

Metabolikus transzformációk mechanizmusa és sztereokémiája

Perjési Pál



**„Megújuló gyógyszerési kompetenciák
gyakorlatorientált elsajátítását szolgáló digitális tananyagok fejlesztése
magyar és angol nyelven,
az egyetemi oktatók felkészítése a 21. század oktatási kihívásaira”
Azonosítószám: TÁMOP -4.1.2.A/1-11/1-2011-0016**

Pécsi Tudományegyetem – Pécs, 2015

© Perjési Pál, 2015

A projekt az Európai Unió támogatásával
az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg

Kézirat lezárva: 2015. szeptember 18.

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujsechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

A kiadásért felel a: Pécsi Tudományegyetem

Felelős szerkesztő: Dr. Perjési Pál

Egyéb fejlesztő: Erdősné Moravec Zsuzsanna

Műszaki szerkesztő: Bencze Zsolt és Erdősné Moravec Zsuzsanna

Lektorálta: Dr. Lázár László

Terjedelem: 101 oldal

Tartalom

ÁBRAJEGYZÉK	9
ELŐSZÓ	13
I TESTIDEGEN ANYAGOK SORSA A SZERVEZETBEN	14
I.1 TESTIDEGEN ANYAGOK SZERVEZETBE TÖRTÉNŐ BEJUTÁSÁNAK LEGFONTOSABB ÚTJAI	14
I.2 METABOLIKUS ÁTALAKULÁSOK	15
I.2.1 Fázis I átalakulások.....	16
I.2.2 Fázis II átalakulások	17
I.3 FELSZÍVÓDÁS, KIÜRÜLÉS	18
I.4 IRODALOM	20
II ENZIMKATALIZÁLT REAKCIÓK MECHANIZMUSA I. MECHANIZMUS, REAKCIÓKINETIKA	21
II.1 AZ ENZIMKATALÍZIS MECHANIZMUSA.....	22
II.2 AZ ENZIMEK CSOPORTOSÍTÁSA	23
II.3 AZ ENZIMREAKCIÓK KINETIKÁJA	24
II.4 IRODALOM	27
III A SZTEREOKÉMIA ALAPJAI	28
III.1 DIASZTEREOIZOMEREK	28
III.1.1 Szerkezeti izomerek.....	28
III.1.2 Geometriai izomerek	29
III.1.3 Optikai izomerek	30
III.2 ENANTIOSZTEREOIZOMEREK.....	32
III.3 IRODALOM	35
IV ENZIMKATALIZÁLT REAKCIÓK MECHANIZMUSA I. OXIDOREDUKTÁZOK KOENZIMJEI	36
IV.1 NIKOTINSAVAMID-KOENZIMEK.....	36
IV.2 FLAVIN-KOENZIMEK	41
IV.3 KINON SZERKEZETI ELEMET TARTALMAZÓ KOENZIMEK.....	46
IV.4 IRODALOM	46
V OXIDATÍV ÁTALAKULÁSOK. MONOOXIGENÁZOK I. HEM- DEPENDENS MONOOXIGENÁZOK	47
V.1 . A CITOKRÓM P450 ENZIMEK SZERKEZETE, NEVEZÉKTANA.	47
V.2 . A CITOKRÓM P450 ENZIMEK KATALITIKUS CIKLUSA.....	50
V.3 . AZ ALIFÁS HIDROXILÁCIÓ MECHANIZMUSA.....	51
V.4 . AZ ALKÉN-EPOXIDÁCIÓ MECHANIZMUSA	51

V.5	. AZ AROMÁS HIDROXILÁCIÓ MECHANIZMUSA.....	52
V.6	. AZ ALKILÉTER OXIDÁCIÓ MECHANIZMUSA	53
V.7	. SZÉN-SZÉN KÖTÉS FELHASADÁSÁVAL JÁRÓ REAKCIÓK MECHANIZMUSA	53
V.8	IRODALOM.....	54
VI	OXIDATÍV ÁTALAKULÁSOK. MONOOXIGENÁZOK II. FAVIN-DEPENDENS MONOOXIGENÁZOK.....	55
VI.1	KÜLSŐ REDUKÁLÓSZERT NEM IGÉNYLŐ ENZIMEK	55
VI.2	KÜLSŐ REDUKÁLÓSZERT IGÉNYLŐ ENZIMEK	56
VI.2.1	Flavin monooxygenáz (FMO) enzimek	56
VI.2.2	Keton-monooxygenáz enzimek.....	57
VI.3	IRODALOM.....	58
VII	OXIDATÍV ÁTALAKULÁSOK. DIOXIGENÁZOK.....	59
VII.1	PIROKATECHIN-DIOXIGENÁZ	59
VII.1.1	Intradiol-dioxigenázok	59
VII.1.2	Extradiol-dioxigenázok	60
VII.2	PROSZTAGLANDIN H-SZINTÁZ	61
VII.3	IRODALOM.....	65
VIII	GLÜKURONSAV-KONJUGÁCIÓ.....	66
VIII.1	MECHANIZMUS.....	66
VIII.2	SZTEREOKÉMIA	68
VIII.3	IRODALOM.....	70
IX	SZULFONÁT KONJUGÁCIÓ.....	72
IX.1	MECHANIZMUS.....	72
IX.2	SZTEREOKÉMIA	74
IX.3	IRODALOM.....	78
X	AMINOSAV-KONJUGÁCIÓ.....	79
X.1	. MECHANIZMUS	80
X.2	IRODALOM.....	82
XI	ACETILEZÉS	84
XI.1	MECHANIZMUS.....	86
XI.2	IRODALOM.....	87
XII	KONJUGÁCIÓ GLUTATIONNAL	88
XII.1	MECHANIZMUS.....	89
XII.2	SZTEREOKÉMIA	92
XII.3	IRODALOM.....	96

XIII	METILEZÉS	97
	XIII.1 MECHANIZMUS	98
	XIII.2 IRODALOM	101

Ábrajegyzék

I-1. ábra: Különböző utakon a szervezetbe jutott anyagok sorsa a szervezetben.	15
I-2. ábra: A benzoésav hippursavvá történő átalakulásának reakciója.	15
I-3. ábra: A xenobiotikumok átalakulásának két lehetséges útja (<i>R.T. Williams</i>).	16
I-4. ábra: Testidegen anyagok egyszerű diffúziójának típusai.	18
II-1. ábra: Katalizált és nem-katalizált reakciók energiaprofilja.	21
II-2. ábra: Az enzim-szubsztrát kötődés <i>Fischer</i> -féle kulcs-zár modellje.	22
II-3. ábra: Enzimkatalizált reakció sebességének (v) változása a szubsztrát- koncentráció $[S]$ függvényében. (v_{max} : maximális sebesség, K_M : Michaelis-Menten állandó).	24
III-1. ábra. A 2-metil-pentán (1) és 3-metil-pentán (2), valamint az etanol (3) és dimetil-éter (4) szerkezete.	28
III-2. ábra. A (<i>Z</i>)-2-butén (1) és az (<i>E</i>)-2-butén (2), valamint a <i>cisz</i> -1,2-dimetil- ciklopentán (3) és <i>transz</i> -1,2-dimetil-ciklopentán (4) szerkezete.	29
III-3. ábra. Az (<i>E</i>)- és a (<i>Z</i>)-diszubsztituált eténszármazékok szerkezete.	29
III-4. ábra. Optikai forgatóképesség.	30
III-5. ábra. Az alanin két enantiomerje.	30
III-6. ábra. A D-szorbit és a D-mannit projektív képlete.	31
III-7. ábra. Az enantiomer borkősavak projektív képletei.	31
III-8. ábra. A <i>mezo</i> -borkősav projektív képlete (A tükörképi pár két szerkezete egymással megegyező).	32
III-9. ábra. A gliceraldehid enantiomerek <i>Fischer</i> -féle projekciós képletei.	33
III-10. ábra. A D-(+)-gliceraldehid, a D-(-)-tejsav és az L-(+)-alanin projekciós képletei.	33
III-11. ábra. A D/L és az R/S konfigurációs prefixumok közötti összefüggés.	35
IV-1. ábra. A NAD^+ (1), a $NADP^+$ (2), valamint a $NADH$ (3) és a $NADPH$ (4) szerkezete.	37
IV-2. ábra. A $NADPH = NAD(P)^+$ reverzibilis redoxrendszer működésének elve.	37
IV-3. ábra. A nikotinsavamid-koenzimek által katalizált fontosabb kémiai átalakulások.	38
IV-4. ábra. A 2-butanon redukciójával keletkező (R)- és (S)-2-butanol enantiomerek szerkezete.	39
IV-5. ábra. Az acetaldehid $NADH$ -részvételével lejátszódó ADH-katalizált redukciója.	39
IV-6. ábra. Az etanol NAD^+ -részvételével lejátszódó oxidációja.	40
IV-7. ábra. Az etilalkohol <i>pro</i> -(R)- és <i>pro</i> -(S)-hidrogénatomjai.	40
IV-8. ábra. Az etilalkohol <i>pro</i> -(R)- és <i>pro</i> -(S)-hidrogénatomjainak közös hatása a $NAD(P)^+$ koenzimokkal.	40
IV-9. ábra. A nikotinsavamid molekularész <i>Re</i> és <i>Si</i> oldalai valamint <i>pro</i> -(R)- és <i>pro</i> -(S)-hidrogénatomjai.	41
IV-10. ábra. A flavin-adenin-dinukleotid (FAD) szerkezete.	42
IV-11. ábra. Az izoalloxazin gyűrűrendszer és építőelemeinek számozása és szerkezete.	42
IV-12. ábra. A $FL = FLH_2$ reverzibilis redoxreakció.	43
IV-13. ábra. A flavin-koenzimek (FL) által katalizált fontosabb kémiai átalakulások.	43
IV-14. ábra. A redukált flavin (FLH_2) oxidált flavinná (FL) történő oxidázok által katalizált oxidációja.	44

IV-15. ábra. A redukált flavin (FLH ⁻) oxidált flavinná (FL) történő dehidrogenázok által katalizált oxidációja	44
IV-16. ábra. A flavin-tartalmú enzimek katalitikus ciklusa	45
IV-17. ábra. A monoamin-oxidáz (MAO) enzimek által katalizált reakciók feltételezett mechanizmusa.....	45
V-1. ábra. A citokróm P-450 enzimek egyszerűsített szerkezete.....	48
V-2. ábra. A citokróm P-450 enzimek működésének elve.....	48
V-3. ábra. Humán CYP450 izoformák százalékos megoszlása a májban és az izoformák jelntősége a gyógyszerek (testidegen anyagok) oxidatív metabolizmusában	49
V-4. ábra. A CYP450 enzimek oxigénaktiválásának mechanizmusa	50
V-5. ábra. A nem-aktívált alkánok CYP450 enzimek által történő hidroxilációjának mechanizmusa.	51
V-6. ábra. A kétlépéses CYP450-katalizált alifás hidroxiláció végtermékeinek lehetséges szerkezete.	51
V-7. ábra. A CYP450-katalizált alkén-epoxidáció mechanizmusa.....	52
V-8. ábra. A CYP450-katalizált aromás hidroxiláció mechanizmusa	52
V-9. ábra. A CYP450-katalizált alkiléter oxidáció mechanizmusa	53
V-10. ábra. Az androsztendion aromataz enzimek által katalizált oxidációjának lépései.	54
VI-1. ábra. A laktát-oxidáz enzim működésének mechanizmusai	55
VI-2. ábra. A <i>p</i> -hidroxibenzoát-hidroxiláz enzim által katalizált aromás hidroxilációs folyamat mechanizmusa	57
VI-3. ábra. A keton-monooxigenáz enzimek által katalizált Baeyer-Villiger oxidáció mechanizmusa	58
VII-1. ábra. A pirokatechin-dioxigenáz enzimek által katalizált reakciók típusai.....	59
VII-2. ábra. A protokatechuát-3,4-dioxigenáz enzim által katalizált reakciók mechanizmusa.	60
VII-3. ábra. Az extradiol-dioxigenázok által katalizált reakciók mechanizmusa.	61
VII-4. ábra. A prosztaglandin H-szintáz enzimek által katalizált reakciók.....	62
VII-5. ábra. A prosztaglandin H-szintáz enzim által katalizált dioxigenáz reakciók feltételezett mechanizmusai.	62
VII-6. ábra. A prosztaglandin H ₂ továbbalakulásával képződő prosztaglandin-származékok.	64
VII-7. ábra. A COX-1 és COX-2 enzimek kötőhelye	65
VIII-1. ábra. Az euxantinsav és uroklorálsav szerkezeti képletei.	66
VIII-2. ábra. A paracetamol és az ibuprofén glükuronsav-konjugátummá történő átalakulásának UDP-glükuronil-transzferáz (UGT) enzimek által katalizált reakciója.	66
VIII-3. ábra. Az UGT enzimek legfontosabb funkciós csoportokkal rendelkező szubsztrátjai glükuronsav-konjugátummá történő átalakulásának reakciói.	68
VIII-4. ábra. Az UGT enzimek legfontosabb funkciós csoportokkal rendelkező szubsztrátjai glükuronsav-konjugátummá történő átalakulásának reakciói.	69
VIII-5. ábra. Az UGT enzimek legfontosabb funkciós csoportokkal rendelkező szubsztrátjai glükuronsav-konjugátummá történő átalakulásának reakciói.	69
VIII-6. ábra: A diklofenák-glükuronid reakciója fehérjével	70

IX-1. ábra. A paracetamol szulfonát-konjugátummá történő átalakulásának szulfotranszferáz (SULT) enzimek által katalizált reakciója	72
IX-2. ábra. Az aktív szulfát (PAPS) szintézise és részvétele a szulfonát-konjugátumok képződésében.	73
IX-3. ábra. A SULT1E1 enzim által katalizált reakciók feltételezett mechanizmusa.....	75
IX-4. ábra. Az (R)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftol (1) és az (S)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftol (2) szerkezete és térszerkezete.....	76
IX-5. ábra. A PAPS és az (S)-2-metil-1-fenil-1-propán feltételezett kötődése az aril-szulfotranszferáz IV (SULT1A1) enzim aktív helyéhez.	76
IX-6. ábra. A 2-acetilaminofurén és 7,12-dimetilbenz[a]antracén reaktív nitrogén- és széncentrumú kationokká történő metabolikus aktivitása	77
X-1. ábra. A benzoésav glicin-konjugátuma (hippursav) képződésének reakciója	79
X-2. ábra. A koenzim-A (HSCoA) és az acetil-koenzim-A (acetil-SCoA) szerkezete	80
X-3. ábra. A hosszú szánláncú acil-CoA-szintetáz által katalizált tioészterképződési reakció egyszerűsített mechanizmusa	81
X-4. ábra. Az acetil-koenzim-A (acetil-SCoA) nukleofil reaktánsokkal lejátszódó reakciója.	82
X-5. ábra. Az acil-CoA:glicin N-aciltranszferáz enzim által katalizált reakciók feltételezett mechanizmusa	82
XI-1. ábra: A <i>m</i> -nitrobenzaldehyd <i>N</i> -acetil- <i>m</i> -aminobenzoésavvá történő metabolizmusának reakcióútja.....	84
XI-2. ábra Az <i>N</i> -acetiltranszferáz (NAT) enzimek által katalizált reakciók	85
XI-3. ábra: A prokainamid acetilszármazékká történő átalakulásának <i>N</i> -acetiltranszferáz (NAT) enzimek által katalizált reakciója.....	86
XI-4. ábra: Az <i>N</i> -acetiltranszferáz enzimek által katalizált reakciók koncertikus és szekvenciális mechanizmusa	86
XII-1. ábra. A redukált glutation (GSH) bioszintézise	88
XII-2. ábra. Az etakrinsav és a redukált glutation (GSH) glutation-S-transzferáz (GST) enzimek által katalizált reakciója.....	89
XII-3. ábra. A glutation-konjugátumok merkaptursav-származékká történő metabolizmusának reakcióútja.....	89
XII-4. ábra. A redukált glutation (GSH) feltételezett kötődése a GST A, M és P formáinak G-kötőhelyén.	91
XII-5. ábra. Az aromás epoxidok és az alfa,béta-telítetlen karbonilvegyületek feltételezett kötődése a GST M enzimek kötőhelyén	91
XII-6. ábra. A 1-klór-2,4-dinitrobenzol redukált glutationnal (GSH) lejátszódó reakciója	92
XII-7. ábra. A brómizovál redukált glutationnal (GSH) lejátszódó GST-katalizált reakciója	92
XII-8. ábra. A Bay- és a Fjord-régiós policiklusos aromás szénhidrogének (PAH) és diol-epoxid származékainak szerkezete.....	93
XII-9. ábra. A Bay- és a Fjord-régiós policiklusos aromás szénhidrogének (PAH) és diol-epoxid származékainak GSTA1-1 enzimkatalizált reakciója	94
XII-10. ábra. Az etakrinsav GSTA1-1 enzim által katalizált reakciója.....	95
XIII-1. ábra. Az <i>S</i> -adenozil-metionin (SAM) ciklus	97
XIII-2. ábra. A norepinefrin katechol-O-metiltranszferáz (COMT) enzimek által katalizált O-metilézési reakciója.....	98

XIII-3. ábra. A DNS adenin egységének m ⁶ A DNS-metiltransferáz enzimek által katalizált N ⁶ -metilezési reakciója	99
XIII-4. ábra. A norepinefrin katechol-O-metiltransferáz (COMT) által katalizált O-metilezési reakciója	100
XIII-5. ábra. Az epinefrin katechol-O-metiltransferáz (COMT) enzimek által katalizált O-metilezési reakciójának S _N 2 reakciója.....	100

Előszó

A szervezetbe kerülő testidegen anyagok (gyógyszerek, élelmiszerek, stb.) a szervezet endogén biokémiai mechanizmusainak részvételével kémiaiilag átalakulnak a szervezetben. Az átalakult származékok (metabolitok) szerkezetét, mennyiségét, valamint további sorsát elsősorban a testidegen anyagok (xenobiotikumok) néhány alapvető fizikai-kémiai tulajdonsága, így a (tér)szerkezet, az ionizációs készség, valamint a lipofil-hidrofil fázisok közötti megoszlási hányados határozza meg.

A szervezetbe kerülő gyógyszerek metabolikus átalakulásainak kémiája a gyógyszerészi kémiai ismeretek integráns része. Több éves oktatási tapasztalataink alapján azonban megállapítható, hogy a gyógyszervegyületek metabolizmusának kémiai alapjai, a keletkezett metabolitok fizikai-kémiai jellemzése, valamint megismert mellékhatások és a vegyületek metabolikus átalakulásai közötti összefüggések molekuláris szintű megismerése túlmutat a tantárgy oktatására rendelkezésre álló óraszámokon.

Jelen tananyag a gyógyszerészi kémia tananyagot kiegészítő választható kurzusként meghirdetett tantárgy főbb fejezeteinek alapján íródott. A tantárgy keretében a hallgatók megismerkednek a szervezetbe kerülő testidegen anyagok (köztük a gyógyszerként alkalmazott vegyületek) kémiai átalakulásainak kémiai természetével, a keletkező metabolitok szerkezetével, valamint a reakciókat katalizáló enzimek működésének mechanizmusával. A tananyag bemutatja a gyógyszerek (testidegen anyagok) metabolikus transzformációs reakcióinak molekuláris mechanizmusait, kiemelve az enzim-szubsztrát kölcsönhatás szerepét a katalizált reakciók mechanizmusában, sztereoszelektivitásában valamint sztereospecifikusságában. Az érdeklődő olvasó számára az egyes fejezetek mélyebb megismerését összefoglaló közlemények segítik.

A szerkesztők köszönetüket fejezik ki Dr. Lázár László egyetemi docens Úrnak (Szegedi Tudományegyetem), aki lelkiismeretes lektori munkájával, építő jellegű megjegyzéseivel, javításaival járult hozzá, hogy a hallgatók hiteles, megbízható forrásból ismerkedjenek meg a gyógyszerek metabolikus átalakulásainak molekuláris szintű ismereteivel.

A tananyag modulszerű felépítése lehetővé teszi, hogy a jövőben szükség szerint újabb területekkel, további metabolikus transzformációkon alapuló nemkívánatos hatások molekuláris alapjainak részletes tárgyalásával bővüljön. Ezzel kapcsolatban a tananyag szerkesztője örömmel vesz minden hozzá eljuttatott javaslatot. Természetesen a szerkesztő köszönettel vesz bármi, a javításra vonatkozó megjegyzést.

Pécs, 2015. szeptember

A szerkesztő

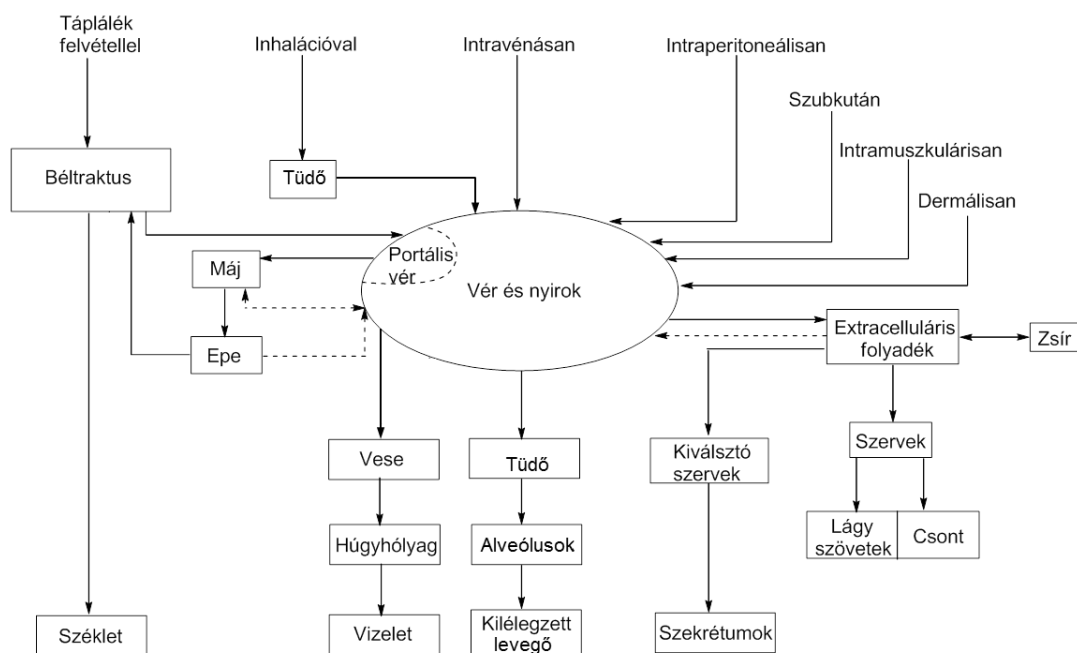
I Testidegen anyagok sorsa a szervezetben

I.1 Testidegen anyagok szervezetbe történő bejutásának legfontosabb útjai

A testidegen anyagok szervezetbe történő bejutásának legfontosabb útjai a következők:

1. *Szájon keresztül (per os)*
Ez esetben a szervezetbe bekerülő anyag a gyomor-bél rendszer különböző szakaszain (szájüreg, gyomor, vékonybél) szívódik fel és kerül be a centrális keringésbe. A vékonybélből felszívódó anyagok először a *vena portae*-n keresztül a májba kerülnek, és csak azt követően továbbítja őket a centrális keringés a különböző szervekbe. A felszívódott anyagok a centrális keringésbe kerülést megelőzően a májban (és a gyomor-bél rendszer epithel sejtjeiben) metabolikusan átalakulhatnak. A centrális keringésbe kerülést megelőző hepatikus metabolizmust a szakirodalom „*first pass*” hatásként írja le.
 2. *Tüdőn keresztül, inhalációval.*
A tüdőn keresztül a szervezetbe kerülő testidegen anyag közvetlenül a centrális keringésbe kerül, kikerülve ezáltal a *per os* alkalmazott gyógyszerek esetén fellépő ún. „*first pass*” metabolikus átalakulást.
 3. *Intravénásan*
Intravénás bekerülés esetén a testidegen anyag közvetlenül a centrális keringésbe kerül. A kialakuló hatás szempontból az anyag hasznosulása ez esetben maximális.
 4. *Intraperitoneálisan*
A hasüregbe történő bekerülés gyakorlatilag csak az experimentális farmakológiában, illetve toxikológiában fordul elő.
 5. *A bőr különböző rétegein keresztül*
E kategóriába sorolhatók a bőr felületéről (*dermálisan*) történő felszívódás, valamint a bőr különböző rétegeibe injektált hatóanyagok felszívódása. Az ún. *szubkután* beadásnál a bőr alatti zsírszövetbe szúrják a tűt, a befecskendezett anyag a kapillárisokon vagy a nyirokerek keresztüljut a véráramba.
 6. *Intramuszkulárisan*
Az intramuszkuláris adagolást akkor alkalmazzák, amikor nagyobb térfogatú gyógyszert jutatnak a szervezetbe. Az, hogy a gyógyszer milyen gyorsan kerül a véráramba, részben az izom vérellátásától függ; minél gyéribb a vérellátás, annál lassabban.
 7. *Végbélen keresztül*
A végbélen keresztül történő bejutás esetén a szervezetbe kerülő anyag közvetlenül a centrális keringésbe kerül. (Kikerüli a máj ún. „*first pass*” hatását.) A végbél belső borítása vékony és sűrűn átszótt erekkel, ezért a hatóanyag könnyen felszívódik.
- A különböző utakon a szervezetbe kerülő testidegen anyagok további sorsát összefoglalóan az I-1. ábra mutatja be.

