди. Глукуронидација ароматичних и алифатичних амина је мање заступљена у метаболизму лекова од N-ацетиловања или оксидативних процеса (нпр.: оксидативне деаминација). Терцијарни амини у процесу глукуронидације дају кватернерне амонијум-глукуронид метаболите.

Реакција грађења глукуронида - коњугација са глукуронском киселином



β -глукуронид
(β -веза на C-1)

уридин-5`-дифосфо- α -D-глукуронска
киселина (UDPGA) (α -веза на C-1)

2. Реакције коњугације са сулфатном групом

- Коњугација са сулфатном групом се углавном одвија са фенолима, док у мањој мери са алкохолима, ароматичним аминима и N-хидрокси једињењима. За разлику од глукуронске киселине која лако настаје, извори сулфата су ограничени.
- Организам у највећој мери сулфате користи за коњугацију ендогених молекула као што су: стероиди, хепарин, катехоламини, тироксин.
- Коњугација са сулфатном групом одвија се активацијом неорганског сулфата до коензима 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосулфат (PAPS).
- Трансфер сулфатне групе из PAPS на супстрат је катализована различитим сулфотрансферазама. Као резултат коњугације са сулфатима настају углавном неактивни метаболити растворни у води.

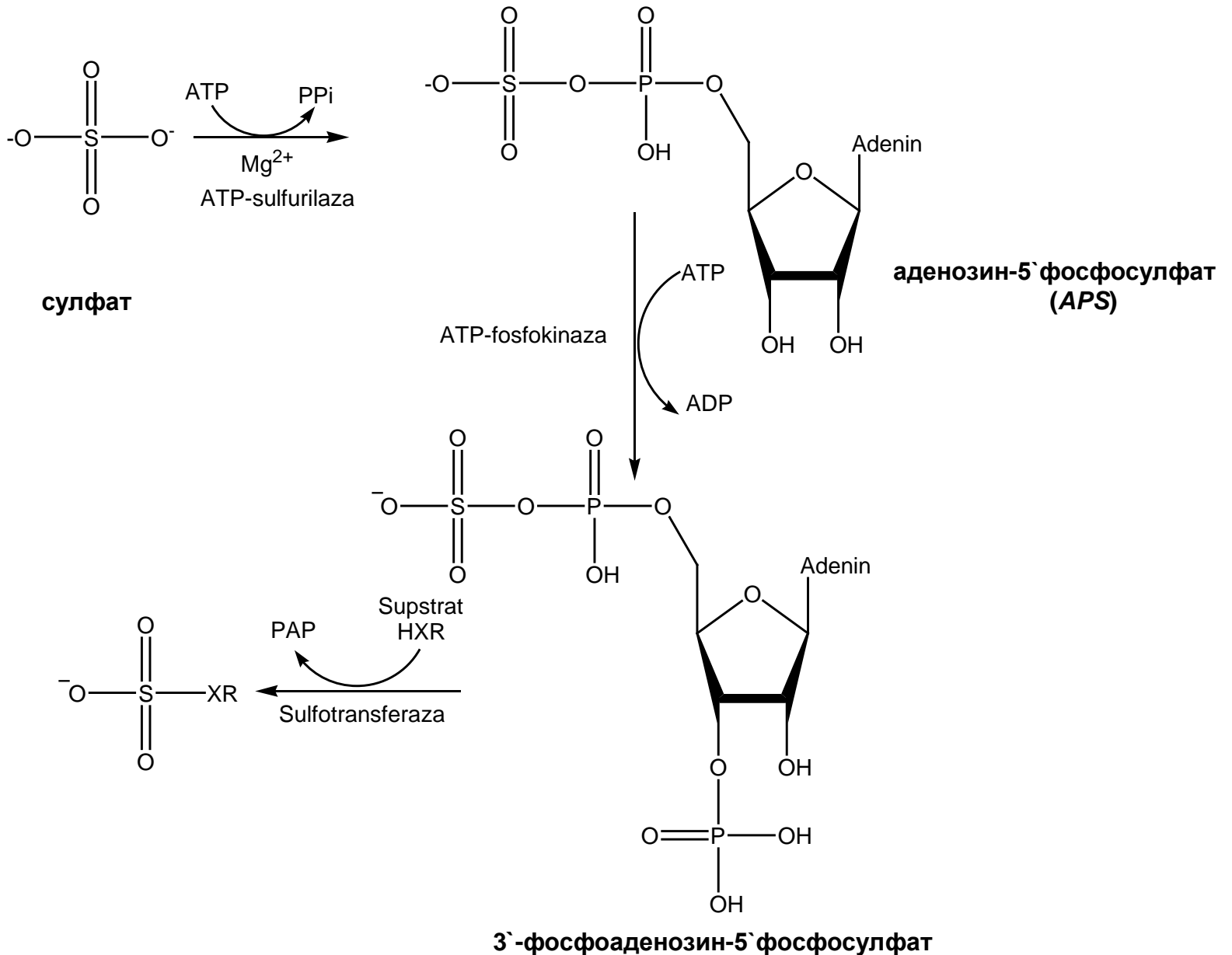
2. Реакције коњугације са сулфатном групом