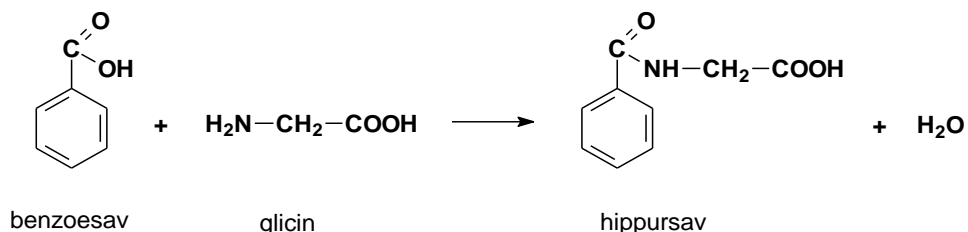
I-1. ábra: Különböző utakon a szervezetbe jutott anyagok sorsa a szervezetben.



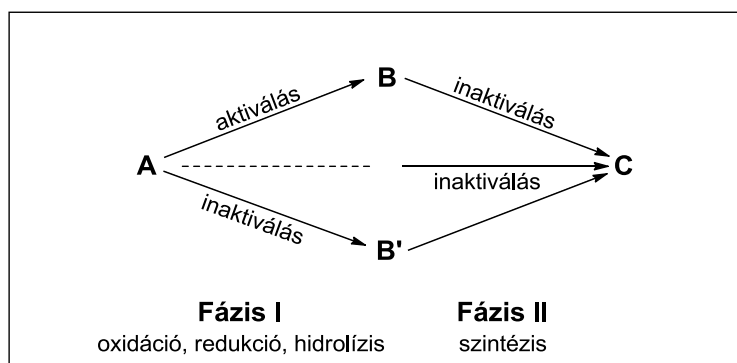
I.2 Metabolikus átalakulások

A szervezetbe kerülő gyógyszerek és egyéb testidegen anyagok (ún. xenobiotikumok) nagy része a szervezetben kémiai átalakul. A gyógyszervegyületek metabolizmusának vizsgálata a 19. század első feléig nyúlik vissza. Történetileg a benzoésav glicinnel képzett konjugátuma, a *hippursav* volt az elsőként izolált metabolitok egyike, melynek szerkezetét *V. Dessaignes* 1845-ben írta le (I-2. ábra).

I-2. ábra: A benzoésav hippursavvá történő átalakulásának reakciója.



A területen folytatott munkák első összefoglalójának megírása *R.T. Williams* nevéhez fűződik, aki 1957-ben megjelent „Detoxification Mechanisms” című könyvében a testidegen anyagok egy általános sémáját írta le, melyben a testidegen anyagok metabolikus átalakulásait „Fázis I” (oxidáció, redukció, hidrolízis) és „Fázis II” (szintézis) csoportokra osztotta. (I-3. ábra).

I-3. ábra: A xenobiotikumok átalakulásának két lehetséges útja (R.T.Williams).


A gyógyszerek biotranszformációjának vizsgálata az 1950-es évektől a farmakológiai, a gyógyszerészi-kémiai, valamint a toxikológiai kutatások középpontjában áll. A gyógyszerek és más testidegen anyagok Fázis I és Fázis II átalakulásainak vizsgálata nagyban hozzájárult ahhoz, hogy napjainkban a korábbi vegyületekhez viszonyítva jóval kevesebb mellékhatással bíró származékokat sikerül a gyógyászatba bevezetni. Az egyes biotranszformációs utak molekuláris szintű vizsgálata alapján ugyanis megállapítható volt, hogy az eredendően detoxikáló folyamatok során reaktív származékok keletkezhetnek, melyek toxikus hatások kialakulását eredményezhetik.

A testidegen anyagok metabolikus átalakulásait kémiai/biokémiai szempontból a következőképpen csoportosíthatjuk:

- (1) Nem enzim-katalizált (spontán) reakciók
- (2) Enzim-katalizált reakciók
 - (a) Mikroszómális enzimek által katalizált reakciók
 - (b) Nem-mikroszómális enzimek által katalizált reakciók

A metabolikus transzformációkat katalizáló enzimek mikroszómális és nem-mikroszómális csoportokba történő besorolása az elroncsolt sejtek (sejthomogenátumok) ultracentrifugálás során keletkező frakcióinak megnevezése alapján történik. A mikroszóma frakcióban megtalálható enzimek membránhoz kötve, még a mikroszóma frakció felülúszójában lévő enzimek a citoszolban és egyéb sejtfluidumokban található az intakt sejtekben.

I.2.1 Fázis I átalakulások

A fázis I metabolikus átalakulások három nagy csoportba sorolhatók: (a) *oxidációs*, (b) *redukciós* és (c) *hidrolitikus* reakciók. A fázis I reakciókat katalizáló enzimeket az intakt sejten belüli lokalizációjuk szempontjából membránhoz kötött és nem membránhoz kötött csoportokba sorolhatjuk, melyek a sejthomogenizátumok centrifugálásával nyerhető ún. mikroszómális, illetve nem-mikroszómális frakciójában található (I-1. táblázat).

I-1 táblázat. A fázis I. metabolikus átalakulások legfontosabb reakcióútjai és az azokat katalizáló enzimek fő szubcelluláris lokalizációi.

Reakcióút	Enzim vagy reakció	Lokalizáció ^a
Oxidáció	Citokróm P450	mikroszóma, mitokondrium
	Flavin-monooxygenáz	mikroszóma
	Prostaglandin-H-szintetáz	mikroszóma
	Monoamin-oxidáz	mitokondrium

Reakcióút	Enzim vagy reakció	Lokalizáció ^a
	Aldehyd-dehidrogenáz	mitokondrium, citoszol
	Alkohol-dehidrogenáz	citoszol
	Xantin-oxidáz	citoszol
Redukció	Azo-reduktáz	bélflóra, mikroszóma, citoszol
	Nitro-reduktáz	bélflóra, mikroszóma, citoszol
	Karbonil-reduktáz	citoszol
	Kinon-reduktáz	citoszol
Hidrolízis	Észteráz	mikroszóma, citoszol, lizoszóma
	Peptidáz	lizoszóma
	Epoxid-hidroláz	mikroszóma, citoszol

^aMagyarázat: a) A mikroszóma membránhoz kötött enzimaktivitást jelent, ahol a membrán jelentheti a sejtmembránt, vagy sejten belüli membránt; b) A citoszol a sejt citoszolban oldott enzimek aktivitását jelenti.

1.2.2 Fázis II átalakulások

A Fázis II reakciók jellegzetessége, hogy az eredeti, vagy már korábbi metabolikus transzformáció(k) során módosult szerkezetű vegyületek (metabolitok) a szervezet néhány kismolekulájával reagálva, a reagáló molekuláknál általában kevésbé lipofil (jobb vízoldékonyságú) és kevésbé toxikus konjugációs, addíciós vagy szubsztitúciós terméké alakulnak. A Fázis II átalakulások legfontosabb típusait, az átalakulásokat katalizáló enzimeket és az enzimek celluláris lokalizációját az I-2. táblázat foglalja össze.

I-2 táblázat. A fázis II. metabolikus átalakulások legfontosabb reakcióútjai és az azokat katalizáló enzimek fő szubcelluláris lokalizációi.

Reakcióút	Enzim	Lokalizáció ^a
Glükuronsav-konjugáció	UDP-glükuronil-transzferáz	mikroszóma
Szulfát-konjugáció	Szulfotranszferáz	citoszol
Glutation-konjugáció	GSH S-transzferáz	citoszol, mikroszóma
Aminosav-konjugáció	Acil-CoA: aminosav N-aciltranszferáz	citoszol, mitokondrium
Acetilezés	N-acetiltranszferáz	citoszol
Metiláció	Metiltranszferáz	citoszol, mikroszóma

^aMagyarázat: a) A mikroszóma membránhoz kötött enzimaktivitást jelent, ahol a membrán jelentheti a sejtmembránt, vagy sejten belüli membránt; b) A citoszol a sejt citoszolban oldott enzimek aktivitását jelenti.

I.3 Felszívódás, kiürülés

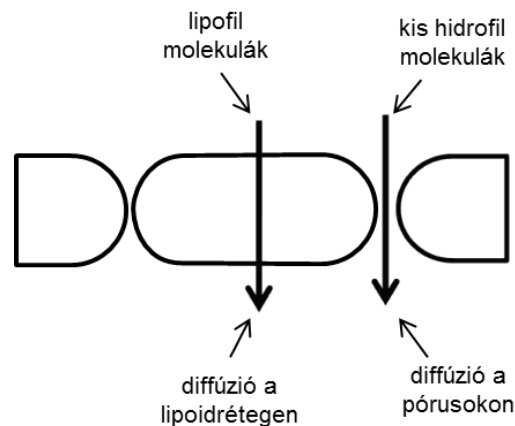
A szervezetbe kerülő testidegen anyagok felszívódásának és kiürülésének egyik legfontosabb eleme a vegyületek és/vagy metabolitjainak a különböző biológiai membránokon történő átjutása. A testidegen anyagok különböző biológiai membránokon történő átjutásának legfontosabb útjai az (a) *egyszerű diffúzió* és a (b) *membrán-mediált* transzport mechanizmusok.

1. Egyszerű diffúzió

Az egyszerű diffúzió két fő típusa az

- (a) átjutás a vizes pórusokon, (*paracelluláris* út), valamint a
- (b) beoldódás a lipidréttegbe (*transzcelluláris* út) (I-4. ábra).

I-4. ábra: Testidegen anyagok egyszerű diffúziójának típusai.



Az ún. *paracelluláris* diffúziós út elsősorban kisméretű és hidrofil karakterű molekulák előtt áll nyitva, a szoros sejtkapcsolatokon („tight-junction”) keresztül valósul meg. A maximális molekulaméret, ahol még a paracelluláris diffúziós folyamattal számolni lehet, az közelítőleg 250 Da.

A *transzcelluláris* transzport sebességét alapvetően a transzportált anyag lipoldékonysága határozza meg.

Mindkét folyamat a koncentráció gradiens irányába játszódik le; az anyag a nagyobb koncentrációjú oldal felől a kisebb koncentrációjú oldal felé áramlik. A testidegen anyagok felszívódásának leggyakoribb formája az egyszerű transzcelluláris diffúzió.

2. Membrán-mediált transzport

A membrán-mediált transzportfolyamatok során a membrán valamely összetevője specifikus kölcsönhatásba lép a transzportálandó anyaggal. A membrán-mediált transzport legfontosabb jellemzői a következők:

- (1) A folyamat specifikus a transzportálandó anyagra; rokon vegyületek és sztereoisomerek között különbséget tud tenni.
- (2) A hasonló szerkezetű anyagok egymás transzportját befolyásolják; leggyakrabban a szállítóhelyekért (kötőhelyekért) történő vetélkedés miatt gátolják.
- (3) A transzport telítődést mutat; a szállító kapacitás meghatározott maximummal rendelkezik.
- (4) A transzport többé-kevésbé specifikusan gátolható.

- (5) A folyamat aktiválási energiája és pH-függése az enzimreakciókhoz hasonló sajátosságokat mutat.

A membrán-mediált transzportnak két fontos típusát ismerjük

A *passzív transzport*, vagy más néven *könnyített diffúzió* során a transzport fehérje külső energiát nem használ, ezért nettó anyagtranszport csak addig történik, amíg a transzport hajtóereje (koncentráció különbség) meg nem szűnik.

Az *aktív transzport*, ami során a membránon átfolyó anyagáramlás a koncentráció (illetve elektrokémiai) gradienssel szemben folyik. A folyamatot mindig *karrier fehérjék* katalizálják. Az aktív transzportban a transzportfehérje meghatározott irányba pumpálja a molekulákat, mert szigorúan kapcsolt valamilyen energiaforrással (ATP hidrolízis, fény vagy iongradiens). E csoportba sorolhatók a *membránáthelyeződéssel járó transzport-folyamatok is*, melyek két fő formája az (a) *endocitózis* (fagocitózis és pinocitózis), valamint a (b) *exocitózis*.

A gyógyszerek (testidegen anyagok) *kiürülése* az a folyamat, amelynek során a gyógyszerek és/vagy metabolitjaik teljes mértékben távoznak a szervezetből és ezáltal hatásuk véglegesen megszűnik. A kiürülés során a gyógyszernek (metabolitjainak) ugyanúgy biológiai membránokon kell áthaladniuk, mint a felszívódás során, de itt a legfontosabb az aktív transzport folyamata.

A gyógyszerek eliminációja a (a) *vesén* keresztül, a (b) *epén* keresztül, a széklettel, a (c) *tüdőn* keresztül és (d) *egyéb szekrétumokkal* (pl. verejtékmirigyeken keresztül, anyatejjel).

(a) A kiválasztás szempontjából a vese a legjelentősebb szerv. A *vesén keresztül történő kiürülést* három tényező határozza meg.

- (1) A *glomerulusfiltráció* (GFR) során a glomeruluskapillárisok a vizet és a benne oldott kis molekulákat a vesetubulusokba filtrálják. A glomerulusfolyadékban a gyógyszerek koncentrációja megegyezik a plazma gyógyszer-szintjével. A polaritás gátolja a filtrációt, főleg a teljes negatív töltéssel rendelkező anionok filtrálódnak nehezebben.
- (2) Az *aktív tubuláris szekréció* számos gyógyszer (pl. bázisok, savak) számára biztosítja a kiválasztódást a proximális tubulusok lumenjébe. Ezen az úton választódnak ki a vízdékony, ionizált glükuronsav- és szulfát-konjugátumok is. Az aktív tubuláris szekréció anion- és kationtranszportja egymástól jól elkülöníthető folyamatok. Mindkettő ATP-igényes, kapacitásuk telíthető. Jellemző, hogy a szubsztrátok vetélkednek egymással a kiürülés során, emiatt gátolják egymás aktív szekrécióját.
- (3) A *passzív reabszorpció* vagy passzív tubuláris redisztribúció során a lipoidoldékony, nem ionizált gyógyszerek a passzív diffúzió révén a vérbe visszaáramolhatnak.
- (4) A proximális tubulussejtek tubulus felőli membránja *aktív tubuláris reabszorpcióra* képes. Az aktív tubuláris reabszorpció a kiválasztást befolyásoló negyedik tényezőnek is tekinthető. Fő szerepe az endogén anyagoknak (cukrok, aminosavak, húgysav, ionok) a tubulusokból koncentrációgradiens ellenében történő visszavétele.

(b) A vesén keresztül történő kiválasztódás mellett megemlítendő a gyógyszerek és metabolitjaik *epével történő kiválasztódása*. Naponta kb. 1 liter epe ürül a patkóbélbe. A gyógyszerek nagy része a *vena portae* rendszeren keresztül bejut a májba, majd karrier-mediált transzportot illetve passzív diffúzió révén bejutnak a májsejtekbe, ahol metabolizálódnak. A májsejtekből az 1000 daltonnál kisebb molekulák az epével együtt a duodénumba juthatnak. A duodenum tartalma végighalad a tápcsatornában. Eközben néhány, a szervezet számára fontos anyag (epesavak, D₃-, B₁₂-vitamin, folsav, szteroidok) visszaszívódik, az egyéb vegyületek pedig a széklettel ürülnek. Olyan gyógyszerek, amelyek serkentik az epe ürülését (spironolakton, fenobarbitál), fokozzák a gyógyszerek kiürülését is.

(c) A *tüdőn keresztül* is végbemehet a gyógyszerek, főként a gázok és más illékony anyagok, valamint az alkohol kiválasztódása. A tüdőben nem érvényesülnek fajlagos transzportmechanizmusok, mindössze az alveoláris levegőben levő parciális nyomás határozza meg, hogy egy anyag a levegőből a vérbe vagy a vérből a levegőbe jut. Tehát a folyamat a passzív diffúzió szabályai szerint megy végbe. A tüdőn keresztüli elimináció sajátosságai közé tartozik, hogy (a) a gázok változatlan állapotban ürülnek, (b) az elimináció arányos a légzési frekvenciával és (c) a tüdőkeringés erősségével. Ha egy gáz rosszul oldódik a vérben (pld: dinitrogén-oxid), a tüdőn keresztül átfolyó vér gyakorlatilag teljesen megtisztul tőle. Ha egy anyag jól oldódik a vérben, a tüdőn keresztül való ürülése lassú és elhúzódó, mint pl. az alkohol esetében.

(d) Egyes gyógyszerek vagy metabolitjaik kiválasztódhatnak a *verejtékmirigyek és a tejmirigyek exkrétumai* által. A kiválasztódás módja passzív diffúzió. A kiválasztás szempontjából fontos a vér és az exkrétum közötti pH különbség. A lipoidoldékony, vérben nem ionizált molekulák anyatejbe történő passzív diffúziója nagyon intenzív. A vegyületek szérumfehérjékhez történő kötődése gátolja az anyatejbe történő kiválasztódásukat.

I.4 Irodalom

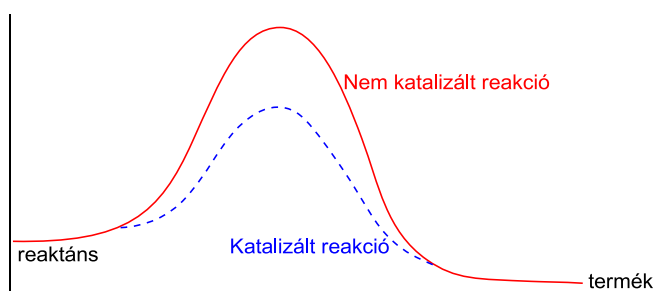
- Guba F.: Orvosi biokémia. Medicina Könyvkiadó, Budapest (1988)
- Smith and Williams' Introduction to the Principles of Drug Design and Action. (Editor: Smith H.J.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam (1998)
- Ádám V., Dux L., Faragó A., Fésüs L., Machovich R., Mandl J., Sümegi B.: Orvosi biokémia. Medicina Kiadó, Budapest (2001)
- A farmakológia alapjai. Szerk.: Gyires K., Fürst Zs. Medicina Kiadó, Budapest (2001).
- Humán farmakológia. Szerk. Vizi E. Sz. Medicina Kiadó, Budapest (2002)
- Gergely P., Erdődi F., Vereb Gy.: Általános és bioszervetlen kémia. Szerk.: Gergely P. Semmelweis Kiadó, Budapest (2003)
- Gyógyszerészi kémia. Szerk.: Fülöp F., Noszál B., Szász Gy., Takácsné Novák K. Semmelweis Kiadó, Budapest (2010)
- A gyógyszerkutatókémia. Szerk. Keserű Gy. M. Akadémiai Kiadó, Budapest (2011)
- Gyógyszerek. Szerk. Faigl F. Elektronikus tankönyv. BME, Budapest (2011)
- Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., Zito S.W.: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2013)
- Perjési P.: Gyógyszermetabolizmus és gyógyszer toxicitás. Elektronikus tananyag. PTE, Pécs (2014)

II Enzimkatalizált reakciók mechanizmusa I. Mechanizmus, reakciókinetika

Ha egy reakció aktiválási energiája nagy, a szobahőmérsékleten lejátszódó ütközések csak igen kis hányada vezet reakcióra. A reakciósebességet nagymértékben növelik egyes adalékanyagok, az ún. *katalizátorok*. A katalizátorok részt vesznek a reakcióban, közbeeső, átmeneti terméket képeznek, majd visszaképződnek és a végtermék mellett eredeti alakjukban és mennyiségben megtalálhatók.

A katalizátor hatása elsősorban azzal magyarázható, hogy csökkenti a reakció aktiválási energiáját (az aktivációs gát magasságát) (II-1. ábra). Az enzimek a szervezet biokatalizátorai. Az enzimek működésére –mint mint minden más katalizátor hatására – alapvetően az jellemző, hogy anélkül, hogy a folyamat szabadenergia-változását (illetve egyensúlyi reakciók esetén az egyensúlyi állandó számszerű értékét – befolyásolnák, jelentősen csökkentik az aktiválási energiát. Ennek eredményképpen adott hőmérsékleten a reakció sebessége megnő. A reakció lejátszódásához, vagy az egyensúlyi állapot eléréséhez szükséges idő megrövidül.

II-1. ábra: Katalizált és nem-katalizált reakciók energiaprofilja.



A szerves katalizátorokhoz viszonyítva az enzimek jelentős mértékben csökkentik az aktiválási energiát. Így enzimek jelenlétében a kémiai reakciók sebessége nagyságrendekkel megnövekszik. Az enzimkutatások modern korának kezdetét *J. B. Sumner* munkásságától számíthatjuk, akinek először sikerült tisztított *ureáz* enzimet kristályosítani (1926). *Sumner* megállapította, hogy az enzim fehérje természetű vegyület.

Az azóta eltelt időben megismert enzimek legtöbbször beigazolódtak, hogy azok egyszerű, vagy összetett fehérjék. (Néhány RNS molekula is rendelkezik enzimaktivitással, de az RNS-enzimek túlmutatnak e tananyag keretein.) Az enzimek fehérje-természetéből következik, hogy minden a fehérjékre jellemző fizikai-kémiai sajátosság jellemző az enzimekre is. Így a szerkezeti, térszerkezeti felépítés, a makromolekulákra jellemző fizikai-kémiai tulajdonságok, a környezettől függő konformáció mind fontos szerepet játszanak az enzimek katalitikus funkciójának megvalósulásában.

Egyes enzimek funkciójához elegendő csupán egy fehérjemolekula, más enzimek működéséhez azonban nem-fehérje természetű molekulák is szükségesek. Ezeket a vegyületeket *kofaktoroknak* nevezzük. A kofaktorok lehetnek (a) proszterikus csoportok, (b) koenzimek és (c) fémionok. A *proszterikus csoportok* szerves molekulák vagy fémionok, amelyek kovalens vagy koordinatív kötással, irreverzibilisen kapcsolódnak az enzimhez. A *koenzimek* az enzimhez reverzibilisen (nem-kovalens

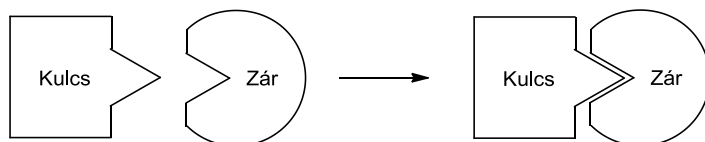
kötéssel) kötődő, az enzim méretéhez képes kis szerves molekulák, amelyek az enzim aktív részét képezik. Az enzimhez koordinatív kötésekkel kötődő fémionokat tartalmazó enzimeket *metalloenzimek*nek nevezik. A katalitikusan aktív enzim-kofaktor komplexet (összetett fehérjét) *holoenzim*nek, míg a kofaktortól megfosztott (katalitikusan inaktív) fehérjét *apoenzim*nek nevezzük.

II.1 Az enzimkatalízis mechanizmusa

Az enzimek által katalizált reakciókban az enzim, vagy enzim kofaktor komplex kapcsolódik az ún. *szubsztrát* molekulához, melynek szerkezetében csupán néhány atomot érintő változás játszódik le. A szubsztrát és a kofaktor molekuláihoz viszonylag nagyméretű enzimfehérjének csak egy kis szegmense vesz részt a kapcsolat kialakításában. A szubsztrát megkötésében szerepet játszó szegmens az enzim ún. *aktív centruma*. Az aktív centrum részt vesz a szubsztrát megkötésében és a lejátszódó reakció katalizálásában. Az aktív centrum e két funkciójához kapcsolódó szakasza (kötőhely és katalitikus hely) általában nem ugyanaz. A kötőhely szerkezete határozza meg, hogy milyen szerkezetű vegyületek képesek megkötődni az enzim molekulán (szubsztrát-specifitás), míg a katalitikus hely szerkezete a katalizált reakció típusát határozza meg. Az aktív centrum atomcsoportjainak térbeli elrendeződése (a molekula konformációja) határozza meg a szubsztrát megkötésének specifikusságát.

Az enzim és a szubsztrát közötti kötődés első értelmezése *E. Fischer* nevéhez fűződik. *Fischer* az enzimfehérje és a szubsztrát között kialakuló kapcsolatot úgy fogalmazta meg, hogy szubsztrát úgy illeszkedik az enzim aktív centrumához, mint kulcs a zárba (II-2. ábra).

II-2. ábra: Az enzim-szubsztrát kötődés *Fischer*-féle kulcs-zár modellje.



Az alapjaiban helytálló, leegyszerűsített leírás mind a fehérje mind a szubsztrát molekulákat rögzített szerkezetű háromdimenziós elrendeződéseknek tekinti. Későbbi vizsgálatok eredményei igazolták, hogy a molekulák flexibilis képződmények és a molekuláris környezettől függően azok többféle konformációt vehetnek fel. Ennek ismeretében a fehérjék (enzimek, receptorok) és a szubsztrát molekulák kapcsolódásának újabb elméletei kerültek kimunkálásra.