- О-сулфат коњугати настали од неких N-хидрокси једињења су хемијски активни интермедијери и токсични.
- Феноли су главна група супстрата за сулфатну коњугацију, тако да су молекули лекова који садрже фенолну групу подложни овој коњугацији.
- Међутим за већину фенола сулфокоњугација представља ређи метаболички пут, јер је глукуронидација компетитивни процес који може да преодоминира.
- Код деце старости 3-9 година О-сулфат коњугат је главни метаболит у урину. Овај феномен настаје јер деца имају смањен капацитет за глукуронидацију због смањеног нивоа глукуронил-трансферазе.

2. Реакције коњугације са сулфатном групом

- Алкохоли (нпр. алифатични алкохоли C1-C5, диетилен-гликол) и ароматични амини (нпр. анилин, 2-нафтиламин) подлежу сулфокоњугацији.
- Међутим, ове реакције имају мали значај у метаболизму лекова.
- Сулфокоњугација N-хидоксиламина и N- хидроксиламида се ређе одвија. Сулфокоњугацијом N-хидрокси једињења настају токсични коњугати, O-сулфатни-естри од којих настају цитотоксични реактивни интермедијери

Грађење коњугата са сулфатима



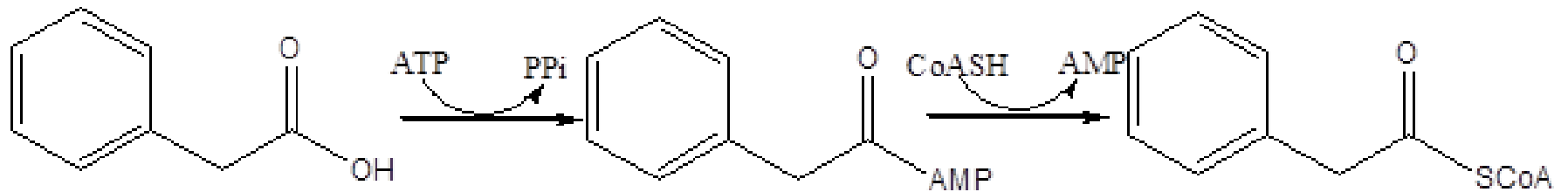
3. Реакције коњугације са глицином, глутамином и другим аминокиселинама

- Аминокиселине глицин и глутамин се коњугују са карбоксилним киселинама, нарочито ароматичним и арил-алкил киселинама.
- Коњугација молекула лекова са аминокиселинама се одвија у мањем обиму због ограничене количине доступних аминокиселина и због компетитивне глукуронидације.
- За разлику од глукуронске киселине и сулфата, глицин и глутамин се не преводе у активне коензими, већ се супстрат активира са *АТР*-ом и коензимом *А* (*CoA*) при чему настаје ацил-*CoA* комплекс.
- Ацил-*CoA* комплекс даље ацилује глицин или глутамин под дејством специфичних ензима глицин- или глутамин-N-ацилтрансферазе.

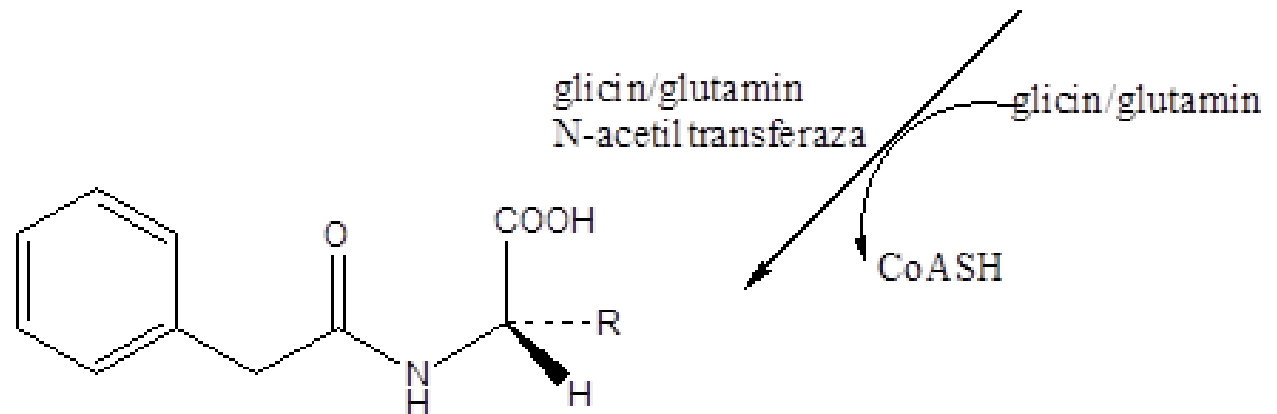
3. Реакције коњугације са глицином, глутамином и другим аминокиселинама

- Коњугати лекова са аминокиселинама су поларни и растворни у води, најчешће се елиминишу путем урина али понекад могу и путем жучи.
- Ароматичне и арил-алкил киселине су главни супстрати који подлежу коњугацији са глицином. Метаболити у облику карбоксилних киселина настали оксидацијом или хидролизом већине молекула лекова такође подлежу коњугацији са глицином.
- Коњугацији са глутамином углавном подлежу арил-сирћетне киселине, укључујући и ендогену фенил-сирћетну и 3-индол-сирћетну киселину. Међутим, познат је мали број лекова који су коњуговани са глутамином.
- Коњугација карбоксилне групе са другим аминокиселинама се врло ретко одвија и строго зависи од супстрата и врсте живог система (птице, сисари, итд.).