Az enzimek aktív centruma háromdimenziós szerkezetének megváltozása befolyásolja az enzimek működését. Az enzimek aktivitását befolyásoló tényezők megemlítendők a

1. hőmérséklet
2. pH
3. fémionok
4. koenzimek
5. allosztérikus modulátorok.

Az enzimek legtöbbje – a hidrolázok kivételével – összetett fehérje. Az összetett fehérjékben jelen lévő fémionok és koenzimek (összefoglaló néven kofaktorok)

elengedhetetlen szerepet töltenek be a katalitikus reakciók folyamatában. A maximális aktivitáshoz a kofaktorok sztöchiometrikus jelenlétére is szükség van.

A koenzimek általában másodlagos kölcsönhatásokkal (ritkábban kovalens kötéssel) kapcsolódnak az enzimek aktív centrumához. A koenzimek közvetlenül részt vesznek a katalitikus folyamatokban és megszabják a reakciók jellegét. A legtöbb vitamin valamilyen koenzim tulajdonsággal bíró molekula előanyagának tekinthető.

A fémionok hatása az enzimek aktivitására többféle kölcsönhatás eredménye lehet. Vannak enzimek (ún. *metalloenzimek*), melyekben a fémionok koordinatív kötésekkel kapcsolódnak az enzim aktív centrumához. Az ide tartozó enzimek közül többek között megemlíthetők a citokróm P-450 (vasionok), a xantin-oxidáz és a tirozináz (rézionok), valamint a karboxipeptidáz és a szénsav-anhidratáz (cinkion) enzimek. Más enzimek esetén (pl. pepszin) egyes fémionok (pl. alumíniumion) ún. miliófaktorként megnövelik az enzim aktivitását (enzimek fémion-aktiválása.) Ugyanakkor, egyes fémionok – irreverzibilisen megváltoztatva az enzim aktív centrumának konformációját – az enzim inaktiválódását eredményezik. Így például, a szénsav-anhidratáz enzimben a cinkiont rézionok vagy kadmiumionok kiszoríthatják a komplexből, így csökkentve (megszüntetve) az enzim aktivitását.

II.2 Az enzimek csoportosítása

Az enzimeket a Nemzetközi Biokémiai Unió erre a feladatra kijelölt bizottsága (Enzyme Commission, E.C.) az enzimek által katalizált reakciók típusai alapján hat osztályba sorolta:

E.C.1. Oxidoreduktázok.

Az oxidoreduktázok olyan enzimek, amelyek hidrogénatom- vagy elektronátvitelt, ritkábban oxigénatom-bevitelt katalizálnak. A gyógyszerek, testidegen anyagok metabolikus átalakítási reakcióit katalizáló enzimek közül ide tartoznak például a citokróm P-450 (CYP) és a flavin monooxigenáz (FMO) enzimek.

E.C.2. Transzferázok

A transzferázok funkcionális csoportokat visznek át egyik szubsztrátról a másikra (vagy ugyanazon szubsztrát egyik csoportjáról a másikra). Testidegen anyagok átalakítási reakcióit katalizáló enzimek közül ide tartoznak például az aciltranszferázok, a szulfotranszferázok, és a metiltranszferázok. A sejt fiziológiás folyamataiban résztvevő enzimek közül e csoport tagjai a foszfortranszferázok és az aminoszulfotranszferázok.

E.C.3. Hidrolázok

A hidrolázok víz közreműködésével különböző kovalens kötésekkel hasítanak. A kötésspecifitásuk alapján különböző csoportokba sorolhatók. Így külön csoportot képeznek az észtereket, a glikozidokat, a peptideket, a nem-protein savamidokat, a savanhidrideket, stb. hasító enzimek.

E.C.4. Liázok

A liázok kismolekulák (pl. víz, ammónia, széndioxid) eliminációját vagy a molekulák kettős kötésére történő addícióját katalizálják. Az eliminációs folyamatok eredményeképpen kettős kötés alakul ki, az addíciós reakciókban kettős kötés szűnik meg a szubsztrát molekulákban. Az ide tartozó enzimek osztályozásának alapja a

reakciókban képződő vagy megszűnő kettős kötés természete (pl. szén-szén, szén-nitrogén, szén-oxigén) alapján történik. A liázok egy különleges csoportját képezik a vízmolekulát hasító enzimek, a hidrolázok. A liázok esetében is gyakran használjuk a triviális enzimneveket, így a szubsztrát nevéhez fűzött dekarboxiláz, dehidratáz, aldoláz elnevezéseket.

E.C.5. Izomerázok

Az izomerázok molekulán belüli szerkezetváltozást katalizálnak, melyek során a szubsztrát molekulák elemi összetétele nem változik meg. Osztályba sorolásuk alapját a katalizált reakciók típusa képezi. Így az ide tartozó enzimek között megtalálhatók racemázok és epimerázok, *cisz-transz*-izomerázok, intramolekuláris transzferázok, stb. Az izomerázok egyik, a gyógyszerhatások szempontjából kiemelkedő jelentőségű képviselői a kevésbé hatékony (R)-arilpropionsav származékok hatékonyabb (S)-konfigurációjú származékokká történő epimerizációját katalizáló enzimek.

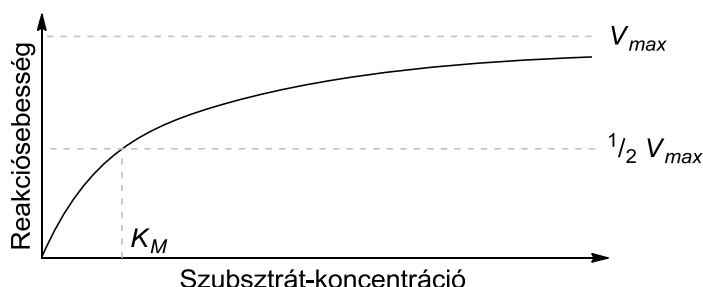
E.C. 6. Ligázok

A ligázok két szubsztrátmolekula kovalens kötéssel történő összekapcsolódását katalizálják. Az energiaigényes folyamatokat minden esetben ATP vagy más makroerg nukleozid-trifoszfát vagy –difoszfát egyik pirofoszfát kötésének hidrolízise kíséri (különbség a liázoktól). A ligázok a sejtekben folyó anyagcsere folyamatok kulcsenzimeik: minden energiát igénylő szintézis katalízisében részt vesznek.

II.3 Az enzimreakciók kinetikája

Azt a ma már általánosan elfogadott elméletet, amely szerint az enzimkatalízis lényege, hogy az enzim a kémiai reakcióban résztvevő anyagokkal köztiterméket, ún. enzim-szubsztrát komplexet, képez először *L. Michaelis és M. Menten* fogalmazta meg a szacharóz invertáz enzim által katalizált hidrolízisének vizsgálata során (1913). Vizsgálataik során megállapították, hogy a katalizált reakció sebessége (v) állandó körülmények (enzim-koncentráció, hőmérséklet, pH, ionerősség) esetén a szubsztrát-koncentráció $[S]$ függvényében telítési görbét ad: kis szubsztrát-koncentrációk esetén csaknem lineárisan változik, míg kellően nagy szubsztrát-koncentrációk esetén csaknem állandó értéken marad (II-3. ábra).

II-3. ábra. Enzimkatalizált reakció sebességének (v) változása a szubsztrát-koncentráció $[S]$ függvényében. (v_{max} : maximális sebesség, K_M : Michaelis-Menten állandó).



Megemlítendő, hogy a tapasztalat igen hasonló a receptor agonista koncentráció és a mérhető biológiai aktivitás közötti összefüggés vizsgálata során tapasztaltakkal. A folyamat - kismolekulák kötődése (adszorpciója) makromolekulák (fémek) felületéhez -

első értelmezését és matematikai leírását *I. Langmuir* írta le gázok szilárd felületen történő adszorpciójának vizsgálata során (1918). Az ún. *Langmuir-izoterma* biokémiai és farmakológiai megfelelőjét *Hill-egyenlet*ként ismeri szakirodalom.

Michaelis és *Menten* szerint az enzimkatalizált reakciók kinetikáját az alábbi egyenlet írja le:



ahol E az enzim

S a szubsztrát

ES az enzim-szubsztrát komplex

P a termék

k_1 az enzim-szubsztrát komplex képződésének sebességi állandója

k_2 az enzim-szubsztrát komplex disszociációjának képződési állandója

k_3 a termék képződésének sebességi állandója

A fentiek alapján a katalizált reakció sebessége a

$$v = k_3 [ES] \quad (2)$$

míg az ES komplex képződése és disszociációja a

$$v_k = k_1 [[E] [S]] \quad (3)$$

$$v_d = k_2 [ES] \quad (4)$$

sebességi egyenletekkel írható le.

Egy adott $[E_t]$ enzim-koncentráció mellett az enzim molekulák egy része szabad enzimmént $[E]$, más része enzim-szubsztrát komplexként $[ES]$ van jelen:

$$[E_t] = [E] + [ES] \quad (5)$$

A reakciót katalizáló enzim akkor működik maximális sebességgel (v_{max}), ha az összes enzim molekula (E_t) enzim-szubsztrát komplex formájában van jelen. Ilyenkor $[ES] = [E_t]$ és a katalizált reakció maximális sebessége:

$$v_{max} = k_3 [E_t] \quad (6)$$

A fenti egyenletekből belátható, hogy adott szubsztrát-koncentráció esetén a reakció kezdeti sebessége (v) (amikor még $[P]$ kicsi és az $(ES) \rightarrow (E) + (P)$ folyamat egyirányúnak tekinthető) úgy aránylik a maximális sebességhez (v_{max}), ahogy az adott szubsztrát-koncentrációnál kialakuló enzim-szubsztrát komplex koncentrációja $[ES]$ aránylik az összes enzim molekula (E_t) koncentrációjához:

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{[ES]}{[E_t]}$$

Amint az (1) egyenletből látható az [ES] attól függ, hogy hogyan aránylik egymáshoz az ES képződésének és továbbalakulásának a sebessége:

$$(ES) \text{ képződésének a sebessége} = k_1 [E] [S] \quad (8)$$

$$(ES) \text{ továbbalakulásának a sebessége} = k_2 [ES] + k_3 [ES] = (k_2+k_3) [ES] \quad (9)$$

A reakció megindulását követően igen gyorsan beáll a stacionárius („Steady state”) állapot, melyre az jellemző, hogy az (ES) komplex képződésének és továbbalakulásának sebessége meggyezik:

$$k_1 [E] [S] = (k_2+k_3) [ES] \quad (10)$$

Így, a (10) egyenlet átrendezésével:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2 + k_3)/k_1}$$

A $(k_2+k_3)/(k_1)$ összefüggésből adódó érték egy állandó érték, melyet *Michaelis-konstans*nak (K_M) nevezünk:

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

A K_M konstans bevezetésével az

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M}$$

összefüggést kapjuk.

Az (5) egyenletet figyelembe véve:

$$[E_t] = \frac{[E][S]}{K_M} + [E]$$

Az [ES] és az [E_t] kifejezett értékeit behelyettesítve a (7) egyenletbe, majd a lehetséges egyszerűsítéseket elvégezve a

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{\frac{[S][E]}{K_M}}{\left[\frac{[S][E]}{K_M} + [E]\right]} = \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

kifejezéshez jutunk. Ez utóbbi egyenlet átrendezésével a *Michaelis-Menten egyenlet szokásos formáját* kapjuk meg:

$$v = \frac{v_{max} [S]}{[S] + K_M}$$

Ez a kifejezés írja le az II-3. ábrán bemutatott, tapasztalati összefüggést az enzimkatalizált reakció sebessége (v) és a szubsztrát-koncentráció ($[S]$) között. Kis szubsztrát-koncentrációnál, amikor $[S]$ sokkal kisebb, mint a K_M , akkor $v = [S] v_{max}/K_M$, azaz a sebesség egyenesen arányos a szubsztrát-koncentrációval. Nagy szubsztrát-koncentrációnál, amikor $[S]$ sokkal nagyobb, mint a K_M , $v = v_{max}$, azaz a maximális sebesség független a szubsztrát-koncentrációtól.

Amennyiben a reakció sebessége éppen fele a maximális sebességnek, vagyis $v = 0,5 v_{max}$:

$$0,5 v_{max} = \frac{v_{max} [S]}{[S] + K_M}$$

azaz

$$[S] + K_M = 2 [S]$$

illetve

$$K_M = [S]$$

A *Michaelis-állandó* tehát számértékileg egyenlő azzal a szubsztrát-koncentrációval, amely mellett egy adott enzimmennyiség az általa elérhető maximális reakciósebesség felét éri el. Nagy K_M gyenge, kis K_M erős kölcsönhatást jelez az enzim és a szubsztrát között.

Megjegyezendő, hogy az enzimkinetikának ez az összefoglalása a legegyszerűbb reakciókra érvényes, melyekben az enzim egyetlen szubsztráttal lép reakcióba és katalizálja a kémiai átalakulást. Reálisan a szervezetben lejátszódó reakciók ennél összetettebbek, de elvileg hasonlóképpen mennek végbe.

II.4 Irodalom

- Guba F.: Orvosi biokémia. Medicina Könyvkiadó, Budapest (1988)
- Smith and Williams' Introduction to the Principles of Drug Design and Action. (Editor: Smith H.J.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam (1998)
- Ádám V., Dux L., Faragó A., Fésüs L., Machovich R., Mandl J., Sümegi B.: Orvosi biokémia. Medicina Kiadó, Budapest (2001)
- Atkins P.W.: Fizikai kémia I-III. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2002)
- Humán farmakológia. Szerk.: Vizi E. Sz. Medicina Könyvkiadó, Budapest (2002)
- Gyógyszerészi kémia. Szerk.: Fülöp F., Noszál B., Szász Gy., Takácsné Novák K. Semmelweis Kiadó, Budapest (2010)
- A farmakológia alapjai. Szerk.: Gyires K., Fürst Zs. Medicina Kiadó, Budapest (2001).
- Gyógyszerek. Szerk. Faigl F. Elektronikus tankönyv. BME, Budapest (2011)
- Nyitrai L., Pál G.: A biokémia és molekuláris biológia alapjai. Elektronikus tankönyv. ELTE, Budapest (2013)
- Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., Zito S.W.: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2013)

III A sztereokémia alapjai

A szénvegyületek nagy száma többek között az egymással kapcsoló szénatomok hosszú láncokká és gyűrűvé kapcsolódása, valamint a szénatomok és azok szubsztituensei térbeli elrendeződésének nagy változatosságára vezethető vissza. Ezért az összegképlet, ami a legtöbb szeretlen vegyület esetén egyidejűleg definiálja a kovalens szerkezetet, a szerves vegyületek körében többnyire nem egyetlen szerkezetnek feleltethető meg. Ezért a szerves molekulák (tér)szerkezetének jellemzése szempontjából lényeges definiálni az *izoméria* fogalmát és megismerni az izomerek (tér)szerkezetei közötti különbségeket.

A legáltalánosabban használt definíció szerint izomerek azok a vegyületek, melyek azonos összegképlettel, de különböző fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Az így definiált izomerek szimmetriatulajdonságaik alapján két nagy csoportba sorolhatók:

(1) Az egymással fedésbe nem hozható, nem-tükörképi vegyületek – *diasztereoizomerek*, valamint

(2) Az egymással fedésbe nem hozható, tükörképi párok – *enantiosztereoizomerek*.

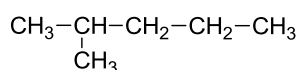
III.1 Diasztereoizomerek

A diasztereoizomerek – nem-tükörképi, egymással fedésbe nem hozható szerkezetek – szerkezeti különbözőségeik és/vagy fizikai-kémiai tulajdonságaikban megfigyelhető különbözőségeik alapján több csoportba sorolhatók. Ezek közül a szerves kismolekulák (a jelenleg forgalomban lévő hatóanyagok legnagyobb része ebbe a csoportba tartozik) között a legfontosabb csoportok a (a) *szerkezeti izomerek*, a (b) *geometriai izomerek* és az (c) *optikai izomerek*.

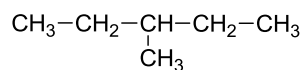
III.1.1 Szerkezeti izomerek

A szerkezeti vagy (struktúr) izomerek azok a vegyületek, amelyekben az azonos összegképlet mellett az alkotó atomok kapcsolódási sorrendje (*konstitúciója*) eltér. A szerkezeti izomerek gyakran különböző funkciós csoportokat tartalmaznak, ezáltal teljesen eltérő molekulák, vagyis jellemző kémiai (pl. reakciókészség), illetve fizikai-kémiai (pl. olvadáspont, forráspont, oldhatóság) tulajdonságaik semmilyen hasonlóságot nem mutatnak egymással. Szerkezeti izomerek pl. a 2-metil-pentán és a 3-metil-pentán, valamint az etanol és a dimetil-éter (III-1. ábra).

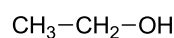
III-1. ábra. A 2-metil-pentán (1) és 3-metil-pentán (2), valamint az etanol (3) és dimetil-éter (4) szerkezete.



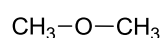
(1)



(2)



(3)

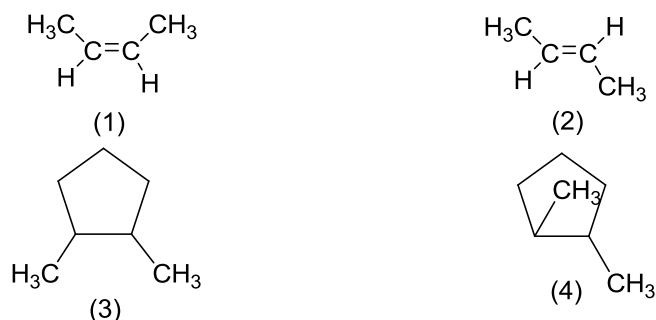


(4)

III.1.2 Geometriai izomerek

A geometriai izomerek azonos szerkezettel, de különböző térbeli elrendeződéssel bíró vegyületek. Kialakulásuk előfeltétele a molekulán belüli gátolt rotáció. Ez megtörténhet (a) szén-szén kettős kötés, vagy (b) kis gyűrűragszámú cikloalkánok körében. Geometriai izomerek pl. a (Z)-2-butén és (E)-2-butén, valamint a *cisz*-1,2-dimetil-ciklopentán és *transz*-1,2-dimetil-ciklopentán (III-2. ábra).

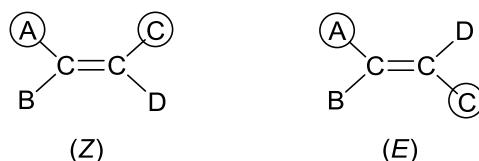
III-2. ábra. A (Z)-2-butén (1) és az (E)-2-butén (2), valamint a *cisz*-1,2-dimetil-ciklopentán (3) és *transz*-1,2-dimetil-ciklopentán (4) szerkezete



Mindkét szénatomján különbözőképpen szubsztituált szén-szén kettős kötésű vegyületek - vagy nem-geminálisan diszubsztituált cikloalkánok - esetén két különböző geometriai szerkezettel (konfigurációval) bíró vegyületek képződhetnek. Megkülönböztetésükre a szén-szén kettős kötésű vegyületek esetén a (Z)/(E), míg cikloalkán-származékok esetén a *cisz/transz* előtagot használjuk. A III-2. ábrán bemutatott vegyületpárok esetén azt a térszerkezeti formát, amelyben a két metilcsoport a sík azonos oldalára esik (tehát térbelileg is közelebb van egymáshoz) (Z)-(vagy *cisz*)-izomernek, a másik térszerkezeti formát, melyben a két metilcsoport ellentétes oldalon foglal helyet és így egymástól távolabb kerül, (E)- (vagy *transz*)-izomernek nevezzük. A geometriai izomerek fizikai állandói (olvadáspont, forráspont, oldhatóság, dipólusmomentum stb.) – a szerkezeti izomerekhez hasonlóan - eltérnek egymástól.

Összetettebb szerkezetű geometriai izomerek konfigurációjának jellemzését leíró szabályok nagy hasonlóságot mutatnak a centrális kiralitáscentrumok konfigurációjának jellemzésére alkalmazott *Cahn-Ingold-Prelog*-féle prefixumok megállapításnak szabályaihoz (lásd később). Így például, az aszimmetrikusan szubsztituált szén-szén kettős kötéssel bíró vegyületek esetén (lásd III-3. ábra), a geometriai izomerek közül a (Z) izomer esetén a két magasabb prioritással bíró szubsztituens („A” és „C”) a kötés azonos oldalán, míg az (E) izomer esetén a kötés ellentétes oldalán helyezkedik el. Hasonlóképpen történik a diszubsztituált cikloalkánok geometriai izomerjeinek megkülönböztetése is.

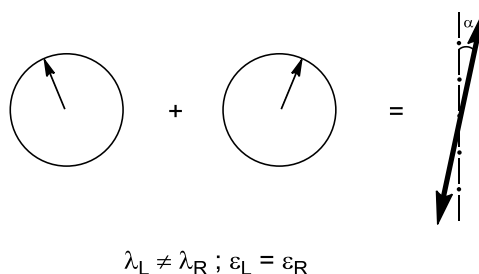
III-3. ábra. Az (E)- és a (Z)-diszubsztituált eténszármazékok szerkezete



III.1.3 Optikai izomerek

Az optikai izomerek nevüket onnan kapták, hogy akirális oldószerrel készült oldataik képesek a síkban (lineárisan) polarizált fény síkját elforgatni. Az optikai forgatóképesség (optikai rotáció) oka a vegyületek molekuláinak aszimmetrikus (királis) szerkezete. Amikor a lineárisan polarizált fény anyaggal lép kölcsönhatásba, úgy viselkedik, mint két azonos intenzitású, de ellentétes irányba, balra, ill. jobbra cirkulárisan polarizált fénysugár eredője. Az optikailag aktív anyag *törésmutatója* különbözik a kétféle cirkulárisan polarizált fénysugárra, ezért azon keresztülhaladva a két, kezdetben azonos fázisú hullám fázisa – az eltérő sebességük miatt - különbözni fog. Ez a mintán (közegen) áthaladt, a két cirkulárisan polarizált fénysugár eredőként előálló, síkban polarizált fény terjedési síkjának megváltozásához (az eredeti síkhoz képest vett α szögű elforduláshoz) vezet (III-4. ábra). Ez a változás – az *optikai forgatóképesség* - függ a fény hullámhosszától.

III-4. ábra. Optikai forgatóképesség

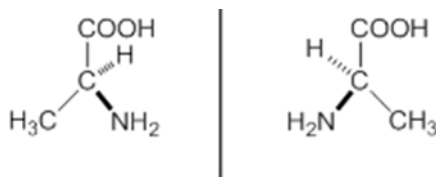


Az óramutató járásával megegyező irányú forgatóképességet (“jobbraforgató”) pozitívnak, míg az óramutató járásával ellentétes irányú forgatóképességet (“balraforgató”) negatívnak tekintjük, és (+), illetve (-) jellel jelöljük.

Az aszimmetrikus szerkezet leggyakrabban ún. aszimmetrikus (királis) szénatom jelenlétéhez kötődik. Bármely olyan (sp^3 hibridállapotú) szénatom amihez négy különböző atom vagy atomcsoport kapcsolódik *aszimmetrikus szénatom*. A szénatomon kívül más tetraéderez térszerkezettel bíró, négy különböző ligandumhoz kapcsolódó atom – például nitrogén-, kén-, foszforatom – is lehet aszimmetrikus szerkezetű. A ligandumoknak a centrális atom körüli elhelyezkedését az aszimmetriás atom *konfigurációjának* nevezzük.

Amennyiben *egy molekulában egyetlen királis atom* (aszimmetria centrum) található, úgy a molekula is aszimmetrikus (királis) és így annak két, egymással entiomereje létezik. Az *alanin* két enantiomerjét a III-5. ábra mutatja be.

III-5. ábra. Az alanin két enantiomerje



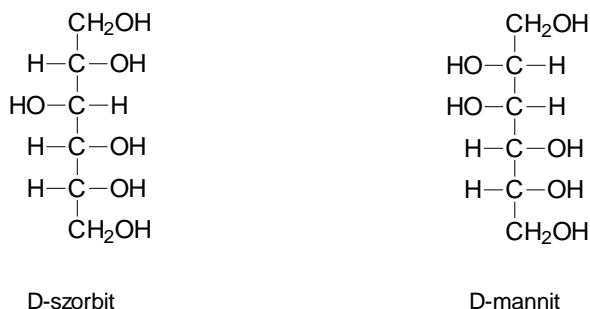
Amennyiben egy molekulán belül kettő, vagy annál több aszimmetriás atom (kiralitáscentrum) található, úgy a vegyületeket szimmetriatulajdonságainak összehasonlítása alapján két csoportba sorolhatjuk:

1.) Az összehasonlítandó vegyületek egyikében található aszimmetriás (királis) atomok konfigurációja a másik vegyületben rendre ellentétes (tükörképi). Ekkor a két vegyület *enantiosztereoizomer*.

2.) Az összehasonlítandó vegyületek egyikében található aszimmetriás (királis) atomok konfigurációja a másik vegyületben nem minden esetben ellentétes (tükörképi). Ekkor a két vegyület *diasztereoizomer*.