Грађење коњугата са аминокиселинама



Фенилсирћетна киселина



Глицин коњугат R = H

Глутамин коњугат R = $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$

Пример грађења коњугата фенилсирћетне киселине са глицином или глутамином

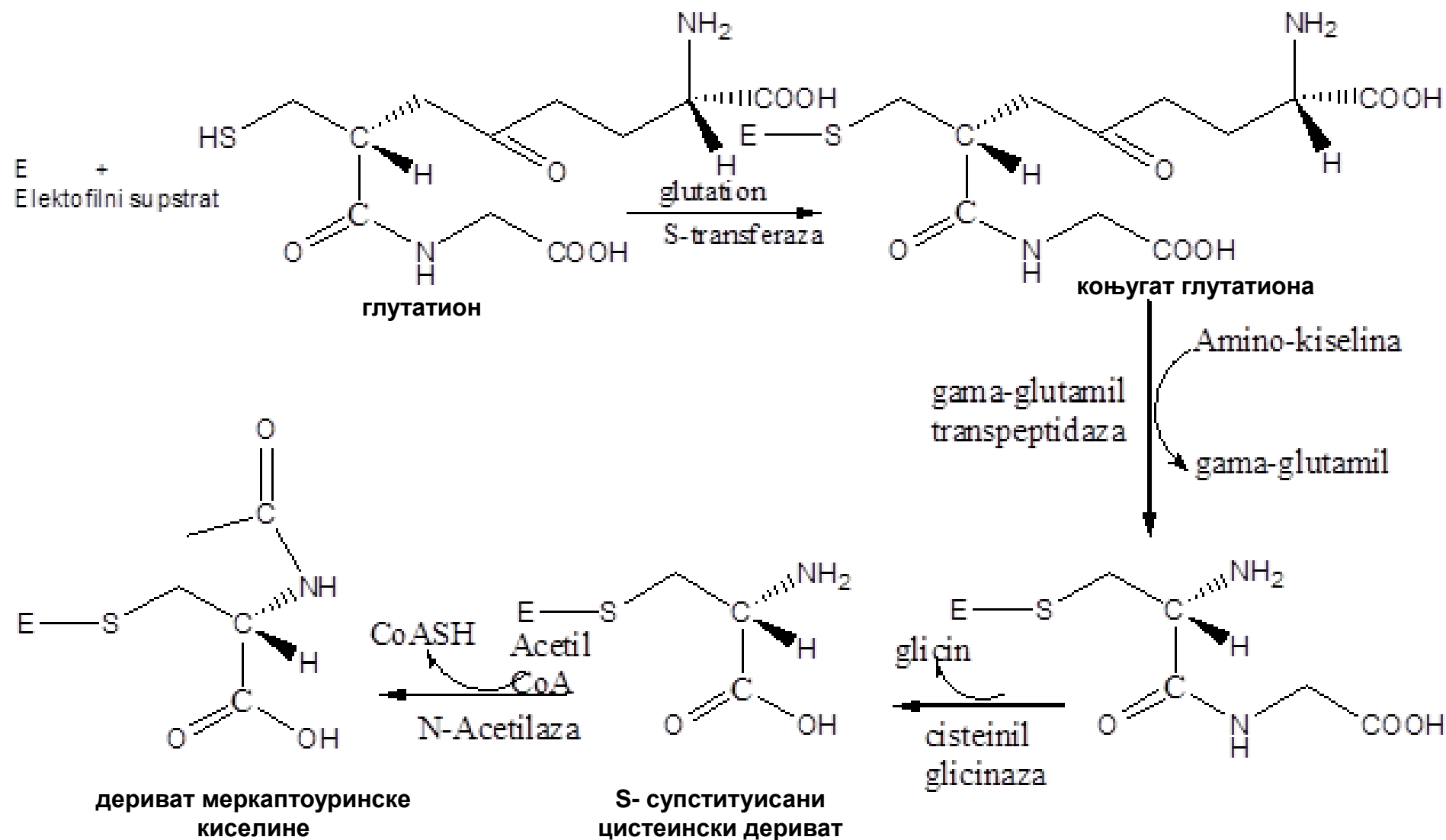
4. Коњугати са глутатионом (*GSH*) или меркаптоуринском киселином

- Грађење коњугата са глутатионом представља значајан пут за детоксикацију од хемијски реактивних електрофилних једињења. Познато је да реактивна електрофилна једињења испољавају токсичност (некроза ткива, карциногеност, мутагеност, тератогеност) везивањем за нуклеофилне групе у ендогеним протеинима и нуклеинским киселинама ковалентном везом.
- Већина озбиљних токсичних ефеката лекова се објашњавају везивањем електрофилних метаболита лекова са нуклеофилима ковалентном везом, на нивоу ћелије.

4. Коњугати са глутатионом (*GSH*) или меркаптоуринском киселином

- *GSH* штити виталне ћелијске ендogene молекуле од хемијски реактивних једињења помоћу нуклеофилне тиолне групе. Тиолна група интерагује са електрон-дефицитарним једињењима при чему настају S-супституисани *GSH*-коњугати (адукти).
- Молекули лекова који су коњеговани са глутатионом се обично из организма не излучују у том облику, већ подлежу даљој биотрансформацији при чему настају S-супституисани N-ацетилцистеински производи који се називају меркаптоуринске киселине.