A *diasztereoimer optikai izomerek* egyik jól ismert példája a D-szorbit és a D-mannit izomériája. Mind a D-szorbit mind a D-mannit négy aszimmetriás szénatomot hordoz, melyek közül csak a C₂-atom konfigurációja ellentétes (tükörképi) a két molekulában (III-6. ábra). Azokat az optikailag aktív diasztereoizomereket, melyek csak egy kiralitáscentrum konfigurációjában különböznek egymástól, *epimerek*nek nevezzük. A D-(-)-szorbit és a D-(-)-mannit epimerek.

III-6. ábra. A D-szorbit és a D-mannit projektív képlete

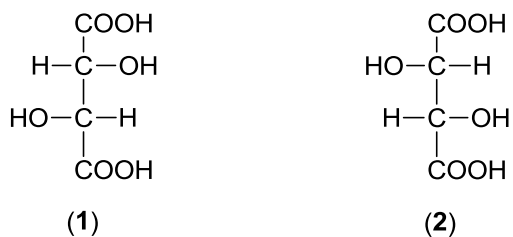


Az optikailag aktív diasztereoizomerek fizikai-kémiai tulajdonságai, benne foglalva az optikai aktivitás irányát és mértékét is – a szerkezeti és a geometriai izomerekhez hasonlóan – különbözöek. A fenti két példában mindkét vegyület kis mértékben „balrafordató”, de optikai aktivitásuk mértéke különböző.

A két asszimmetriás szénatomot tartalmazó vegyületek egyik speciális esetét képviseli a *borkősav izomerek* példája. A borkősav molekulában a 2 kiralitáscentrumhoz centrumonként ugyanaz a 4 egymástól különböző atom vagy atomcsoport kapcsolódik. Az ilyen kiralitáscentrumokat *azonos telítettségű kiralitáscentrumok*nak nevezzük.

Az enantiomer borkősavak (1 és 2) projektív képleteteit a III-7. ábra mutatja be.

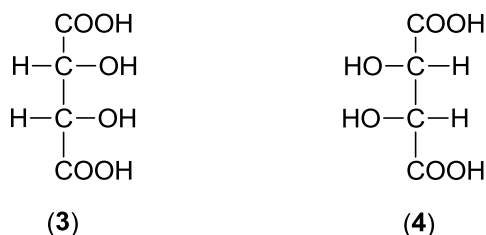
III-7. ábra. Az enantiomer borkősavak projektív képletetei



Ha a kiindulási szerkezet (képlet) (1) egyik aszimmetrikus szénatomjának konfigurációja megváltozik – a D-szorbit, D-mannit párhoz hasonlóan – egy új

diasztereomer (*epimer*) (3) képződik. A (3) borkósav izomernek – az előzőekhez hasonlóan - szintén felírható a tükörképi párja (4). Megállapítható azonban, hogy a (3) és (4) szerkezetek projekciós képletei – az előző enantiomer párok képleteivel ellentétben - a papír síkjában 180°-kal elforgatva egymással fedésbe hozhatók. Más szóval, a két szerkezet két, egymással megegyező (nem-izomer) szerkezet. A vegyületek belső szimmetriasíkkal rendelkeznek és ennek eredményeképpen optikailag inaktívak. Az optikailag inaktív borkósav izomer neve *mezo*-borkósav (III-8. ábra).

III-8. ábra. A *mezo*-borkósav projektív képlete (A tükörképi pár két szerkezete egymással megegyező)



A *borkósav* izomerek tanulmányozása alapján tehát megállapítható, hogy a két azonos telítettségű kiralitáscentrumot tartalmazó vegyületek esetében a kiralitáscentrumok konfigurációja vonatkozásában három sztereoizomer képzelhető el: egy enantiomer pár (III-7. ábra), valamint egy akirális módosulat (III-8. ábra).

III.2 Enantiosztereoisomerek

Az enantiosztereoisomer (röviden enantiomer) párok egymással fedésbe nem hozható tükörképi párok. Jellemző tulajdonságuk, hogy molekuláik aszimmetrikus (királis) szerkezetűek.

Az enantiosztereoisomer vegyületpárok minden mérhető fizikai-kémiai tulajdonsága (így például olvadáspontja, forráspontja, töréspontja, akirális oldószerben mérhető oldhatósága, stb.) megegyezik. Különbözőséget csak egy másik királis molekulával, vagy más korpuszkuláris tulajdonsággal is rendelkező részecskékkel (pl. síkban polározott fény) történő kölcsönhatásaik során mutatnak.

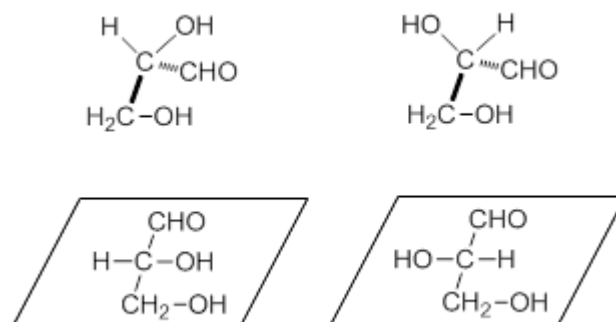
Azonos körülmények között (azonos oldószer, azonos koncentrációjú oldatok, azonos rétegvastagság, azonos hullámhosszú fény, azonos hőmérséklet) az egyik enantiomer ugyanolyan mértékben forogat óramutató járásával megegyező (+), mint a másik óramutató járásával ellentétes (-) irányba. A fentiek értelmében az optikai forogás mértéke függ az anyagi minőségtől, a rétegvastagságtól (küvetta úthossza) és az optikailag aktív anyag oldatának koncentrációjától, valamint a fény hullámhosszától. Az optikai forogóképesség irányát az enantiosztereoisomerek esetén is a diasztereomerekkel megegyező módon tüntetjük fel a vegyületek kémiai neve előtt.

Az endogén biomolekulák között egyetlen aszimmetrikus szénatommal rendelkező vegyületcsaládok az oldalláncban szubsztituált hidroxil- és aminokarbonsavak. E vegyületek esetében a szubsztituenst hordozó szénatom aszimmetrikus szénatomná válik, ezért két enantiomer struktúrával rendelkeznek.

Az alaninnál összetettebb szerkezetű enantiomereknek a III-5. ábrán bemutatott módon történő ábrázolása összetett rajztechnikai feladat. Ezért a gyakorlatban a háromdimenziós szerkezetek két dimenzióba vetített (ún. projekciós) képleteit használjuk. A vetítési szabályok (*Fischer-projekció*) részletes ismertetése a

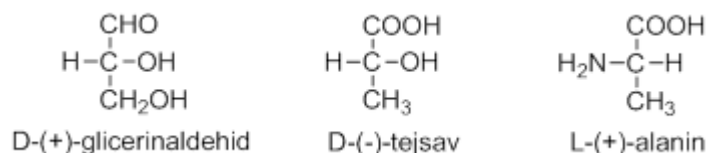
gyógyszerészi kémia tankönyvben (lásd irodalomjegyzék) megtalálható. Az aldózok legegyszerűbb képviselőjének tekinthető glicerin-aldehid két enantiomer szerkezete, valamint szabály szerinti kétdimenziós vetített képlete a következő (III-9. ábra):

III-9. ábra. A glicerin-aldehid enantiomerek *Fischer*-féle projekciós képletei

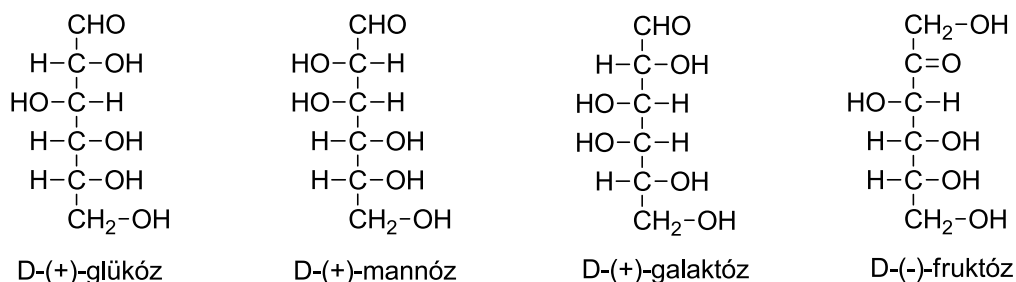


Az enantiomerek, illetve az enantiomerek aszimmetrikus szénatomja két tükörképi struktúrája konfigurációjának jellemzése leggyakrabban a jobbra forgató glicerin-aldehid aszimmetrikus szénatomjára történő visszavezetésen alapul, ún. *relatív konfigurációs előtaggal* történik. E konfiguráció alapján a jobbra forgató glicerin-aldehid aszimmetrikus szénatomjának konfigurációjára visszavezethető aszimmetrikus szénatomok (és egyidejűleg a monoszubsztituált karbonsavak) konfigurációját D-előtaggal, még az ellentétes (tükörképi) szerkezetre visszavezethető szénatomok (hidroxi- és aminokarbonsavak) konfigurációját L-előtaggal jelöljük. A *D-(+)-glicerin-aldehid*, a *D-(-)-tejsav* és az *L-(+)-alanin* projekciós képleteit, valamint konfigurációik és optikai forgatóképességeik irányát is feltüntető elnevezéseit a III-10. ábra mutatja be.

III-10. ábra. A *D-(+)-glicerin-aldehid*, a *D-(-)-tejsav* és az *L-(+)-alanin* projekciós képletei.



A tetrózokban, pentózokban, hexózokban és heptózokban – ahol egynél több aszimmetriás szénatom található a molekulában – az enantiomerek megkülönböztetése a formil-, illetve a ketocsoporttól legtávolabb eső aszimmetriás szénatom és a *D*-glicerin-aldehid konfigurációjának összehasonlítása és a forgatóképesség megadása alapján történik. A gyógyszerészi gyakorlatban előforduló hexózok vetített képlete és triviális neve a következő:



A szerves kémia fejlődésével a királis vegyületek száma rohamosan nőtt: egyre nehezebbé és mesterkétebbé vált a gliceraldehidre alapuló D,L konfiguráció-megjelölés alkalmazása. *R.S. Cahn, C.K. Ingold és V. Prelog* egy sokkal általánosabban alkalmazható konfigurációjelölést dolgoztak ki, ami röviden Cahn-Ingold-Prelog (C.I.P.) konvenciónak nevezünk.

A C.I.P. konvenció alkalmazása aszimmetriacentrummal rendelkező vegyületek esetében.

1.) Rangsoroljuk a kiralitáscentrumhoz kapcsolódó ligandumokat 1>2>3>4 csökkenő rang szerint. A rangsorolás szabályai:

a.) Nagyobb rendszámú elem és ezen belül a nagyobb tömegszámú izotóp nagyobb rangú. Legkisebb rangú a nemkötőelektronpár.

b.) Először a kiralitáscentrumhoz közvetlenül kapcsolódó atomokat kell rangsorolni. Ha itt nem találunk különbséget, az azonos rangú ligandumokhoz kapcsolódó további atomok alapján kell döntenet. Pl.: CH₂Br magasabb rangú, mint CH₂OH, és CH₂Br magasabb rangú, mint CCl₃.

c.) A ligandumok koordinációs számát mindig négyre egészítjük ki, így a kettőskötés duplán, a hármaskötés triplán számít: COOH > CHO > CH₂OH.

2.) Nézzük a molekulamodellt a kiralitáscentrum és a legkisebb rangú (4.) ligandum kötésirányának meghosszabbítása felől úgy, hogy az említett kötés a kiralitáscentrumtól távolabbi oldalára kerüljön.

3.) Amennyiben ebből a nézőpontból az 1,2,3 ligandumok körüljárása az óramutató járásával megegyező, a centrum konfigurációja „R”, ellentétes esetben „S”.

a.) (R)-konfigurációjú ligandum magasabb rangú, mint egy azonos szerkezetű (S)-konfigurációjú.

A D, L és az R, S prefixumok közötti kapcsolat bemutatása céljából a III-10. ábrán a fenti három vegyület aszimmetriás szénatomjai konfigurációjának jellemzésére használatos prefixumok összehasonlítása kerül bemutatásra.

IV Enzimkatalizált reakciók mechanizmusa I.

Oxidoreduktázok koenzimjei.

A legtöbb szerves molekula biokémiai oxidációs-redukciós átalakulása egy, vagy két, ritkán négy elektron átmenetével jár. Az élő rendszerekben a legáltalánosabb elektron-akceptor a molekuláris oxigén (O_2), aminek egyelektronos redukciója szuperoxid gyökiont ($O_2^{\cdot-}$), kételektronos redukciója peroxid aniont (O_2^{2-}), míg négyelektronos redukciója két oxidiont (O^{2-}) eredményez. A szubsztrát molekulákon elektronátadással, vagy elektronelvétellel lejátszódó reakciók lejátszódásához elektrondonor vagy elektronakceptor molekulák részvétele szükséges. Mivel ilyen tulajdonsággal bíró funkciós csoportok az aminosavak oldalláncaiban nem találhatóak, így az enzimkatalizált redox-reakciók lejátszódásához reverzibilis redoxrendszer tulajdonsággal bíró vegyületek szükségesek. Ezeket a vegyületeket *kofaktoroknak* nevezzük. A kofaktorok lehetnek (a) proszтетikus csoportok, (b) koenzimek és (c) fémionok. A *proszтетikus csoportok* szerves molekulák vagy fémionok, amelyek kovalens vagy koordinatív kötéssel, irreverzibilisen kapcsolódik az enzimhez. A *koenzimek* az enzimhez reverzibilisen (nem-kovalens kötéssel) kötődő, az enzim méretéhez képes kis szerves molekulák, amelyek az enzim aktív részét képezik. Az enzimhez koordinatív kötésekkel kötődő fémionokat tartalmazó enzimeket *metalloenzimeknek* nevezik.

Az oxidoreduktázok olyan enzimek, amelyek hidrogénatom- vagy elektronátvitelt és oxigénatom-bevitelt katalizálnak. Az oxidoreduktázok triviális nevét a könnyű áttekinthetőség érdekében az akceptor molekula alapján adják meg:

1.) Az *oxidázok* azok az oxidoreduktázok, amelyek által katalizált reakciókban az elektron akceptor a molekuláris oxigén (például: aminosav-oxidáz, citokróm-c oxidáz, glükóz-oxidáz).

2.) Az *oxigenázok* azok az oxidoreduktázok, amelyek a molekuláris oxigén egy (monooxigenázok) vagy mindkét (dioxigenázok) atomjának a szubsztrátba történő beépülését katalizálják (például citokróm P-450 (CYP), flavin-monooxigenáz (FMO) prosztaglandin- H_2 -szintáz (PGH₂)).

3.) A *dehidrogenázok* azok az oxidoreduktázok, melyek a szubsztrát oxidációját hidridionok molekuláris oxigéntől különböző elektron akceptorokra (például nikotinsavamid- vagy flavin-koenzimekre) történő transzferje útján katalizálják. (Például: alkohol-dehidrogenáz, aldehid-dehidrogenáz, acetaldehid-dehidrogenáz)

Az oxidoreduktáz enzimek katalitikus folyamatában résztvevő koenzimek a következők:

Nikotinsavamid-adenin-dinukleotid (foszfát) (NAD^+ és $NADP^+$)

Flavin-mononukleotid (FMN)

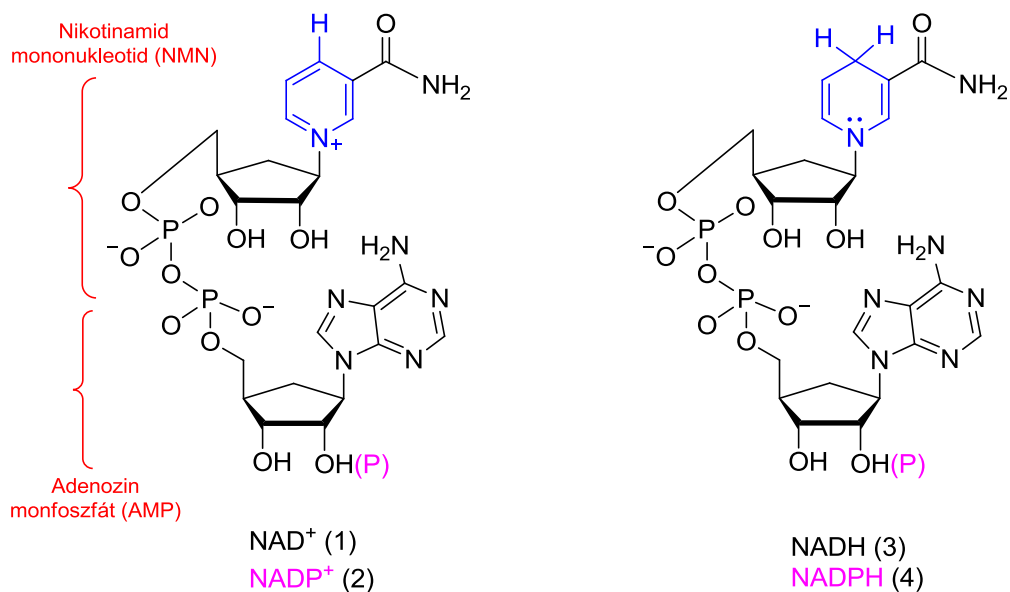
Flavin-adenin-dinukleotid (FAD)

Kinon szerkezeti elemet tartalmazó koenzimek

IV.1 Nikotinsavamid-koenzimek

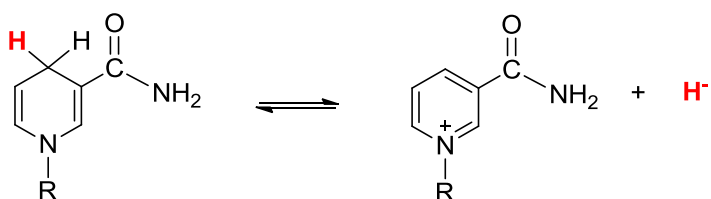
A nikotinsavamid koenzimek két képviselője a nikotinsavamid-adenin-dinukleotid (NAD^+), a nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát ($NADP^+$), valamint azok redukált származékai, a redukált nikotinsavamid-adenin-dinukleotid (NADH) és a redukált nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) (IV-1. ábra).

IV-1. ábra. A NAD^+ (1), a NADP^+ (2), valamint a NADH (3) és a NADPH (4) szerkezete.

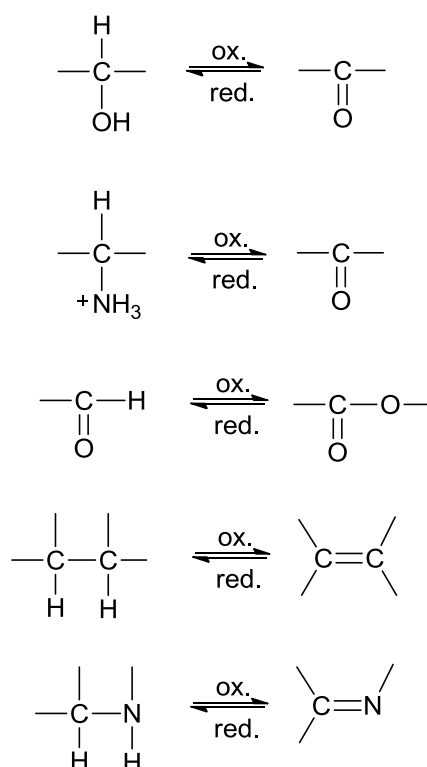


Bár a koenzimek nukleotid fragmense fontos szerepet játszik e vegyületeknek az apoenzimekhez történő nem-kovalens kötődésében, a molekulák reverzibilis redoxrendszerét a nikotinsavamid molekularész képviseli. A fenti koenzimben a nikotinsavamid piridingyűrűje képes arra, hogy hidridaniont adjon le, illetve kössön meg. Ez a gyűrű a koenzim redukált formájában (NADH) semleges, de diénszerű, míg oxidált formájában (NAD^+) aromás jellegű, de pozitív töltésű. A redukált forma egy hidridanion leadásával az oxidált formává, míg az oxidált molekula egy hidridanion felvételével a redukált formává tud alakulni. (IV-2. ábra). A NAD^+ és a NADP^+ funkciója ezért megegyezik, bár vannak enzimek, melyekhez az egyik vagy másik koenzim nagyobb affinitással kötődik.

IV-2. ábra. A $\text{NADPH} = \text{NAD(P)}^+$ reverzibilis redoxrendszer működésének elve



A koenzimek a szervezetben B_3 -vitaminból szintetizálódnak, mely bevitelének krónikus hiánya a *pellagra* nevű hiánybetegséget okozza. A $\text{NAD}^+/\text{NADPH}$ reverzibilis redoxrendszer potenciálja $-0,32 \text{ V}$, ami a következő fontosabb kémiai átalakulások katalízisét teszi lehetővé (IV-3. ábra).

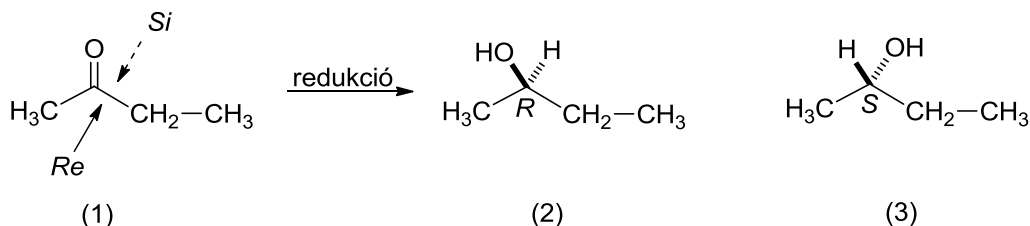
IV-3. ábra. A nikotinsavamid-koenzimek által katalizált fontosabb kémiai átalakulások


Amint a reakciók rövid leírásából is látható, számos esetben a redukációs folyamat egy új aszimmetriás szénatom kialakulásával jár (pl. karbonilcsoport redukciója szekunder alkohollá, szén-szén kettős kötés redukciója szén-szén egyes kötéssé, stb.) Az ilyen típusú átalakulások sztereokémiájának jellemzése céljából definiálhatjuk az ún. *prokirális atom* vagy *molekula* fogalmát.

E szerint prokirálisnak nevezünk minden olyan atomot vagy molekulát, ami kémiai átalakítását követően *egyetlen lépésben, addíció vagy szubsztitúció során királissá válhat*. Atom esetén az ilyen centrumot *prokiralitáscentrumnak* nevezzük. Ha a vizsgált molekulában nincs aszimmetriacentrum (pl. 2-butanon) akkor az egész molekula prokirális. Ha a molekula már királis (pl. NAD(P)⁺) akkor csak prokirális atomról, vagy atomcsoportról beszélhetünk.

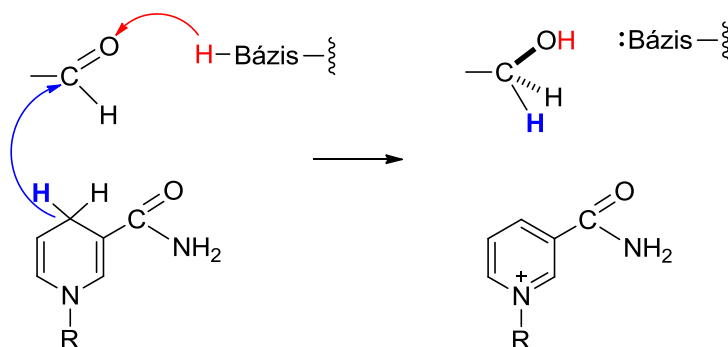
A 2-butanon aszimmetrikus molekula. Ha azonban a karbonilcsoportot szekunder alkoholos hidroxilcsoporttá redukáljuk, úgy egy aszimmetrikus (királis) szénatom alakul ki a molekulában, és a reakció eredményeképpen két (R és S konfigurációjú) enantiomer 2-butanol keletkezhet. A planáris karbonilcsoport két különböző oldalán lejátszódó addíció két különböző enantiomer termékhez vezet. Ezért a karbonilcsoport két oldala két, un. *enantiotóp oldal*. A prokirális karbonilcsoport két oldalát, attól függően, hogy az adott oldalon lejátszódó addíció eredményeképpen az (R) vagy az (S) enantiomer keletkezik, *Re* (rectus) és *Si* (sinister) deszkriptorok használatával különböztetjük meg (IV-4. ábra).

IV-4. ábra. A 2-butanon redukciójával keletkező (R)- és (S)-2-butanol enantiomerek szerkezete



A nikotinsavamid-koenzimet felhasználó enzimek például az alkohol dehidrogenáz (ADH) enzimsalád tagjai, melyek primer alkoholok aldehidekké (vagy szekunder alkoholok ketonokká) történő oxidációját, illetve az aldehidek/ketonok alkoholokká történő redukcióját katalizálják. A karbonilvegyületek (pl. acetaldehid) alkohol-dehidrogenáz enzimek által katalizált redukciója során az NADH, a fém-hidridekhez hasonló módon, hidridaniont ad át a karbonilcsoport pozitívan polározott szénatomjára (IV-5. ábra).