Реакција коњугација са глутатионом

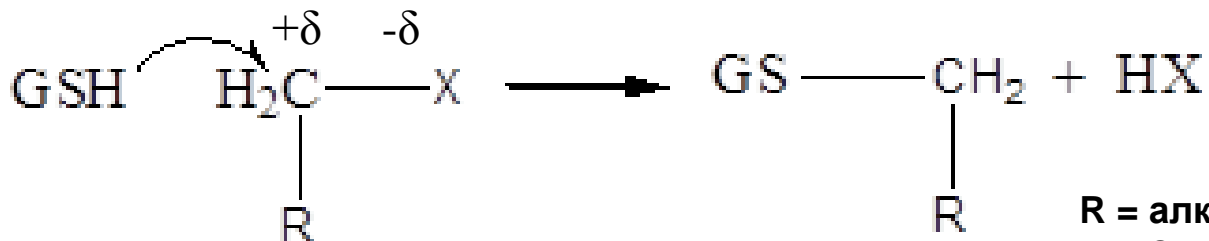


4. Коњугати са глутатионом (*GSH*) или меркаптоуринском киселином

- Коњугација већине супстрата са *GSH* је катализована ензимима *GSH*-S-трансферазама.
- За разлику од других реакција друге фазе метаболизма лекова, у коњугацији са глутатионом није неопходна активација коензима или супстрата, због природе глутатиона.

4. Коњугати са глутатионом (GSH) или меркаптоуринском киселином

- Механизам реакције молекула са GSH може да се одвија на два начина:
 - (1) нуклеофилним премештањем на електрон-дефицирарни угљеник или хетеро-атом или
 - (2) нуклеофилна адиција електрон-дефицирарне двогубе везе.
- Већина алифатичних и арил-алкил халогенида (Cl, Br, I), сулфати (OSO₃-), сулфоната (OSO₂R), нитрита (NO₂) и органофофата (O-P[OR]₂) садрже електрон-дефицирарне угљеникове атоме који интереагују са GSH (алифатични нуклеофилни премештањем) и граде GSH-коњугате



R = алкил, арил, бензил, алил
X = Cl, Br, I, OSO₃, OSO₂R, OPO(OR)₂

4. Коњугати са глутатионом (GSH) или меркаптоуринском киселином

- С-атом постаје електрофилан због електрон-акцепторских група (халогениди, сулфати, фосфати).
- Нуклеофилно премештање је олакшано код бензилних или алилних С-атома или када је X добро одлазећа група (халогениди, сулфати).
- Већина индустријских хемикалија (бензил-хлорид, алил-хлорид, метил-јодид) су токсичне и канцерогене. Реактивност ових халогенида објашњава се њиховом коњугацијом са GSH и даљим настајањем одговарајућих деривата меркаптоуринске киселине.

4. Коњугати са глутатионом (GSH) или меркаптоуринском киселином

- Детоксикација од органофосфатног инсектицида, паратион се одвија два начина:
 - (1) алифатична нуклеофилна супституција и настанак S-метилглутатиона и
 - (2) ароматична нуклеофилна супституција и настанак S-p-нитрофенилглутатиона.
- Ароматична или хетероароматична нуклеофилна супституција са GSH се одвија само када прстен постане довољно електрон-дефицитан у присуству једног или више електрон-акцепторских супституената (-Cl, -NO₂).

4. Коњугати са глутатионом (*GSH*) или меркаптоуринском киселином

- Детоксикација од ареноксида и алифатичних епоксида (оксирана) одвија се коњугацијом са глутатионом.
- Ареноксиди и епоксиди су интермедијери који настају током оксидације посредоване *CYP*-ензимима ароматичних једињења или олефина и уколико се не коњугују посредством *GSH*-трансферазе онда ће се ковалентно везати за ћелијске макромолекуле и изазвати токсичност.

4. Коњугати са глутатионом (GSH) или меркаптоуринском киселином

- GSH-коњугација која се одвија преко супституције на хетероатомима (нпр.: кисеоник) карактеристична је за органске нитрате. Овако настали коњугати се не преводе до меркаптоуринске киселине већ се посредством ензима конвертују до одговарајућих алкохола и глутатион-дисулфида (GSSG).
- Нуклеофилна адиција GSH електрон-дефицитарне двогубе ($C=C$) везе одвија се углавном код једињења са α,β -незасићеном двогубом везом. У већини случајева двогуба веза постаје дефицитарна електронима због резонанције или коњугације са карбонилном групом (алдехиди, кетони), естрима, нитрилима и др. Овакви α,β -незасићени системи подлежу такозваним *Michel*-овим адицијама са GSH при чему настају GSH-коњугати. Коњугација са GSH се не одвија са свим α,β -незасићени системима.