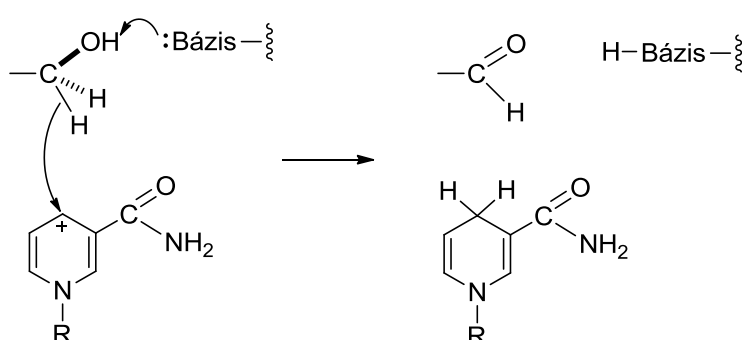
IV-5. ábra. Az acetaldehid NADH-részvétellel lejátszódó ADH-katalizált redukciója.



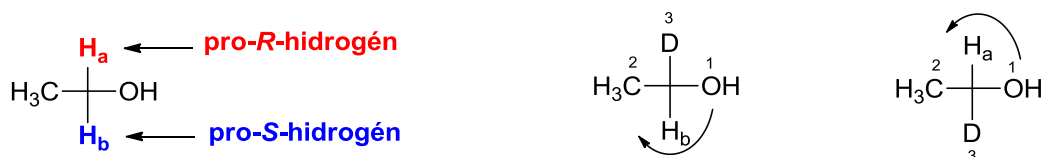
Az enzimkatalizált reakció lejátszódása során a nikotinsavamid-molekularész *pro*-(R)-hidrogénatomjának (lásd lejjebb) nukleofil támadása közben az enzim egyik savas csoportja (H-Bázis) protonálja a karbonilcsoport oxigénjét. A koncertikus mechanizmus következtében az erősen bázikus tetraédes intermedier csak részlegesen alakul ki, és ez nagymértékben csökkenti a reakció aktiválási energiáját.

A fenti rendszer további különlegessége, hogy a nikotinsavamid molekularesz redukált és az oxidált állapot között kicsi a szabadenergia-különbség, ezért a koenzim redukált és oxidált formája könnyen egymásba tud alakulni. Ez azért jelentős, mert így az NAD^+ az egyik folyamatban oxidál (alkoholok oxidációja aldehidekké/ketonokká) és NADH képződik, a NADH pedig egy ellentétes irányú folyamatban redukálni tud (aldehid/ketonok redukciója alkoholokká), eközben maga oxidálódik és az NAD^+ visszaképződik.

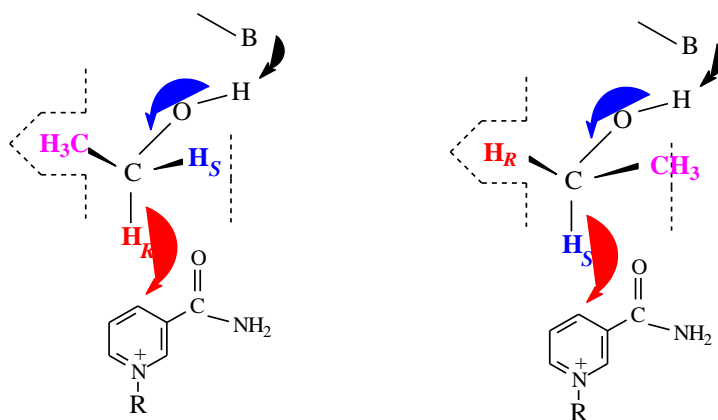
A fenti redukciós folyamat fordítottja, hidridanion kilépése etilalkoholból, nem-enzimkatalizált körülmények között nehezen megy végbe, mert a hidridanion nagyon erős bázis, ezért nagyon rossz kilépő csoport. Elkerülhető azonban az erős bázis kialakulása, ha a hidridanion már a lehasadás közben hozzákapcsolódik egy elektrofil csoporthoz. Az adott esetben ezt az elektrofil csoportot a NAD^+ elektrofil C4 szénatomja biztosítja (IV-6. ábra).

IV-6. ábra. Az etanol NAD⁺-részvétellel lejátszódó oxidációja


Az etilalkohol egy szimmetrikus molekula, melynek C1 szénatomja ún. *prokirális szénatom*. A prokirális szénatomhoz kapcsolódó hidrogénatomok egyikét – melynek más szubsztituensre (pl. deutériumra) történő cserélődése (R)-konfigurációjú C₁-szénatomhoz vezet H_R , (*pro*-(R)-hidrogén) míg a másik hidrogénatomot – ugyezen gondolatment értelmében – H_S (*pro*-(S)-hidrogén) rövidítéssel szimbolizálhatjuk (IV-7. ábra).

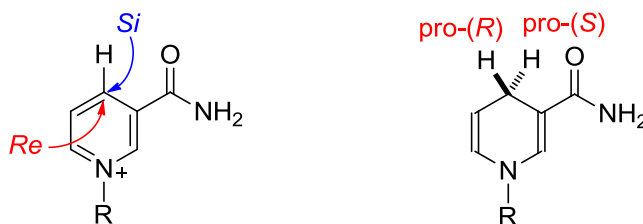
IV-7. ábra. Az etilalkohol *pro*-(R)- és *pro*-(S)-hidrogénatomjai.


Deuterált szubsztráttal végzett kísérletek azt igazolták, hogy az enzimkatalizált reakcióban az etilalkohol *pro*-(R)-hidrogénatomja (H_R) kötődik a NAD(P)⁺ koenzim nikotinsavamid molekularésznek részleges pozitív töltést hordozó C4 atomjához. Ebben az esetben ugyanis kellő nagyságú hely jut a nagy térkitöltésű metilcsoportnak, míg a *pro*-(S)-hidrogénatom leszakításánál a metilcsoportnál fellépő nagy térgátlás olyan nagy aktiválási energiát eredményezne, hogy a *pro*-(S)-hidrogénatom leszakítása nem tud végbemenni (IV-8. ábra).

IV-8. ábra. Az etilalkohol *pro*-(R)- és *pro*-(S)-hidrogénatomjainak kölcsönhatása a NAD(P)⁺ koenzimokkal.


A NAD(P)^+ és redukált származékaik (NAD(P)H) királis molekulák (IV-1. ábra). A molekulák nikotinsavamid molekularészének C4 atomja ezért ún. *prokirális szénatom*. A $\text{NAD(P)}^+ = \text{NAD(P)H}$ reverzibilis átalakulás során a nikotinsavamid molekularész C4 szénatomjához egy hidridion kötődik, illetve távozik el onnan (IV-2. ábra). Amennyiben a redox folyamatban hidridionok vesznek részt, az addíció eredményeképpen a C₄-atom akirális sp^3 hibridállapotú szénatommá alakul. Amennyiben azonban a reakció deuterált szubsztráttal játszódik le, a deuteridion-addíció eredményeképpen a NAD(P)D C₄-szénatom konfigurációja (R) és (S) is lehet. Ezért a NAD(P)^+ nikotinsavamid (planáris) molekularészének két oldala ún. *diasztereotóp oldal*. A két oldal megkülönböztetése – a 2-butanon példáján bemutatott gondolatmenettel megegyezően – R_e és S_i deskriptorokkal történik. Egy deuteridion R_e oldalról történő addíciója (R)-, míg az S_i oldalról történő addíciója (S)-konfigurációjú C₄-szénatomot eredményez. Ez alapján – az etanol C₁-atomjával kapcsolatban leírtakkal összhangban – a nikotinsavamid molekularész C₄-atomjához kapcsolódó hidrogénatomok közül is definiálhatjuk a *pro*-(R)- (H_R) és a *pro*-(S)- (H_S) atomokat (IV-9. ábra).

IV-9. ábra. A nikotinsavamid molekularész R_e és S_i oldalai valamint *pro*-(R)- és *pro*-(S)-hidrogénatomjai.

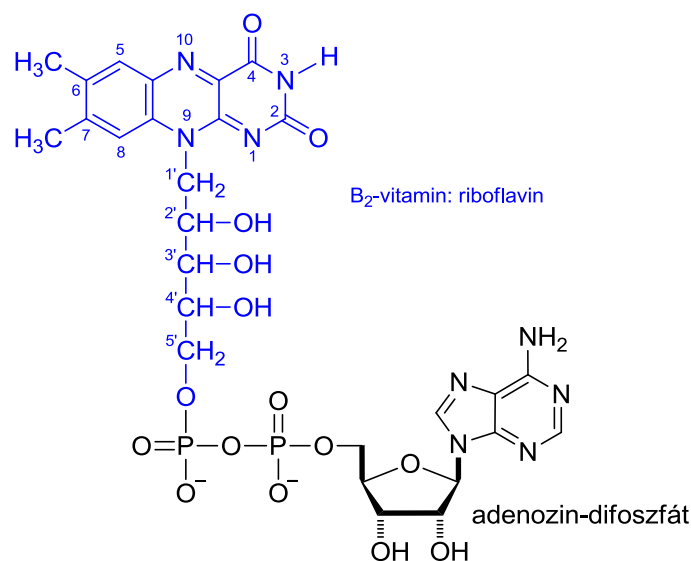


Az alkoholok aldehidekké (vagy szekunder alkoholok ketonokká) történő oxidációját, illetve az aldehidek/ketonok alkoholokká történő redukcióját katalizáló alkohol dehidrogenáz (ADH) enzimek működése során minden esetben a $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ kofaktorok nikotinsavamid molekularésze C₄-*pro*-(R)-hidrogénatomja addicionálódik szubsztrátra, illetve a szubsztrátról addicionálódó hidrogénatom mindig *pro*-(R)-hidrogénatomként jelenik meg a redukált koenzimben.

IV.2 Flavin-koenzimek

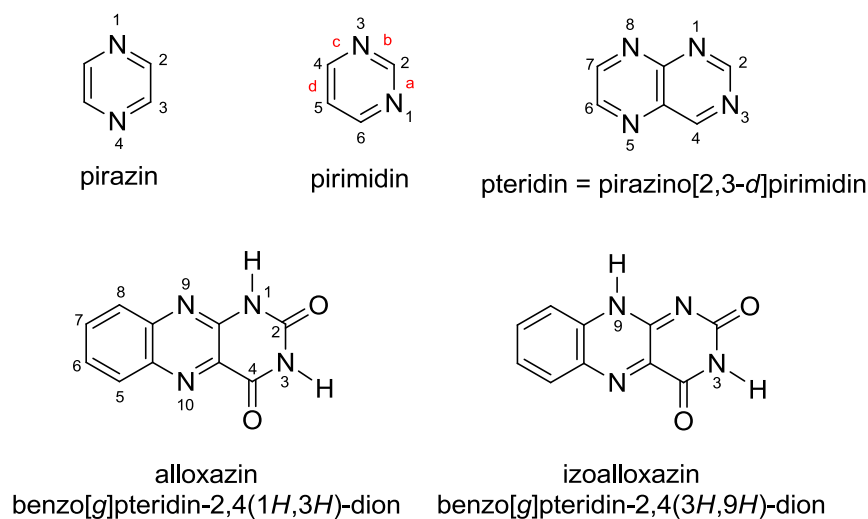
A nikotinsavamid-koenzimekkel működő enzimekhez hasonlóan, nagyszámú enzim redox reakciót katalizáló enzim működik flavin koenzimekkel. A flavin koenzimek mindkét formája – a flavin mononukleotid (FMN) és a flavin-adenin-dinukleotid (FAD) a szervezetben riboflavinból (B₂ vitamin) szintetizálódik (IV-10. ábra). A két koenzim funkcionálisan ekvivalens, de vannak enzimek melyek csak az egyik, vagy csak a másik, és vannak amelyek mindkét koenzim részvételével működnek.

IV-10. ábra. A flavin-adenin-dinukleotid (FAD) szerkezete



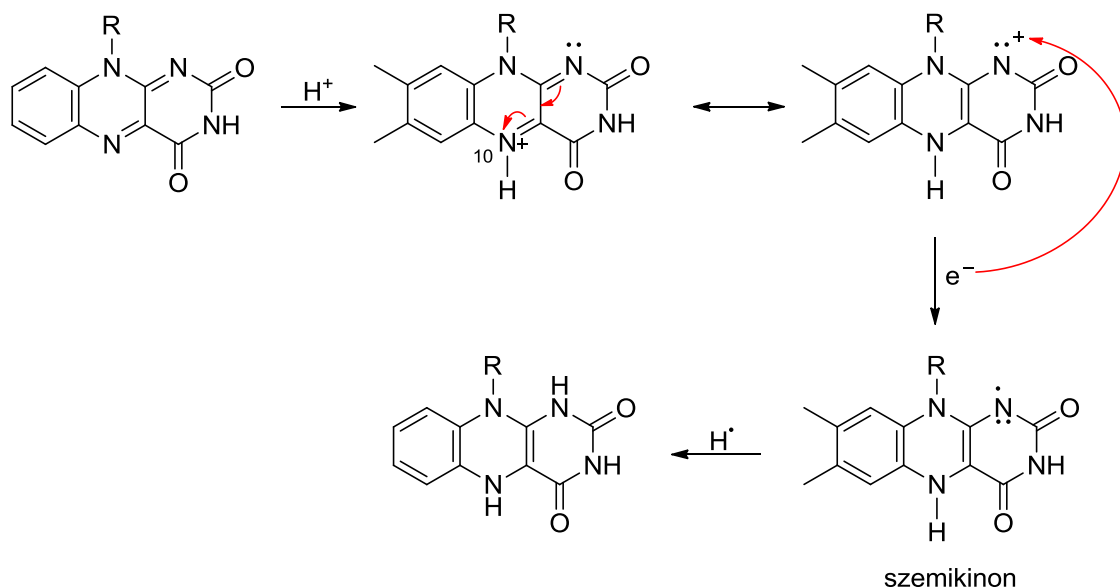
Kémiai szempontból mind az FMN, mind a FAD benzo[g]pteridin-2,4(3H,9H)-dion-(izoalloxazin-)származék (IV-11. ábra), és biokémiai funkcióik is az izoalloxazin heterociklusos gyűrűrendszerrel kapcsolatosak. Összefoglaló néven flavinszármazékokként (FL) kerülnek említésre.

IV-11. ábra. Az izoalloxazin gyűrűrendszer és építőelemeinek számozása és szerkezete



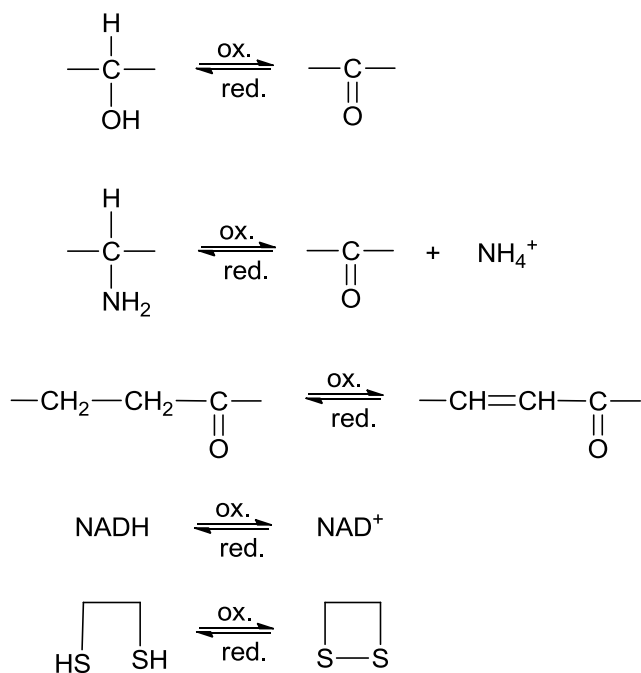
Mindkét koenzim kiváló elektronakceptor tulajdonságú molekula. Egy proton majd egy elektron felvételével flavin-szemikinon (FLH) származékká, majd egy következő elektron (hidrogénatom) felvételével redukált flavinná (FLH₂) redukálódnak (IV-12. ábra).

IV-12. ábra. A FL = FLH₂ reverzibilis redoxreakció



Az FMN/FMNH₂ reverzibilis redoxrendszer két egymást követő redoxpotenciáljának (pH 7,0) átlaga -0,21 V, ami a következő fontosabb kémiai átalakulások katalízisét teszi lehetővé (IV-13. ábra).

IV-13. ábra. A flavin-koenzimek (FL) által katalizált fontosabb kémiai átalakulások

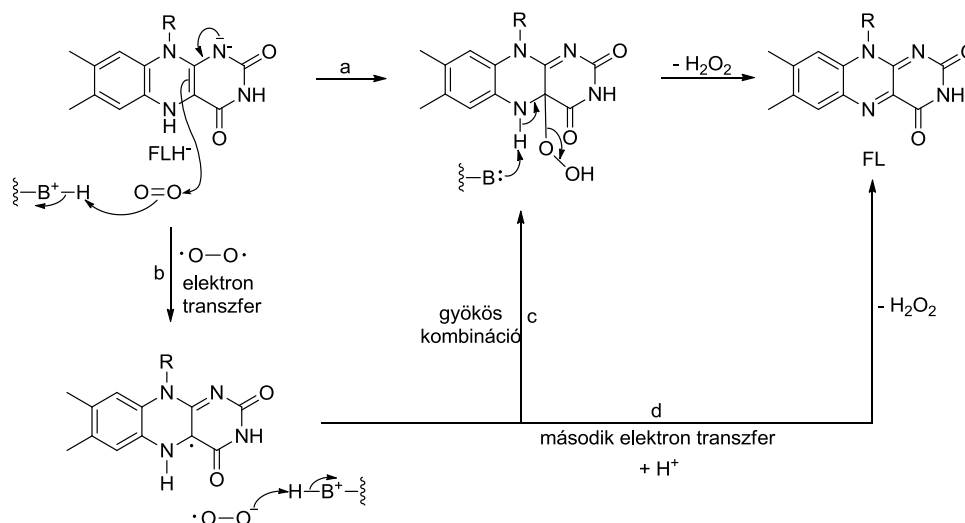


A flavin-koenzimokkal működő enzimek egy része az *oxidázok*, másik része a *dehidrogenázok* csoportjába tartozik, ami nevezéktanukban is kifejezésre jut. A nevek közötti megkülönböztetés alapja a redukált flavin (FLH₂) visszaoxidálódásának mechanizmusa közötti különbség.

Az *oxidázok* a redukált flavint molekuláris oxigén segítségével oxidálják vissza flavinná (FL), miközben hidrogén-peroxid (H₂O₂) képződik (IV-14. ábra). A reakció

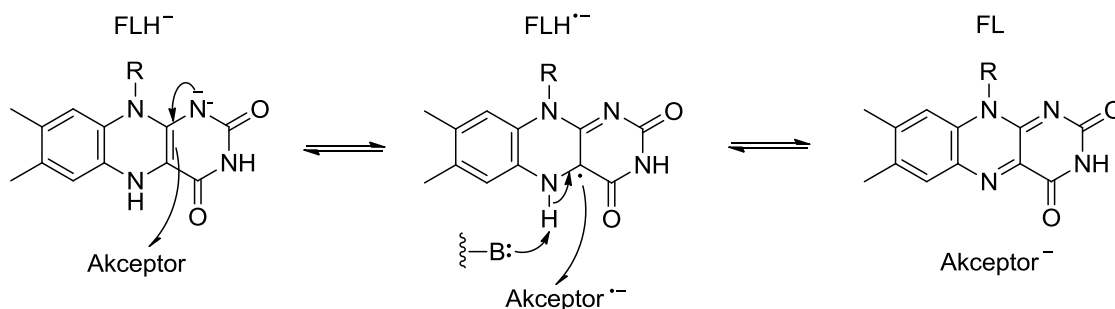
lejátszódhat fémionok részvételével képződő szinglet oxigén addíciója („a” reakcióút), vagy az oxidált flavin és triplett oxigén között lejátszódó elektrontranszfer („b” reakcióút) útján képződő gyökpáron keresztül. Ez utóbbi átmeneti termék spin-inverziót követően gyökös kombináció („c” reakcióút), vagy egy második elektron felvételével („d” reakcióút) szintén oxidált flavinná alakul.

IV-14. ábra. A redukált flavin (FLH₂) oxidált flavinná (FL) történő oxidázok által katalizált oxidációja



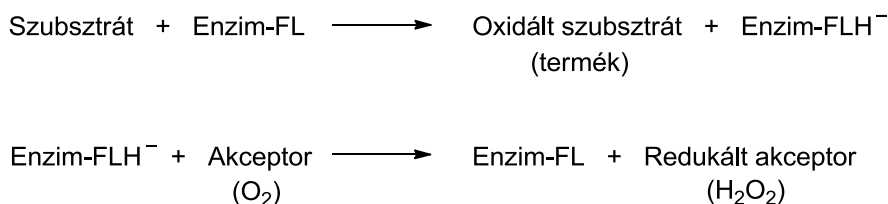
A *dehidrogenázok* a redukált flavint (FLH₂) elektron-transzfer funkcióval rendelkező fehérjék (pl. ubikinon, citokróm b₅) részvételével oxidálják vissza oxidált flavinná. A reakciók általában két egymást követő elektronátmenettel járó reakcióúton játszódik le (IV-15. ábra).

IV-15. ábra. A redukált flavin (FLH) oxidált flavinná (FL) történő dehidrogenázok által katalizált oxidációja



A flavin-tartalmú enzimek katalitikus ciklusa tehát legalább két lépésből áll: Az első lépésben a szubsztrát oxidálódik, majd a következő lépésben a redukált flavin visszaoxidálódik (IV.16. ábra).

IV-16. ábra. A flavin-tartalmú enzimek katalitikus ciklusa

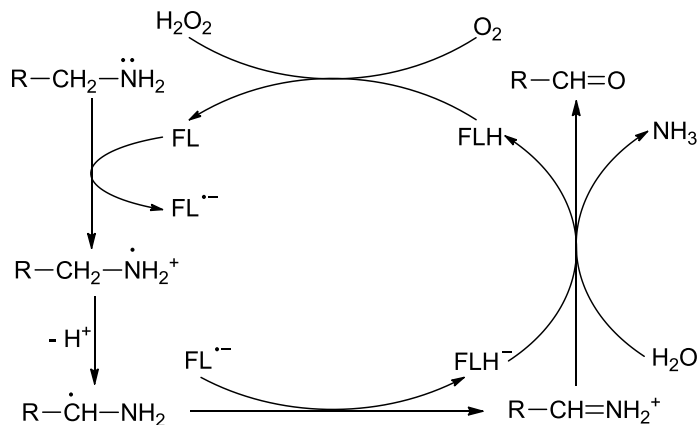


A flavin-tartalmú enzimek által katalizált reakciók mechanizmusa négy csoportba oszthatók:

- (a) Két-elektron (karbanion) mechanizmus (pl. D-aminosav oxidáz (DAAO));
- (b) Karbanion mechanizmust követő két egy-elektron transzfer (alkohol dehidrogenáz (pl. általános acil-CoA-dehidrogenáz));
- (c) Egy-elektron (gyökös) mechanizmus (pl. monoamin-oxidáz (MAO));
- (d) Hidrid mechanizmus (pl. dihidroorotát-dehidrogenáz)

Az endogén monoaminok (pl. feniletilamin, norepinefrin, epinefrin, szerotonin, dopamin, tiramin, triptamin) oxidatív metabolizmusát katalizáló MAO enzimek számos terápiában alkalmazott gyógyszervegyület célpontja. Az enzimek működésének feltételezett mechanizmusát a IV-17. ábra mutatja be.

IV-17. ábra. A monoamin-oxidáz (MAO) enzimek által katalizált reakciók feltételezett mechanizmusa



Amint az ábra mutatja a reakcióútak első lépése a szubsztrát (monoamin) nemkötő elektronpárja egyikének transzferje a flavin kosubsztrátra (FL), egy amin gyökkationt és egy flavin gyökianiont (FL^{•-}) eredményezve. A gyökkaktion protonvesztése egy karbokation képződéséhez vezet, ami vagy egy következő – flavin gyökianionnak átadott - elektronvesztéssel a megfelelő protonált iminné alakul. A protonált imin a deprotonált redukált flavinnal (FLH^{•-}) és vízzel reagálva ammóniává és a megfelelő aldehiddé alakul. A redukált flavin (FLH₂) oxigénnel történő reakciója (oxidált flavinná történő visszaoxidációja) hidrogén-peroxidot eredményez.

IV.3 Kinon szerkezeti elemet tartalmazó koenzimek

A redoxreakciókat katalizáló enzimek koenzimjeinek harmadik nagy csoportját a kinon szerkezeti elemet tartalmazó koenzimek képezik. Ezeket a koenzimek csak felsorolásként kerülnek megemlítésre e tananyagban.

- 1.) Pirrolokinolin-kinon (PQQ)
- 2.) 6-Hidroxidopakinon (Topakinon) (TPQ)
- 3.) Triptofán triptofilkinon (TTQ)
- 4.) Lizin tirozilkinon (LTQ)

IV.4 Irodalom

- Guba F.: Orvosi biokémia. Medicina Könyvkiadó, Budapest (1988)
- Smith and Williams' Introduction to the Principles of Drug Design and Action. (Editor: Smith H.J.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam (1998)
- Stephen G. Mayhew: The effects of pH and semiquinone formation on the oxidation-reduction potentials of flavin mononucleotide. Eur. J. Biochem. 265, 698-702 (1999)
- Novák L., Nyitrai J., Hazai L.: Biomolekulák kémiája. MKE, Budapest (2001)
- Ádám V., Dux L., Faragó A., Fésüs L., Machovich R., Mandl J., Sümegi B.: Orvosi biokémia. Medicina Kiadó, Budapest (2001)
- Silverman R.B.: The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions, Revised edition. Elsevier, London (2002)
- Parkinson A.: Biotransformation of xenobiotics. In Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Seventh Edition. (Editor: Klaassen C.D.). McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY (2008)
- Gyógyszerészi kémia. Szerk.: Fülöp F., Noszál B., Szász Gy., Takácsné Novák K. Semmelweis Kiadó, Budapest (2010)
- A gyógyszerkutatás kémiája. Szerk. Keserű Gy. M. Akadémiai Kiadó, Budapest (2011)
- A farmakológia alapjai. Szerk.: Gyires K., Fürst Zs. Medicina Kiadó, Budapest (2001).
- Gyógyszerek. Szerk. Faigl F. Elektronikus tankönyv. BME, Budapest (2011)
- Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., Zito S.W.: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2013)

V Oxidatív átalakulások. Monooxygenázok I. Hem-dependens monooxygenázok

A monooxygenázok azok az oxidoreduktázok, amelyek a molekuláris oxigén egy atomjának a szubsztrátba történő beépülését katalizálják. A másik oxigénatom egy a reakció során képződő vízmolekulába épül be. Az oxygenázok molekuláris mechanizmusuk alapján öt csoportba sorolhatók:

1. Hem-dependens monooxygenázok
2. Flavin-dependens monooxygenázok
3. Pterin-dependens hidroxilázok
4. Nem-hem vastartalmú monooxygenázok
5. Réz-dependens monooxygenázok

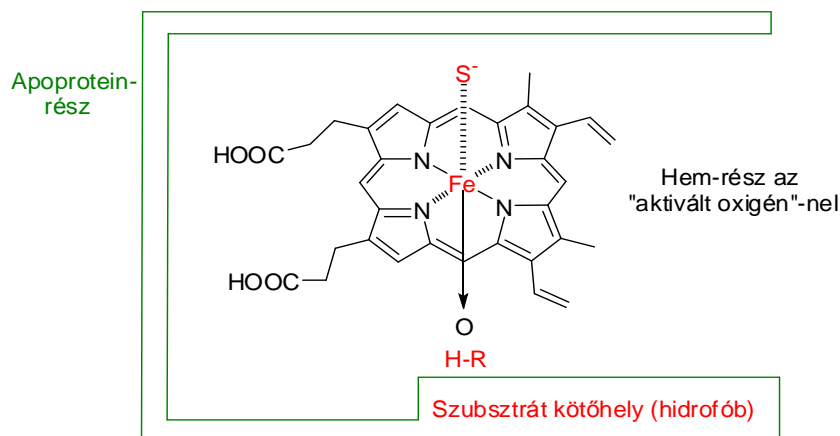
V.1. A citokróm P450 enzimek szerkezete, nevezéktana.

A hem-dependens monooxygenázokkal kapcsolatos első megfigyelés *M. Klingenberg* és *D. Garfinkel* nevéhez fűződik, akik egymástól függetlenül egy a máj mikroszóma frakcióban megtalálható festékanyagról számoltak be, ami szén-monoxid hozzáadásakor 450 nm hullámhosszúságú erős abszorpciós maximumot mutatott (1958). Hat évvel később *T. Omura* és *R. Sato* a festékanyagot egy hem-tartalmú fehérjeként azonosította és „P450” névvel illette.

Az eltelt időszakban igazolódott, hogy a kismolekulájú szerves molekulák celluláris oxidációs átalakulásait katalizáló enzimek közül a legnagyobb jelentőségűek a citokróm P450 (CYP450) enzimek (E.C.1.14.-.-.). Egy részük csak meghatározott endogén anyagok (pl. szteroidok, zsírsavak, epesavak) transzformációjában vesz részt és fontos szerepet tölt be pl. a szteroidok bioszintézisében. Másik részük funkcióját tekintve jóval kevésbé szubsztrátspecifikus és a szervezetbe kerülő testidegen anyagok (xenobiotikumok) kémiai átalakulását katalizálja.

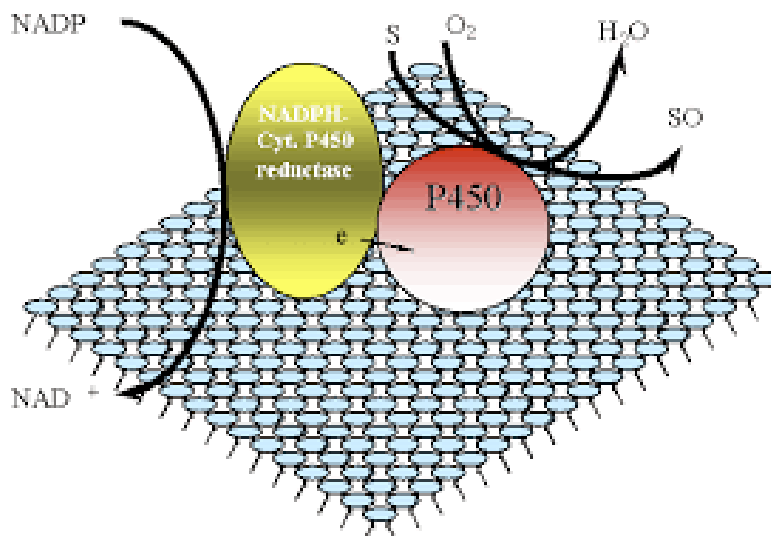
A CYP450 enzimek vastartalmú fehérjék, melyekben a vasion a hemoglobinban is megtalálható vas-protoporfirin IX (hem) komplexként kapcsolódik az enzim fehérjéhez (V-1. ábra). Minden citokróm P450 enzim egyetlen polipeptid láncból áll, amely egy hidrofób, elektrosztatikus és kovalens kötéssel kapcsolódó vas-protoporfirin IX (hem) gyűrűt tartalmaz. Az enzim aktív helyén lévő protoporfirin-IX gyűrűben a vas hatos koordinációs számú. Négy koordinációs helyet a gyűrű négy nitrogénje foglal le, ötödik ligandumja a hem 436. cisztein tiolát anionja, míg a hatodik koordinációs hely a dioxigén (O₂) molekula kötőhelye a katalitikus ciklusban.

V-1. ábra. A citokróm P-450 enzimek egyszerűsített szerkezete

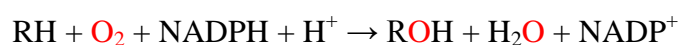


Az citokróm P450 (CYP450) enzimek valójában társult elektrontranszport rendszerek, melyek két enzimből – a citokróm P450-ből és egy flavoproteiből, NADPH-citokróm P450 reduktázból (E.C. 1.6.2.4.) állnak. Ezek az enzimek az endoplazmatikus retikulum foszfolipid mátrixában lokalizálódnak, ezért az un. *mikoszómális* fázis I enzimek közé tartoznak (V-2. ábra). Mivel az enzimek által katalizált reakciókban mind redukáló (NADH vagy NADPH) mind oxidáló (O_2) ágensek részt vesznek, ezért az un. „*kevert funkciójú oxidázok*” közé tartozó enzimek.

V-2. ábra. A citokróm P-450 enzimek működésének elve



A CYP450 enzimek legfontosabb funkciója, hogy képesek a molekuláris oxigén (O_2) „aktiválására” és a katalizált reakció eredményeképpen a molekuláris oxigén egyik oxigénatomja – általában szénatomhoz kötődve- beépül a szubsztrát (SH) molekulába, míg a másik oxigénatom egyidejű redukciója egy vízmolekula keletkezését eredményezi.



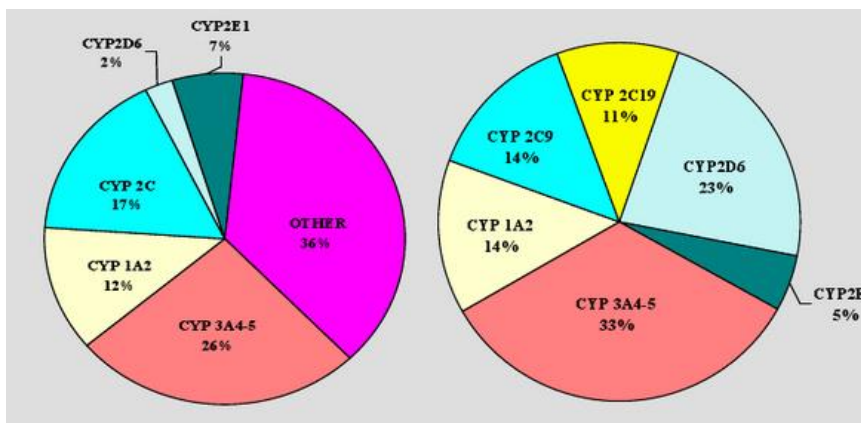
A reakciók eredményeképpen a szubsztrát molekulában egy új poláros, további konjugációs átalakulásokra is képes hidroxilcsoport alakul ki, ami elősegíti a

metabolitok kiürülését a szervezetből. Ugyanakkor megemlítendő, hogy a CYP450 enzimek által katalizált reakciók néha reaktív metabolitok képződését eredményezi, ami pl. a gyógyszer hatóanyagok nem kívánt hatásainak kémiai alapjait jelenthetik.

A CYP450 enzimek több gén által kódolt enzimesalád, melynek egyes képviselőit a fehérjerész hasonlósága alapján csoportosíthatjuk, illetve azonosíthatjuk. A nemzetközileg elfogadott megállapodás alapján a 40%-nál nagyobb homológiát mutató CYP enzimeket egy családba tartozónak tekintjük, és ezt a CYP rövidítés után egy arab számmal (pl. CYP1, CYP2, stb.) jelöljük. Az 55%-nál nagyobb homológiát mutató enzimek egy családon belül alcsaládokat képeznek, melyeket az egyes enzimek azonosítására használt jelölésben az arab számot követő latin betű (pl. CYP1A, CYP2C, CYP3A, stb.) jelez. Az egyes enzimek (individuális citokróm P450 gének) a latin betűt követő újabb arab szám feltüntetésével különböztethetők meg egymástól (pl. CYP1A2, CYP2A6, CYP2E1, stb.).

A citokróm P450 enzimek expressziója a legnagyobb a májban, de megtalálhatók többek között a tüdőben, a vékonybélben, a vesében, a bőrben, a plecentában és az agyban is. Az emberi máj mikroszóma frakcióban legalább 15 különböző CYP450 izoenzim (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5, 3A7, 4A9 és 4A11) található. A májban expresszáldó CYP450 izoformák megoszlását és azok a gyógyszervegyületek oxidatív metabolizmusában betöltött szerepének jelentőségét az V-3. ábra mutatja be (V-3. ábra).

V-3. ábra. Humán CYP450 izoformák százalékos megoszlása a májban és az izoformák jelentősége a gyógyszerek (testidegen anyagok) oxidatív metabolizmusában



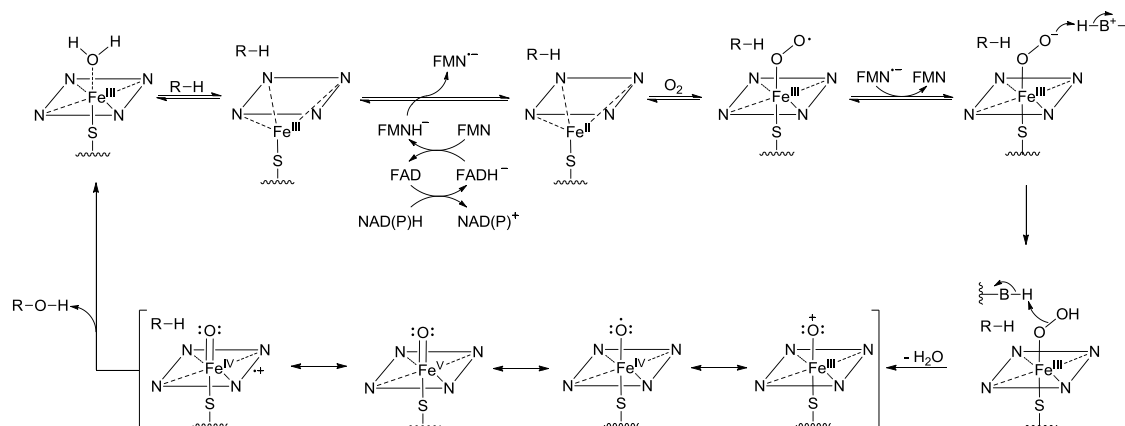
A CYP450 izoenzimek nagy száma mellett még azok felépítése sem egységes a szervezetben. Az utóbbi évek kutatásai igazolták, hogy az egyes enzimeket kódoló gének több variánsa is előfordulhat, melyek által kódolt *polimorf enzimek* katalitikus aktivitása egymástól eltérő. Egy-egy metabolikus enzim genetikai polimorfizmusa szempontjából a humán populáció az alábbi négy csoportba sorolható:

1. Extenzív metabolizálók (EM), akik metabolizmusa a vártnak megfelelő.
2. Gyenge metabolizálók (PM), akik metabolikus aktivitása a vártnál jóval gyengébb.
3. Átmeneti metabolizálók (IM), akik metabolikus aktivitása alacsonyabb, mint az extenzív metabolizálók, de magasabb, mint a gyenge metabolizálók esetén.
4. Ultra extenzív metabolizálók, akik metabolizmusa jóval intenzívebb, mint az extenzív metabolizálók esetén tapasztalható.

V.2. A citokróm P450 enzimek katalitikus ciklusa

A citokróm P450 enzimek hem prosztetikus csoportjának részvételével aktiválják a molekuláris oxigént. A CYP450 enzimek oxigénaktiválásának mechanizmusát az V-4. ábra mutatja be.

V-4. ábra. A CYP450 enzimek oxigénaktiválásának mechanizmusa



A ligandummentes CYP450 enzim vas(III)-ionja alacsony spinű, szabályos oktaéders komplexet képez a hem négy nitrogénatomjával (a rajzon a hem molekularész egy, mindegyik sarkában egy nitrogénatomot tartalmazó négyzettel jelölve), a fehérje cisztein aminosav építőegységének tiolat anionjával, valamint egy molekula vízzel.

(1) A folyamat első lépésében a vas(III) CYP450 (fehérje része) reverzibilisen megköti a szubsztrát molekulát (R-H). Ennek eredményeképpen a vízmolekula szabaddá válik, és a kialakuló ötligandumos, magas spinű komplex vas(III) ionja kikerül a hem nitrogének síkjából.

(2) A vas(III) komplex elektronszerkezetének megváltozása a hem redoxpotenciáljának megváltozását eredményezi, ami lehetővé teszi központi fémion egyelektronos redukciójának lejátszódását. A redukáló ekvivalenst NADPH szolgáltatja, az elektrontranszfert a mind FAD- mind FMN-tartalmú NADPH-CYP450 reduktáz enzim végzi.

(3) Ezt követően a vas(II) CYP450 komplex – a központi vasion hatodik ligandumaként – dioxién (O_2) molekulát köt meg, ami egyidejű redukciójával alacsony spinű vas(III)-szuperoxidgyök komplex keletkezik.

(4) A vas(III)-szuperoxidgyök komplex a NADPH-CYP450 reduktáz (vagy citokróm-b₅ reduktáz) enzim által katalizált- újabb egyelektronos redukció eredményeképpen vas(III)-peroxid anion komplexsége alakul, aminek protonálódása a vas(III)-peroxid CYP komplex képződést eredményezi.

(5) A vas(III)-peroxid CYP komplex – peroxid-molekularészének heterolitikus hasadásával – vízkilépéssel egybekötve, az igen elektrofil tulajdonságú, négy rezonáns határszerkezettel jellemezhető oxoferril komplexsége („aktivált oxigénforma”) alakul.

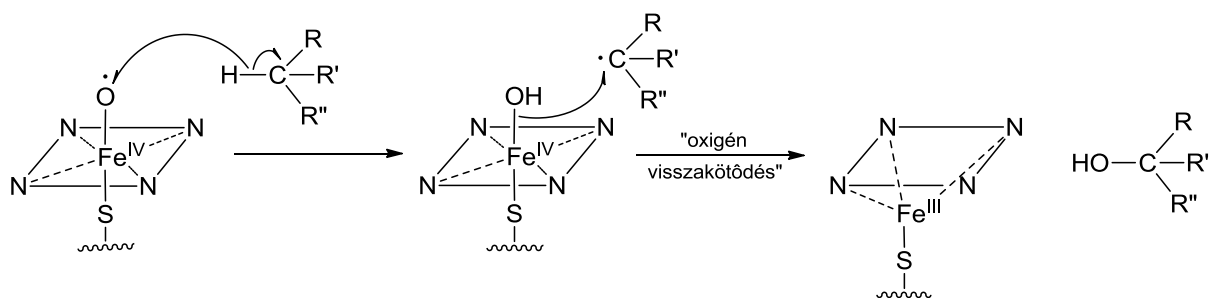
(6) Az oxoferril komplex oxigénatomja és a szubsztrát között lejátszódó reakció (aminek mechanizmusa a szubsztrát szerkezetétől függően változó) a hidroxilált termék kialakulását, valamint a CYP450 eredeti struktúrájának visszaalakulását eredményezi.

A citokóm P450 enzimek által katalizált reakciók közül az alábbiakban az (a) alifás hidroxiláció, (b) alkén-epoxidáció, (c) aromás hidroxiláció, (d) alkiléter oxidáció, valamint (d) az aromatóz enzimek által katalizált reakciók mechanizmusa kerül bemutatásra. A CYP450 reakciók által katalizált reakciók teljes listája a gyógyszerészeti kémia tankönyvekben megtalálható.

V.3. Az alifás hidroxiláció mechanizmusa

A CYP450 enzimek által katalizált reakciók egyik egyedi példái a nem-aktivált alkánok hidroxilációs reakciói. Az ilyen típusú reakciók mechanizmusát az V-5. ábra mutatja be.

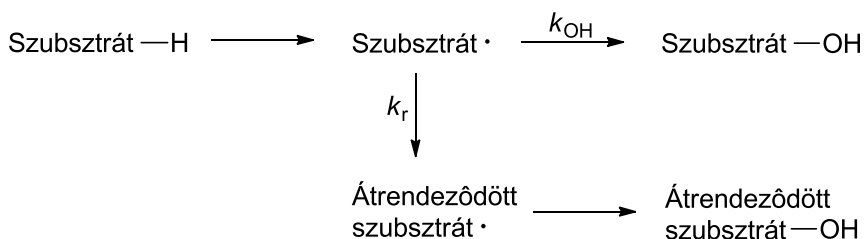
V-5. ábra. A nem-aktívált alkánok CYP450 enzimek által történő hidroxilációjának mechanizmusa.



Isotópjelzett szubsztrátokkal végzett kísérletek eredményei alapján valószínűsíthető, hogy a reakció az *oxoferril komplex* és az alkán között lejátszódó *hidrogénabsztrakcióval* indul, melyet a hem-kötött hidroxilgyök és a keletkező szénatomú gyök kötött lejátszódó „*oxigén-visszakötődés*” („rebound”) követ.

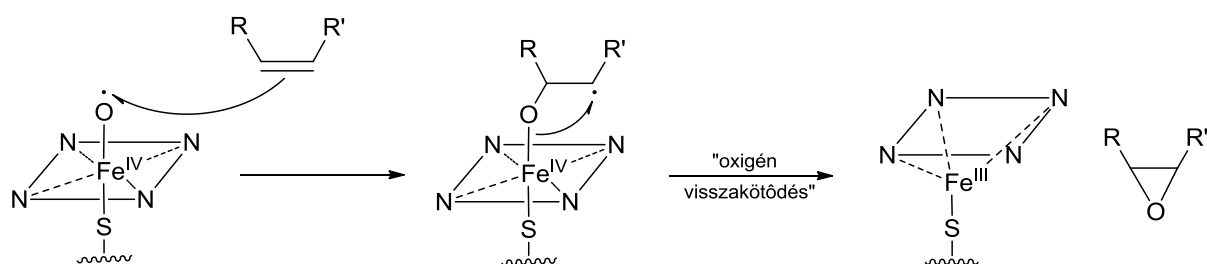
A különböző molekuláris környezetben lévő, a reakcióban résztvevő szénatomból képződő alkilgyök a hem-kötött hidroxilgyökkel történő kombinációját megelőzően átrendeződhet, így a termékek között az eredeti szerkezetű szubsztrát hidroxilált származékai mellett esetenként átrendeződött szerkezetű hidroxilált származékok is megtalálhatók (V-6. ábra).

V-6. ábra. A kétlépéses CYP450-katalizált alifás hidroxiláció végtermékeinek lehetséges szerkezete.



V.4. Az alkén-epoxidáció mechanizmusa

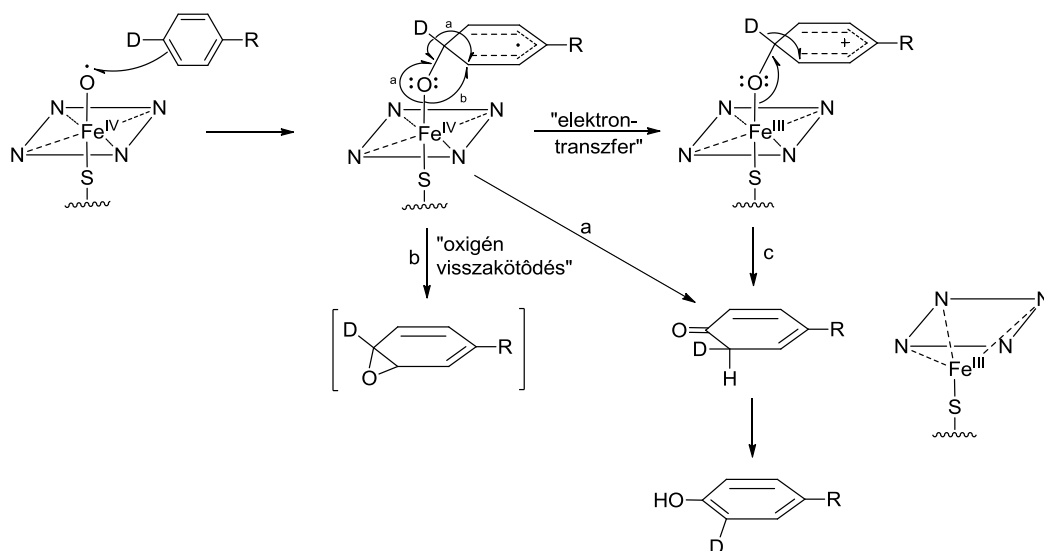
A CYP450 enzimek által katalizált reakciók között megtalálhatók az alkének szén-szén kettős kötésének epoxid-származékká történő átalakulásai is (V-7. ábra).

V-7. ábra. A CYP450-katalizált alkén-epoxidáció mechanizmusa


A reakció mechanizmusa hasonlóságot mutat az alifás hidroxiláció mechanizmusával, de itt az első lépés az *oxoferril komplex* oxigénatomjának gyökös addíciója a szén-szén kettős kötésre, melyet a keletkező addukt *szubsztrát-epoxid*dá és magas spinű vas(III)-hem komplexé történő átalakulása követ.

V.5. Az aromás hidroxiláció mechanizmusa

Az aromás vegyületek hidroxilációja gyakori folyamat a CYP450 enzimek által katalizált reakciók között. A reakció mechanizmusát deuterált benzolszármazékok hidroxilációjának vizsgálatával értelmezhetjük (V-8. ábra).

V-8. ábra. A CYP450-katalizált aromás hidroxiláció mechanizmusa


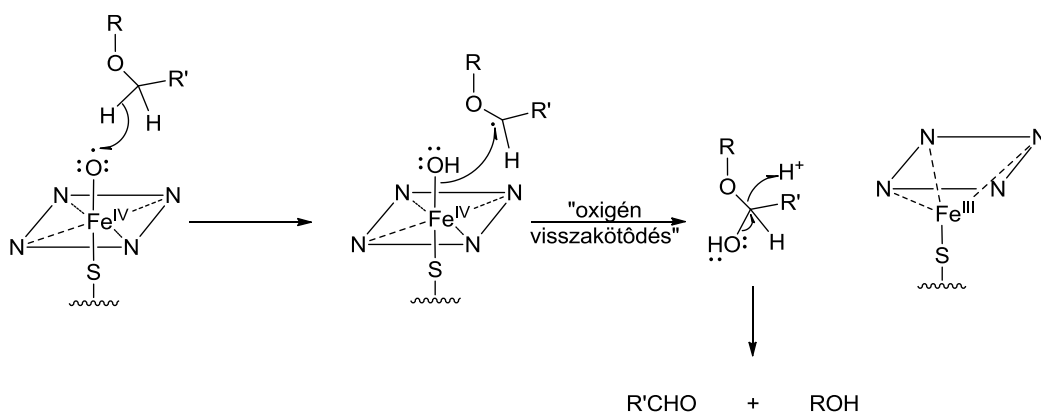
A reakció első lépése ez esetben is a reaktív *oxoferril komplex* oxigénatomjának gyökös addíciója az aromás gyűrű π -elektronrendszerére melynek eredménye egy, a reakcióban résztvevő szénatom szempontjából tetraédres geometriájú gyök vagy kation szerkezetű átmeneti termék. A következő lépésben az átmeneti termék – a tetraédres szerkezetű szénatomjához kapcsolódó hidrogénatom [1,2]-*szigmatrop átrendeződésével* („a” és „c” reakcióút) – ciklohexadienon-származék képződik, ami, preferáltan protonabsztrakcióval lejátszódó tautomerizációval a megfelelő fenollá alakul. Az „a” és a „c” reakcióutak közül a preferáltan a „c” reakcióúton lejátszódó átrendeződést az irodalom általában „*NIH-shift*”. Alternatív mechanizmusként néhány policiklusos aromás szénhidrogén (pl. naftalin, 9,10-dimetilbenzotracén) a gyök típusú átmeneti

termékben lejátszódó „oxigén-visszakötődés” eredményeként 1,2-oxidihidro származékok (epoxidok) képződése volt igazolható.