5. Ацетиловање

- Ацетиловање представља врло значајан метаболички пут за једињења која садрже примарну амино-групу:
 - примарни ароматични амини (ArNH_2),
 - сулфонамиди ($\text{H}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NHR}$),
 - хидразини ($-\text{NHNH}_2$),
 - хидразиди ($-\text{CONHNH}_2$) и
 - примарни алифатични амини (RNH_2).
- Деривати амида који су настали ацетиловањем амина су неактивни и нетоксични. С обзиром да растворљивост у води није повећана након N-ацетиловања, примарни циљ ацетиловања је детоксикација и фармаколошка инаktivација.

5. Ацетиловање

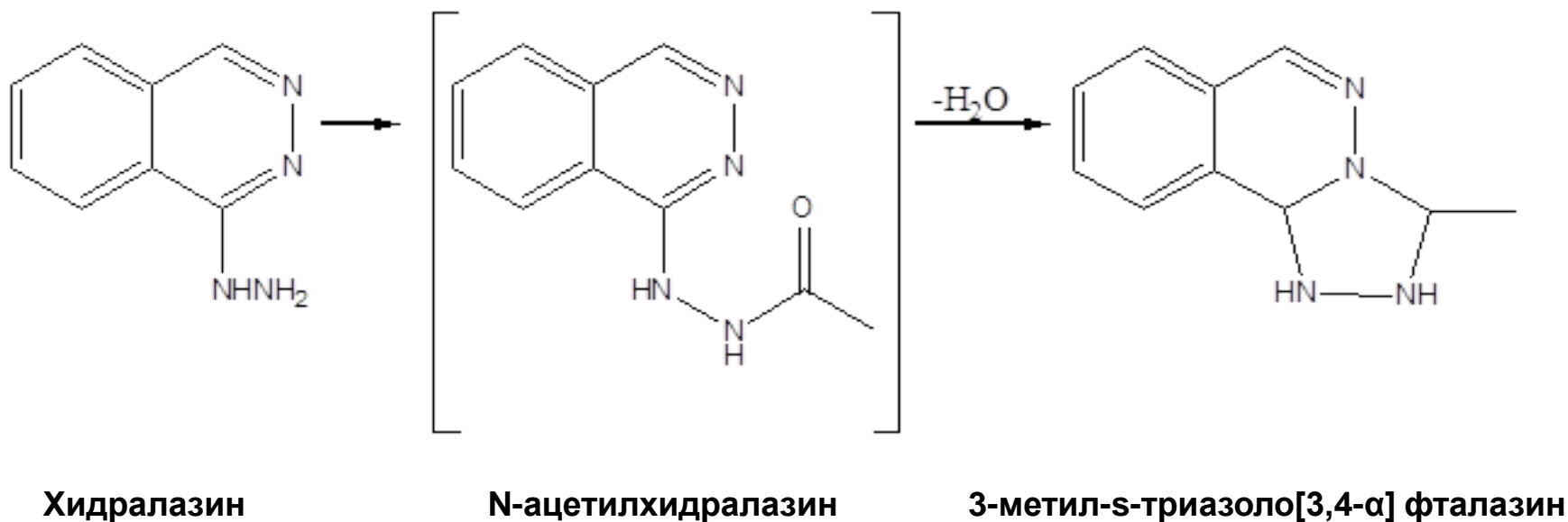
- Међутим, иако ретко, показано је да ацетиловани метаболити могу бити активни као и полазно једињење или више токсични у односу на полазно једињење. Извор ацетил групе за N-ацетиловање је ацетил-CoA.
- Трансфер ацетил групе из овог кофактора до акцепторске амино-групе супстрата је катализован ензимом N-ацетилтрансфераза, локализован у ретикулоендотелијалним ћелијама јетре. N-ацетилтрансфераза може деловати на већи број супстрата и катализовати ацетиловање већег броја лекова.