V.6. Az alkiléter oxidáció mechanizmusa

Alkiléter funkciós csoportok gyakran előfordulnak a kismolekulájú szerves gyógyszervegyületek között. Az α -szénatomon hidrogénatomot hordozó alkiléter származékok CYP450 enzimek által katalizált reakcióban dealkilálódhatnak az V-9. ábrán bemutatott mechanizmus szerint.

V-9. ábra. A CYP450-katalizált alkiléter oxidáció mechanizmusa

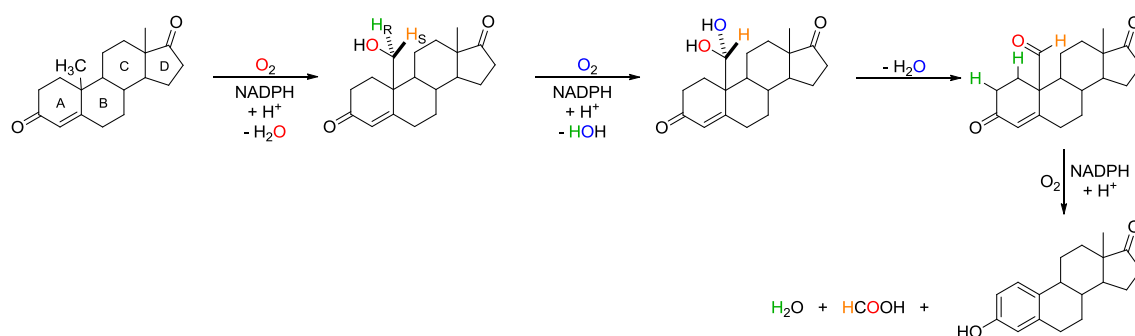


A reakció kezdeti lépése az *oxoferril komplex* és az α -hidrogénatom között lejátszódó *hidrogénabsztrakció*, melyet a hem-kötött hidroxilgyök és a keletkező széncentrumú gyök kötött lejátszódó „oxigén-visszakötődés” követ. A keletkező félacetál spontán bomlik a megfelelő aldehidre és alkoholra.

Hasonló mechanizmus szerint játszódik le az α -szénatomon hidrogénatomot hordozó alkilcsoporttal szubsztituált aminok CYP450 enzimek által katalizált dealkilációja is.

V.7. Szén-szén kötés felhasadásával járó reakciók mechanizmusa

A szén-szén kötés felhasadásával járó CYP450-katalizált reakciók egyike az androsztendion ösztromná történő oxidatív átalakítását katalizáló *aromatáz* (CYP19) enzimek. A reakció elemi lépéseit és a reakciókban szereplő oxigénatomok átalakulásait az V-10. ábra foglalja össze.

V-10. ábra. Az androszténdion aromatáz enzimek által katalizált oxidációjának lépései.


Az androszténdion C₁₀-metilcsoportjának két egymást követő hidroxilációja geminális diolt eredményez, ami spontán vízvesztéssel formilcsoporttá alakul át. A C₁₀-formilcsoport további oxidációjának és egyidejűleg az aromás "A" gyűrű kialakulásának részleteit illetően több lehetséges mechanizmus ismert az irodalomban, melyek részleteinek bemutatása túlmutat tananyag keretein. Az aromás A gyűrű kialakulásának harmadik oxidatív lépése során a formilcsoport hangyasavvá oxidálódik, míg az A gyűrű C₁- és C₂-hidrogénatomjai vízzé alakulnak. Megemlítendő, hogy a mechanizmus ismerete több, különböző támadáspontú aromatáz-gátló gyógyszermolekula kifejlesztését tette lehetővé.

V.8 Irodalom

- Smith and Williams' Introduction to the Principles of Drug Design and Action. (Editor: Smith H.J.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam (1998)
- Novák L., Nyitrai J., Hazai L.: Biomolekulák kémiája. MKE, Budapest (2001)
- Ádám V., Dux L., Faragó A., Fésüs L., Machovich R., Mandl J., Sümegi B.: Orvosi biokémia. Medicina Kiadó, Budapest (2001)
- Silverman R.B.: The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions, Revised edition. Elsevier, London (2002)
- Parkinson A.: Biotransformation of xenobiotics. In Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Seventh Edition. (Editor: Klaassen C.D.). McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY (2008)
- Gyógyszerészi kémia. Szerk.: Fülöp F., Noszál B., Szász Gy., Takácsné Novák K. Semmelweis Kiadó, Budapest (2010)
- A gyógyszerkutatás kémiája. Szerk. Keserű Gy. M. Akadémiai Kiadó, Budapest (2011)
- Gyógyszerek. Szerk. Faigl F. Elektronikus tankönyv. BME, Budapest (2011)
- Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., Zito S.W.: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2013)
- Perjési P.: Gyógyszermetabolizmus és gyógyszertoxicitás. Elektronikus tananyag. PTE, Pécs (2014)

VI Oxidatív átalakulások. Monooxygenázok II. Favin-dependens monooxygenázok

A flavin-dependens monooxygenázok mechanizmusuk alapján több csoportba oszthatók. Így különbséget tehetünk (a) külső redukálószerrel nem igénylő enzimek (pl. laktát-oxidáz) és (b) külső redukálószerrel (NAD(P)H) igénylő enzimek (pl. a flavin-dependens monooxygenázok, keton-monooxygenázok) között.

VI.1 Külső redukálószerrel nem igénylő enzimek

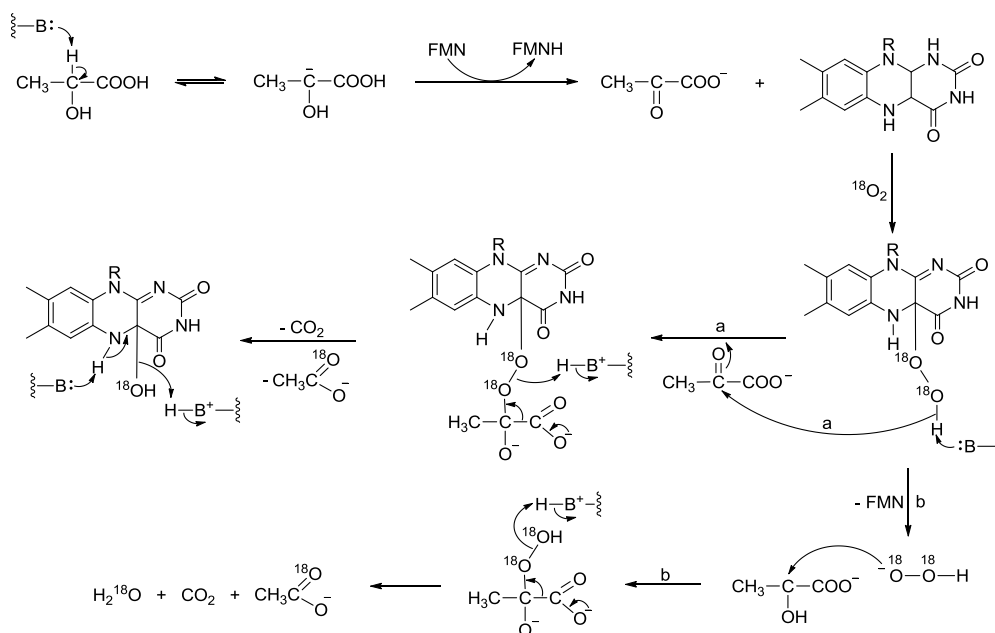
A külső redukálószerrel nem igénylő flavin-dependens enzimek működése során a szubsztrát oxigenációja nem igényel külső redukálószerrel – maga a szubsztrát redukálószerként is szerepel a reakcióban. Ilyen például a laktát-oxidáz (E.C. 1.13.12.4.) enzim, ami a laktát acetátáttá, szén-dioxiddá és vízzé történő oxidatív dekarboxileződését katalizálja.

Ebben a reakcióban az az oxidált flavint (FMN) tejsav redukált flavinná (FMNH) redukálja, miközben maga piroszólóssavvá oxidálódik. A reakció első lépésében az enzim mint oxidáz, nem mint monooxygenáz vesz részt. Ezt követően a redukált flavin (FMNH) a IV-11. ábrán bemutatott mechanizmusok szerint flavin-C4a-hidroperoxidá alakul és a piroszólósav oxidációja a hidroperoxid intermedier részvételével zajlik. A hidroperoxid intermedier és piroszólósav két típusú reakcióban vehet részt:

A VI-1. ábrán (a) reakcióútnak jelzett reakció első lépésében a deprotonált flavin-C4a-hidroperoxid nukleofil addíciója a piruvát karbonilcsoportjára, melynek dekarboxilációval kísért eliminációja acetátátot, szén-dioxidot és C4a-hidroxiflavint eredményez. A hidroxiflavin víz-eliminációjával oxidált flavin (FMN) keletkezik.

A (b) reakcióút első lépése a hidrogén-peroxid eliminációja mely során oxidált flavin (FMN) keletkezik. A piroszólósav oxidációja – az (a) úthoz hasonló szerkezetű intermedieren keresztül játszódik le.

VI-1. ábra. A laktát-oxidáz enzim működésének mechanizmusai



VI.2 Külső redukálószer igénylő enzimek

VI.2.1 Flavin monooxygenáz (FMO) enzimek

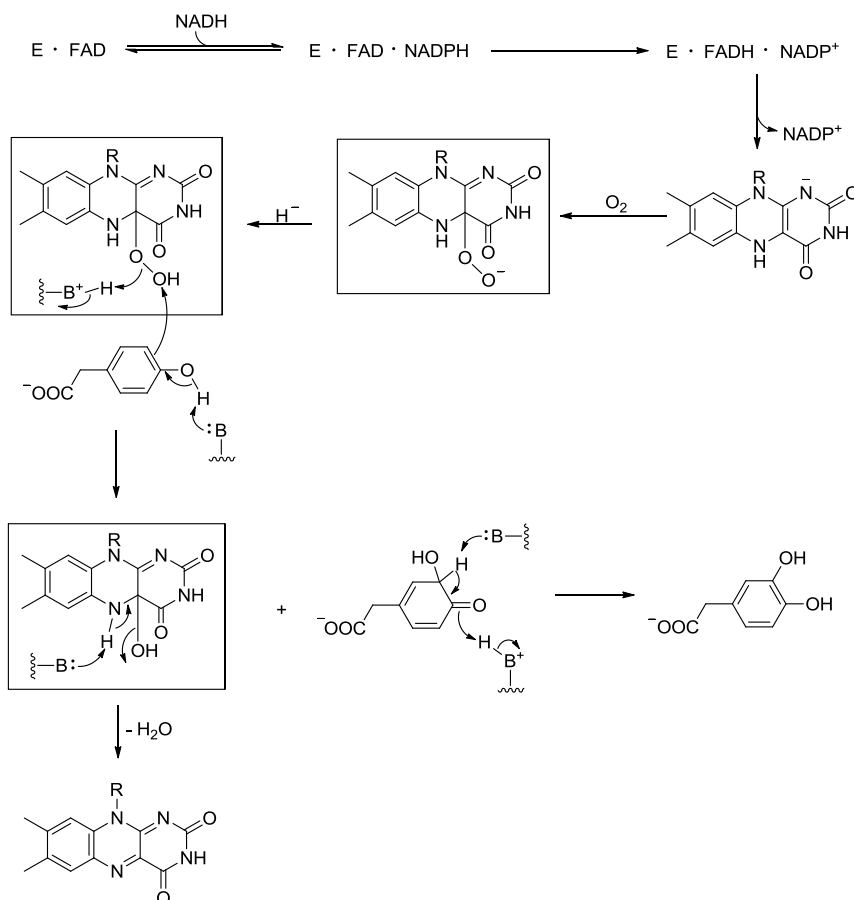
A fázis I oxidatív reakciók katalizálásában fontosabb szerepet játszó további enzimek a *nem hem-tartalmú*, ugyancsak *mikroszómális* lokalizációjú flavin-adenin-dinukleotid (FAD) tartalmú monooxygenázok (FMO enzimek). A flavin-tartalmú monooxygenázok flavin-adenin-dinukleotid (FAD), dioxigén (O_2) és NADPH kosubsztrátok jelenlétében képesek katalizálni a testidegen vegyületek oxidatív metabolizmusát. Ellentétben a CYP450 enzimekkel, melyek elsősorban szénatomon lejátszódó oxidációs folyamatokat katalizálnak, a flavin-dependens monooxygenázok preferáltan a nitrogén-, kén-, foszfor- és a szelénatomok oxidációs reakcióit katalizálják, de részt vesznek szénatomok oxidációs reakcióiban is. Néhány kivételtől eltekintve az FMO enzimek, mint elektrofil oxidáló katalizátorok funkcionálnak, ami megkülönbözteti őket a legtöbb más, flavoprotein oxidázoktól és monooxygenázoktól (lásd laktát-oxidáz).

A CYP450 izoenzimekkel ellentétben, az FMO enzimek csupán öt funkcionális formáját írták le emlősökben. A felnőtt emberi májban az FMO3 forma a legnagyobb mennyiségben expresszálandó izoenzim. Az FMO3 forma mellett további két minor forma (FMO4 és FMO5) található, melyek csak nagyon kis mennyiségben voltak kimutathatók. A további, extrahepatikusan expresszálandó formák közül az FMO1 forma érdemel említést, melynek expressziója elsősorban a vesében és a vékonybél mukoza sejtjeiben kifejezett.

A flavin-dependens enzimek oxigénaktiválásának mechanizmusa eltér a CYP 450 enzimek vasion részvételével lejátszódó oxigénaktiválásnak mechanizmusától. A katalitikus ciklus első lépésében az enzim FAD molekularésze NADPH felhasználásával $FADH^-$ -vá redukálódik, miközben az oxidált kofaktor ($NADP^+$) továbbra is az enzimhez kötve marad. A redukált $FADH^-$ dioxigénnel (O_2) gyorsan reagálva C4a-peroxiflavin származékává ($FADH-OOH$) alakul (VI-2. ábra).

A keletkező flavin-hidroperoxid intermedier két különböző típusú reakcióban vehet részt. Az egyik esetben a szubsztrát mint elektrofil, a másik esetben mint nukleofil partner vesz részt. Az elektrofil szubsztráttal lejátszódó reakciók egyik példája a VI.1. pontban bemutatott, laktát-oxidáz enzim által katalizált reakció. A nukleofil szubsztrátokkal lejátszódó reakciók egyik példája a *p*-hidroxifenilacetát-3-hidroziláz (EC 1.14.14.9.) által katalizált aromás hidrozilációja (VI-2. ábra.) Hasonóképpen, nukleofil szubsztrát hidrozilációját katalizálják a *p*-hidroxibenzoát-hidroziláz (E.C. 1.14.13.2.), a szalicilát-1-monooxygenáz (E.C. 1.14.13.1.), valamint a fenol-2-monooxygenáz (E.C. 1.14.13.7.) enzimek. Mindegyik enzim által katalizált reakció mechanizmusára általánosítható a *p*-hidroxifenilacetát-3-hidroziláz enzim által katalizált reakció VI-2. ábrán bemutatott mechanizmusa.

Amennyiben az enzim szubsztrátkötő helyéhez nukleofil szubsztrát kapcsolódik (pl. elektonküldő szubsztituenst hordozó aromás gyűrűt tartalmazó vegyület), úgy az nukleofil reaktánsként viselkedik a hidroperoxid „külső” oxigénatomjával szemben. A reakció eredményeképpen a C4a-hidroperoxiflavin molekularész C4a-hidroxilflavin származékká ($FAD-OH$) alakul és az aromás szubsztrát elektrofil szubsztitúciós reakciójának eredményeképpen megtörténik az aromás gyűrű hidroxilációja. A katalitikus ciklus befejező lépésében a $FAD-OH$ molekularész vízkilépéssel járó reakcióban redukált FAD-dá alakul (VI-2. ábra).

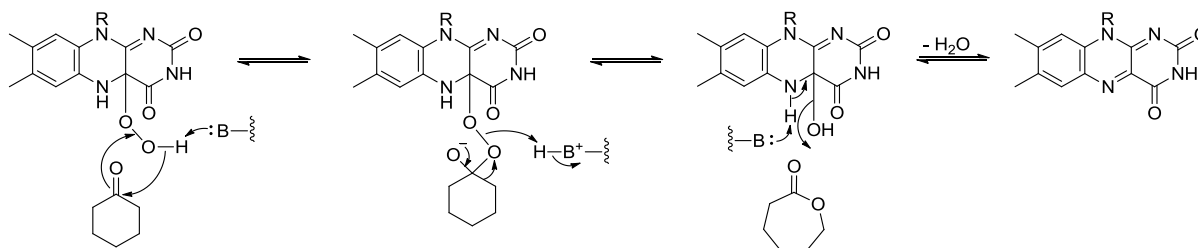
VI-2. ábra. A *p*-hidroxibenzoát-hidroxiáz enzim által katalizált aromás hidroxiációs folyamat mechanizmusa


VI.2.2 Keton-monooxygenáz enzimek

A flavin-dependens monooxygenázok egy különleges csoportját képezik a ketonok ún. Baeyer-Villiger oxidációját katalizáló enzimek. A Baeyer-Villiger oxidációt először *A. Baeyer* és *V. Villiger* írta le 1899-ben. A ketonok vagy aldehidek persavakkal lejátszódó reakciójában ketonok esetén észterek, aldehidek esetén karbonsavak képződése volt megfigyelhető. A Baeyer-Villiger oxidációk széles körben alkalmazott oxidálószerrei a hidrogén-peroxid és a *m*-klór-perbenzoesav. E persavak megfelelői a flavin-dependens monooxygenázok C_{4a}-peroxiflavin származékai (FADH-OOH).

A keton-monooxygenázok általánosan elfogadott működése az *Acinetobacter calcoaceticus* baktérium ciklohexanon-monooxygenáz (E.C. 1.14.13.22.) enzimjével kapcsolatos vizsgálatokon alapul. Az enzimkatalizált reakcióban a deprotonált C_{4a}-peroxiflavin anion nukleofilként viselkedik a szubsztrát karbonilcsoportjával szemben. A peroxid anion a karbonilcsoportra addicionálódva kialakítja az ún. Crieg-intermediert, melynek átrendeződésével jön létre a lakton és a 4a-hidroxi flavin. A katalitikus kör – az előzőekben leírtakhoz hasonlóan - víz eliminációjával, FAD keletkezésével és a termék szabaddá válásával zárul (VI-3. ábra). A ciklohexanon-monooxygenázok működési mechanizmusa modellként szolgál további, Baeyer-Villiger oxidációt katalizáló keton-monooxygenázok működésének értelmezéséhez.

VI-3. ábra. A keton-monooxygenáz enzimek által katalizált Baeyer-Villiger oxidáció mechanizmusa



VI.3 Irodalom

Smith and Williams' Introduction to the Principles of Drug Design and Action. (Editor: Smith H.J.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam (1998)

Novák L., Nyitrai J., Hazai L.: Biomolekulák kémiája. MKE, Budapest (2001)

Ádám V., Dux L., Faragó A., Fésüs L., Machovich R., Mandl J., Sümegi B.: Orvosi biokémia. Medicina Kiadó, Budapest (2001)

Silverman R.B.: The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions, Revised edition. Elsevier, London (2002)

Parkinson A.: Biotransformation of xenobiotics. In Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Seventh Edition. (Editor: Klaassen C.D.). McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY (2008)

Gyógyszerészi kémia. Szerk.: Fülöp F., Noszál B., Szász Gy., Takácsné Novák K. Semmelweis Kiadó, Budapest (2010)

A gyógyszerkutatók kémiája. Szerk. Keserű Gy. M. Akadémiai Kiadó, Budapest (2011)

Gyógyszerek. Szerk. Faigl F. Elektronikus tankönyv. BME, Budapest (2011)

Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., Zito S.W.: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2013)

Perjési P.: Gyógyszermetabolizmus és gyógyszertoxicitás. Elektronikus tananyag. PTE, Pécs (2014)

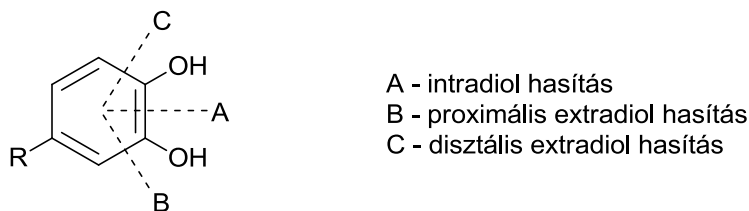
VII Oxidatív átalakulások. Dioxigenázok

A dioxigenázok a molekuláris oxigén (O_2) mindkét oxigénatomjának a szubsztrátba történő beépülését katalizáló enzimek. Az oxigénmolekula mindkét oxigénatomjának ugyanabba a molekulába történő beépülését az ún. *intramolekuláris dioxigenázok*, míg az oxigénmolekula két oxigénatomjának két különböző molekulába történő beépülését az ún. *intermolekuláris dioxigenázok* katalizálják. Az ide tartozó enzimek legtöbbször nem-hem vasionok részvételével működik. E tananyag csak a testidegen anyagok átalakulása szempontjából jelentősebb intramolekuláris dioxigenázokat tárgyalja.

VII.1 Pirokatechin-dioxigenáz

A *pirokatechin-dioxigenázok* (E.C. 1.13.11.) az aromás pirokatechin-származékok gyűrűhasadásal járó oxidációs reakcióit katalizálják. A pirokatechin-dioxigenázok két családba sorolhatók, attól függően, hogy az aromás gyűrű oxidatív felhasadása a két fenolos hidroxilcsoport között (*intradiol-dioxigenáz*), vagy az egyik fenolos hidroxilcsoporttal szomszédos helyzetben történik (*extradiol-dioxigenáz*). Az extradiol-dioxigenázok további két csoportba sorolhatók az alapján, hogy a felszakadó kötés az esetleges gyűrű szubsztituenshez közelebbi (*proximális*) vagy távolabbi (*disztális*) pozícióban helyezkedik el (VII-1. ábra).

VII-1. ábra. A pirokatechin-dioxigenáz enzimek által katalizált reakciók típusai



VII.1.1 Intradiol-dioxigenázok

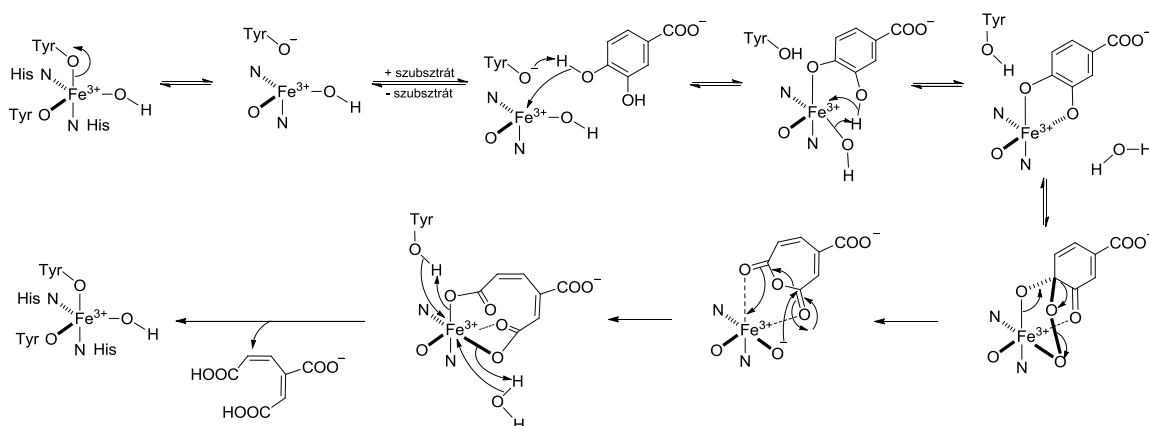
A pirokatechin-dioxigenázok közül az *intradiol-dioxigenázok* a legalaposabban tanulmányozott enzimek, amelyek aktív centrumukban vas(III)-iont tartalmaznak. Ebben a csoportban az egyik leginkább vizsgált enzim a *protokatechuát-3,4- dioxigenáz* (E.C. 1.13.11.3.), melyet a *Pseudomonas putida* nevű baktériumból izoláltak. Az enzim aktív helyén a vas(III)-ion helyezkedik el trigonális bipiramisos környezetben. Az öt ligandumból kettő hisztidin, kettő pedig tirozin, míg az ötödik koordinációs helyet az oldószerből származó hidroxilcsoport foglalja el.