5. Ацетиловање

- **Ароматични амини** који настају биоредукцијом арил-нитро једињења, такође подлежу N-ацетиловању.
- N-ацетиловање **примарних алифатичних амина** се одвија у мањем обиму због тога што је оксидативна деаминација главни метаболички пут.
- Ацетиловање **сулфонамида** се најчешће одвија у позицији N-4, мада се може одвијати и у сулфамидо позицији N-1. N-ацетилувани метаболити сулфонамида су мање растворни у води у односу на једињења од којих су настали, зато могу да кристализују у тубулима бубрега и да доведу до оштећења бубрега.

Ацетиловање хидразинских деривата

Биотрансформација **хидразина** и **хидразидских деривата** се одвија, такође ацетиловањем. Почетно, настају нестабилни N-ацетил деривати хидразина који даље подлежу циклизацији при чему настаје 3-метил-s-триазоло[3,4- α]фталазин.



5. Ацетиловање

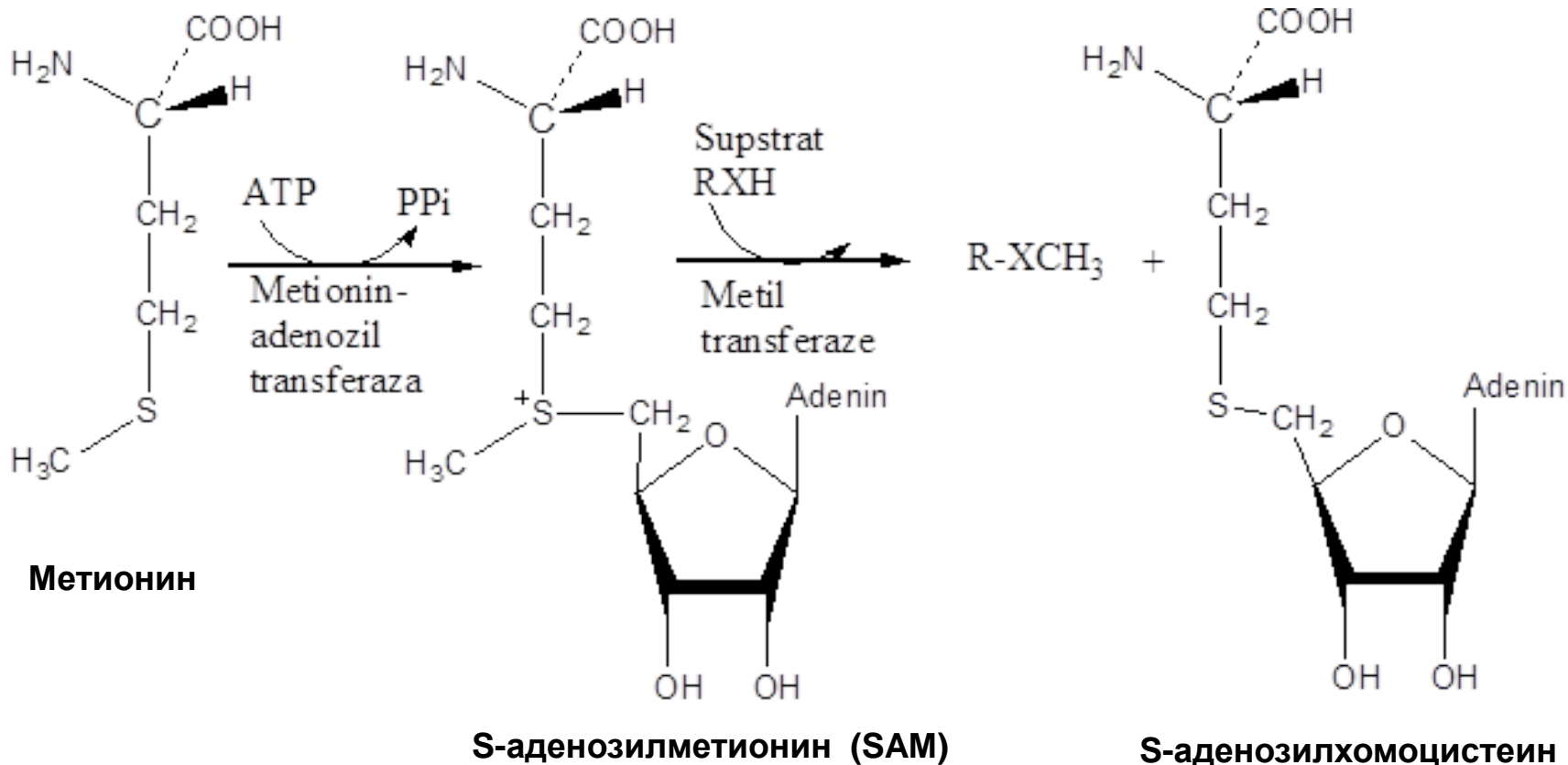
- N-ацетиловање може да се одвија двојако, при чему молекул лека може бити коњугован брже или спорије са ацетил-СоА. Овај феномен је познат као ацетилацијски полиморфизам.
- Брзина ацетиловања зависи од генотипа појединца који утиче на активност ензима N-ацетилтрансферазе.
- Због ових индивидуалних разлика постоји различитост у метаболизму одређених лекова, што код особа које су такозвани "спори ацетилатори" може доћи до развоја нежељених дејстава, док код особа које су такозвани "*брзи ацетилатори*" може доћи до неадекватног терапијског одговора при стандардним терапијским дозама лека.

6. Метиловање

- Реакције метиловања имају врло значајну улогу у биосинтези многих ендогених молекула (епинефрин и мелатонин) и инактивацији бројних физиолошки активних биогених амина (норепинефрин, допамин, серотонин, хистамин).
- Међутим, метиловање се одвија у мањем степену у метаболизму лекова и коњугата.
- Метиловањем не настају метаболити који су поларни и растворни у води, осим када настају кватенерне амонијум соли. Већина метилованих производа је фармаколошки неактивна, мада постоје изузеци.

6. Метиловање

- Реакције метиловања су посредоване коензимом S-аденозилметионин (SAM). Трансфер активираних метил-групе са коензима на супстрат (акцептор) је катализован различитим цитоплазматским или митохондријалним метил-трансферазама.



6. Метиловање

- Метилтрансферазе од посебног значаја у метаболизму су:
 - катехол-О-метилтрансферазе (COMT),
 - фенол-О-метилтрансферазе,
 - неспецифичне N-метилтрансферазе и
 - S-метилтрансферазе.
- COMT катализује О-метиловање неуротрансмитера, епинефрина и допамина, до инактивних метаболита.
- Примарно је локализован у централним и периферним нервним ћелијама, мада се налази и у јетри и бубрезима.
- Остале метилтрансферазе су примарно локализоване у јетри, бубрезима или плућима. Трансферазе које специфично катализују метиловање хистамина, серотонина и епинефрина, обично не учествују у метиловању лекова.

6. Метиловање

- Егзогена једињења која подлежу метиловању су: катехоли, феноли, амини, тиоли, N-хетероцикли.
- **Катехоли и катехоламински** лекови се метаболишу посредовањем COMT до инактивних монометиллованих катехолских деривата. Катехолски метаболити настали ароматичним хидроксиловањем фенола и арен оксид дихидродиол-катехол метаболичког пута, такође подлежу O-метиловању.
- Супстрати који подлежу O-метиловању посредовањем COMT морају да садрже ароматичну 1,2-дихидроксилну групу (катехолску), јер резорцинол (1,3 дихрокси-бензен) и пара-хидрохинон (1,4 дихидрокси-бензен) нису супстрати за COMT.

6. Метиловање

- Феноли подлежу О-метиловању, мада у врло малом степену (нпр.: конверзија морфина до кодеина).
- N-метиловање **ендогених (биогених)** амина је чест метаболички пут али у случају лекова који садрже азот N-метиловање се одвија у ограниченом степену. N-метиловање азотових атома хетероциклуса (нпр.: пиридин и његови деривати) се одвија до одговарајућих кватенерних амонијум соли.
- Лекови који садрже тиолну групу подлежу S-метиловању.