Az enzim működési mechanizmusára utaló spektroszkópiai adatokból ismert, hogy a nagy spinszámú, központi vas(III)-ion megtartja +3-as oxidációs állapotát az teljes katalitikus ciklus alatt. A tapasztalatok szerint a dioxigén nem a fémionhoz kötődik (ellentétben a monooxigenázok esetében tapasztaltakkal), hanem az aktivált szubsztráton támad. A központi fémion szerepe tehát nem a dioxigén, hanem a szubsztrát aktiválásában van.

A katalitikus folyamat első lépésében a szubsztrát, 3,4-dihidroxibenzoát (protokatechuát), kétfogú ligandumként kötődik a központi vas(III)-ionhoz oly módon, hogy közben lezorítja a hidroxilcsoportot és az axiális helyzetű tirozint is. A komplexként aktivált szubsztrátot meg tudja támadni a dioxigén (O_2), létrehozva egy

átmeneti alkilperoxo-vas(III) komplexet. Az utóbbi ún. Criegee-típusú átrendeződésen keresztül mukonsavanhidrid-származékká alakul. A savanhidrid mellett keletkező Fe(III)-O⁻ részecske nukleofil támadást intéz az anhidrid ellen, melyből így nyílt gyűrűs dikarbonsav származék keletkezik (VII-2. ábra.)

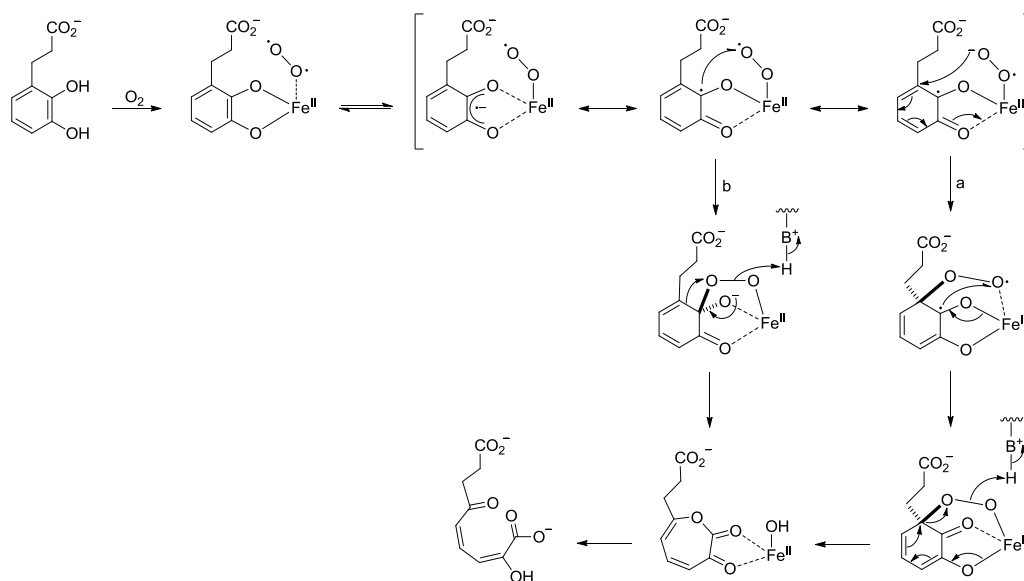
VII-2. ábra. A protokatechuát-3,4-dioxigenáz enzim által katalizált reakciók mechanizmusa.



VII.1.2 Extradiol-dioxigenázok

Az extradiol-dioxigenázok szintén vastartalmú, nem-hem-típusú metalloproteinek, de egyik fő különbség az intradiol-típusú dioxigenázokkal szemben, hogy az enzimek aktív helyén vas(II)- ion van, bár kis számban vannak mangán(II)-iont tartalmazó enzimek is. Az extradiol-dioxigenázok által katalizált reakciók során a molekuláris oxigén egyik atomja a hidroxilcsoportot hordozó szénhez kapcsolódva karboxilcsoportként, a másik oxigénatom a hidroxilcsoportot hordozó szénatom szomszéd szénatomjához kötődve karbonilcsoportként jelenik meg a termékben.

Hasonlóan az intradiol-típusú enzimekhez, a szubsztrát vas(II)-ionhoz történő koordinációja itt is megelőzi a dioxigén kötődését, ami viszont ebben az esetben a fémionhoz koordinálódik és nem a szubsztráton támad. A szubsztrát kötődése jelentősen megnöveli a dioxigén affinitását a fémionhoz, valószínűleg az vas(III)/vas(II) rendszer redoxipotenciáljának csökkenésén keresztül, amit a szubsztrát koordinálódása idéz elő. A katalitikus reakció első lépésében tehát a pirokatechin monoanionként koordinálódik az aktív helyen levő vas(II)-ionhoz, síknégyzetes piramisos geometriát alakítva ki a fémion körül. A szubsztrát kötődése után a dioxigén koordinálódik a központi fémionhoz, majd elektronvándorlás játszódik le a dioxigénről a vasion közvetítésével a szubsztrát irányába. A gyökös jellegű két molekularész között szén-oxigén kötés alakul ki. Az így keletkező hidroperoxid-származék Criegee-átrendeződésen keresztül a héttagú gyűrűs laktonszármazékhoz vezet, amely az extradiol hasítási termékre hidrolizál (VII-3. ábra).

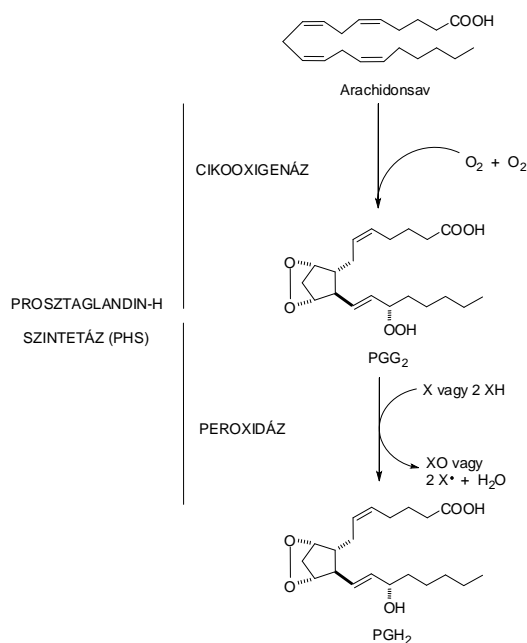
VII-3. ábra. Az extradiol-dioxigenázok által katalizált reakciók mechanizmusa.


VII.2 Prostaglandin H-szintáz

A prosztoglandin H-szintáz (PHS; E.C. 1.14.99.1.) a legrészletesebben vizsgált enzim a testidegen anyagok metabolizmusában résztvevő dioxigenázok között. Ez az enzim kétféle katalitikus aktivitással rendelkező hem-tartalmú fehérje:

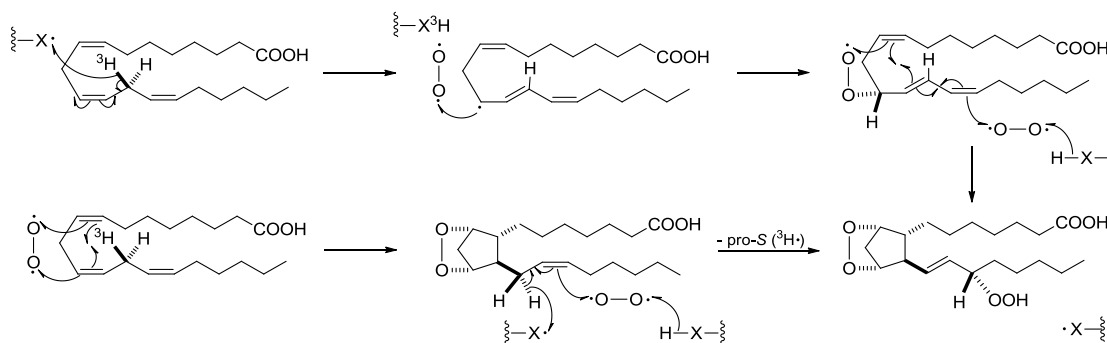
1. *bisz-dioxigenáz (ciklooxigenáz)*, ami az enzim endogén szubsztátját (arachidonsav, vagy $\Delta 5$ -dihidroarachidonsav (8,11,14-eikozatrién sav)) két dioxigén molekula (O_2) felhasználásával az endoperoxid-hidroperoxid prosztoglandin G_2 (PGG_2) – $\Delta 5$ kettős kötés hiányában PGG_1 - származékká alakítja; valamint
2. *hidroperoxidáz*, ami a testidegen anyag (X vagy HX) oxidációjának kíséretében a PGG_2 (PGG_1) molekulát a prosztoglandin H_2 (PGH_2) – $\Delta 5$ kettős kötés hiányában PGH_1 - molekulává konvertálja (VII-4 ábra).

VII-4. ábra. A prosztaglandin H-szintáz enzimek által katalizált reakciók.



A PHS enzimek által katalizált dioxigenáz reakciók két feltételezett mechanizmusát a VII-5. ábra mutatja be.

VII-5. ábra. A prosztaglandin H-szintáz enzim által katalizált dioxigenáz reakciók feltételezett mechanizmusai.



Az elsőként leírt mechanizmus szerint a katalitikus reakció első lépése a 13-*pro*(S)-hidrogénatom absztrakciója útján képződő pentadienil gyök molekuláris oxigénnel lejátszódó reakciója útján 11-(R)-peroxilgyök képződése. A peroxilgyök 5-*exo* gyűrűzárása egy C₈-centrumú gyököt eredményez. Ez utóbbi átmeneti termék újabb 5-*exo* gyűrűzárásával egy biciklusos peroxid és egy C₁₅-centrumú allilgyök képződik. Az allilgyök reakciója egy újabb molekuláris oxigénnel, majd a keletkező peroxilgyök redukciója prosztaglandin G₂-t, a ciklooxygenáz reakció termékét eredményezi. Az alternatív mechanizmus során a szubsztrát-endoperoxid képződése megelőzi a 13-*pro*(S)-hidrogénatom absztrakcióját (VII-5. ábra).

A keletkező hidroperoxid (PGG₁ vagy PGG₂) az enzim következő, hidroperoxidáz aktivitása által katalizált reakciók kosubsztrátja. A reakciók során a szubsztrát (X vagy HX) oxidációjával párhuzamosan a PGG₁/PGG₂ kosubsztrát PGH₁/PGH₂ származékká történő redukciója játszódik le. A PHS enzim – a peroxidáz enzimek között egyedülként – azzal a tulajdonsággal rendelkezik, hogy képes mind

hidroperoxid-származékot generálni, mind peroxidáz-dependens reakciót katalizálni. A PHS és más peroxidázok fontos szerepet játszanak a testidegen anyagok oxidatív transzformációjában elsősorban az extrahepatikus szervekben, szövetekben, ahol a citokróm P451 enzimek expressziója alacsony.

A peroxidázok (hasonlóan a PHS enzim is) hemoproteinek, melyek közeli rokonságot mutatnak a citokróm P450 enzimekével. A peroxidázok katalitikus ciklusában képződő erős elektrofil tulajdonságú $\text{Fe(V) = O}]^{3+}$ perferril-oxenoid átmeneti termék szerkezete analóg a citokróm P450 enzimek perferril-komplexéhez (lásd V-4. ábra).

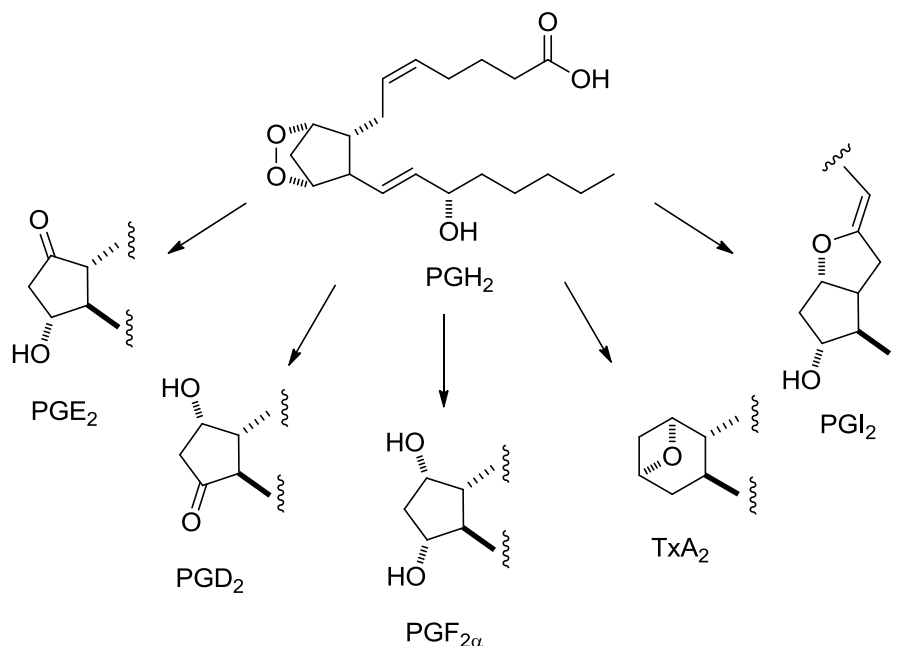
Bár a hidroperoxid kosubsztrát peroxid-oxigénjének a szubsztrát molekulára történő transzferje a leggyakoribb mechanizmusa a peroxidázok által katalizált reakcióknak, más mechanizmusok útján is lejátszódhat a reakció. Amint azt a VII.4. ábra mutatja a testidegen anyagok - pl. aromás aminok, fenolok, kinonok (XH) - elektron-donorként is részt vehetnek a reakciókban, és így azok a hidroperoxid redukációjával egyidejűleg szabadgyökké (X \cdot) oxidálódnak.

Az alkilhidroperoxid ebben az esetben is alkohollá redukálódik a reakcióban, de a peroxid-oxigén nem épül be a szubsztrát molekulába, hanem – a testidegen anyagtól kapott elektront átvéve – vízzé redukálódik. (Egy hidroperoxid molekula mindkét oxigén atomja egy-egy elektront vesz fel, így két testidegen molekula – egy-egy elektron leadásával – vesz részt a reakcióban.).

Gerincesekben a prosztaglandin H-szintáz enzimnek két izoformája ismert: a prosztaglandin H-szintáz-1 vagy *COX-1* és a prosztaglandin H-szintáz-2 vagy *COX-2*. A COX izoenzimek aminosav szekvenciája kb. 60%-ban egyezik meg. A COX-1 a konstitutív PGH_2 képzésért felelős, míg a COX-2 expressziót elsősorban különféle patológias folyamatok indukálják, melyek közt jelentős szerepet játszanak a gyulladási folyamatok.

A keletkező PGH_2 (PGH_1) kiindulási anyaga számos prosztaglandin-, tromboxán- és prosztaciklin-származéknak (VII-6. ábra). Utóbbiak közül a PGE_2 kiemelkedő szereppel bír a fájdalom, a gyulladás és a láz kialakulásában és potenciózza egyéb, a gyulladási folyamat során felszabaduló mediátorok – pl. hisztamin, szerotonin, bradikinin – hatását. Továbbá, a PGE_2 az érfal és a bronchusok simaizomsejtjeinek elernyedését, míg a PGF_{2a} a simaizomsejtek összehúzódását okozza.

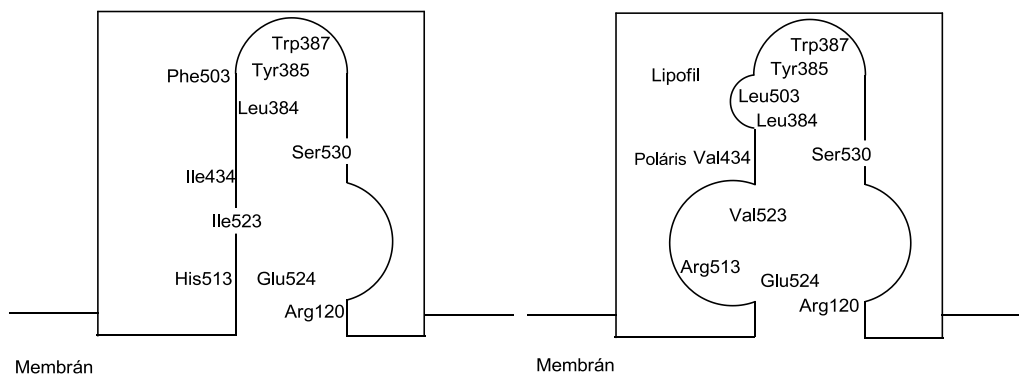
VII-6. ábra. A prosztaglandin H₂ továbbalakulásával képződő prosztaglandin-származékok.



1971-ben *J. Vane* és munkatársai kimutatták, hogy az acetilszalicilsav (aszpirin) és az indometacin kis koncentrációi meggátolják a prosztaglandin-G₂ (PGG₂) bioszintézist az enzim ciklooxygenáz aktivitásának gátlása révén (VII-4 ábra). *Vane* ezért a felfedezésért Nobel-díjban részesült (1982). A további kutatások igazolták, hogy a különböző kémiai szerkezettel rendelkező nem-szteroid gyulladásgátló vegyületek hatásmódjukban megegyeznek: valamennyi gátolja a ciklooxygenáz (COX) enzimet. A kutatások következő fázisa igazolta, hogy a vegyületek többsége gátolja mind a konstitutív COX-1-et, mind az indukálható COX-2 enzimet. A COX-2 gátlása eredményezi – legalábbis részben – a vegyületek gyulladásgátló, fájdalomcsillapító és lázcsillapító hatását, míg a COX-1 gátlása a felelős elsősorban a vegyületek ulcerogén mellékhatásáért.

Az aminosav sorrendben kimutatható eltérések miatt a katalitikus csatorna a COX-2 esetében sokkal tágasabb és flexibilisebb, mint a COX-1 esetében. A rövidebb valószínűleg a COX-2 enzim esetén a szűk csatorna alakú területen hozzáférhetővé tesz egy oldalsó „kiegészítő „kötőseb részletet” (VII-7. ábra). E szerkezeti különbség megismerése tette lehetővé a szelektív COX-2 szerek tervezését és fejlesztését. A szelektív és nem-szelektív COX-gátlók az ún. nem-szteroid gyulladáscsökkentők népes farmakológiai családját képezik.

VII-7. ábra. A COX-1 és COX-2 enzimek kötőhelye



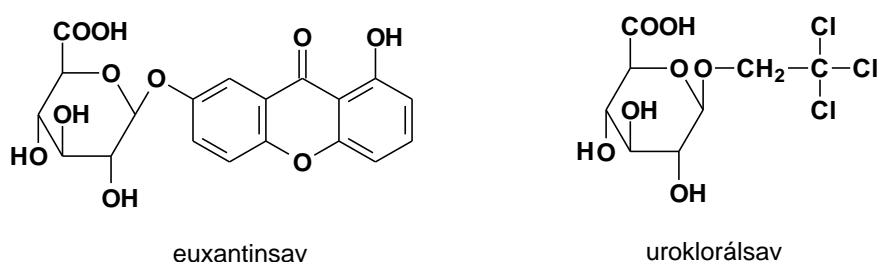
VII.3 Irodalom

- Smith and Williams' Introduction to the Principles of Drug Design and Action. (Editor: Smith H.J.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam (1998)
- Novák L., Nyitrai J., Hazai L.: Biomolekulák kémiája. MKE, Budapest (2001)
- Ádám V., Dux L., Faragó A., Fésüs L., Machovich R., Mandl J., Sümegi B.: Orvosi biokémia. Medicina Kiadó, Budapest (2001)
- Silverman R.B.: The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions, Revised edition. Elsevier, London (2002)
- Parkinson A.: Biotransformation of xenobiotics. In Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Seventh Edition. (Editor: Klaassen C.D.). McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY (2008)
- Gyógyszerészi kémia. Szerk.: Fülöp F., Noszál B., Szász Gy., Takácsné Novák K. Semmelweis Kiadó, Budapest (2010)
- A gyógyszerkutatás kémiája. Szerk. Keserű Gy. M. Akadémiai Kiadó, Budapest (2011)
- Gyógyszerek. Szerk. Faigl F. Elektronikus tankönyv. BME, Budapest (2011)
- Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., Zito S.W.: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2013)
- Perjési P.: Gyógyszermetabolizmus és gyógyszer toxicitás. Elektronikus tananyag. PTE, Pécs (2014)

VIII Glükuronsav-konjugáció

A glükuronsav-konjugáció a legfontosabb Fázis II reakciónak tekinthető. Jelentősége elsősorban a máj magas glükuronsav kínálatának, valamint a konjugáció szempontjából számításba vehető funkciós csoportokkal (pl. karboxil-, hidroxil-, merkpto- és aminocsoport) rendelkező gyógyszervegyületek/metabolitok nagy számának tulajdonítható. Az elsőként szerkezetileg jellemzett glükuronsav-konjugátum a mangólevelet fogyasztó tehének vizeletéből izolált *euxantinsav* volt (VIII-1. ábra). Az emberi vizeletből elsőként izolált glükuronid-konjugátum az *uroklorálsav* volt (VIII-1. ábra), melynek leírása *J. Von Mering* és *F. Musculus* nevéhez fűződik. A szerzők klorálhidráttal kezelt egyének vizeletéből mutatták ki a vegyületet.

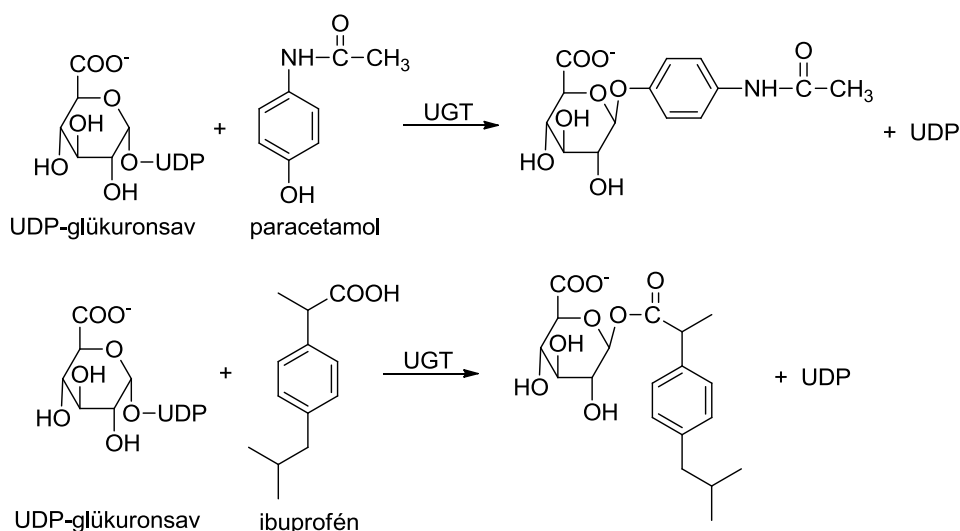
VIII-1. ábra. Az euxantinsav és uroklorálsav szerkezeti képletei.



VIII.1 Mechanizmus

A glükuronid-konjugáció molekuláris mechanizmusának megismerésében alapvető jelentőséggel bír *G.J. Dutton* és *I.D.E. Storey* munkássága, akik leírták az uridin-difoszfoglükuronsav (*UDP-glükuronsav*) kofaktor szerepét a glükuronidálási folyamatokban (1953). Az *UDP-glükuronsav* a szervezetben az *UDP-glükóz* *UDP-glükóz dehidrogenáz* (E.C. 1.1.1.22.) enzim által katalizált reakcióban képződik. A glükuronid-konjugáció általános reakcióútját, a paracetamol és az ibuprofén glükuronid-konjugátuma képződésének példáján, a VIII-2. ábra mutatja be.

VIII-2. ábra. A paracetamol és az ibuprofén glükuronsav-konjugátummá történő átalakulásának *UDP-glükuronil-transzferáz* (UGT) enzimek által katalizált reakciója.



Az aktivált glükuronsav (*UDP-glükuronsav*) és az akceptor vegyület (példáncban a paracetamol) közötti reakciót az *UDP-glükuroniltranszferáz* (UGT; E.C. 2.4.1.) enzimek katalizálják (VIII-2 ábra). Az UGT enzimek, a CYP450 enzimekhez hasonlóan, egy több gén által kódolt enzimes család tagjai, melyek a máj, a bélfal epithel sejtek, és néhány további extrahepatikus szövet (pl. vese, agy, tüdő) endoplazmatikus retikulum membránjában lokalizálódnak. A CYP450 és az UGT enzimek e speciális lokalizációja igen jelentős szerepet tölt be a CYP450 enzimek által katalizált reakciókban képződő reaktív (elektrofil) metabolitok semlegesítésében azokban a szervekben, szövetekben, ahol mind a CYP450, mind az UGT enzimek expresszálódnak.

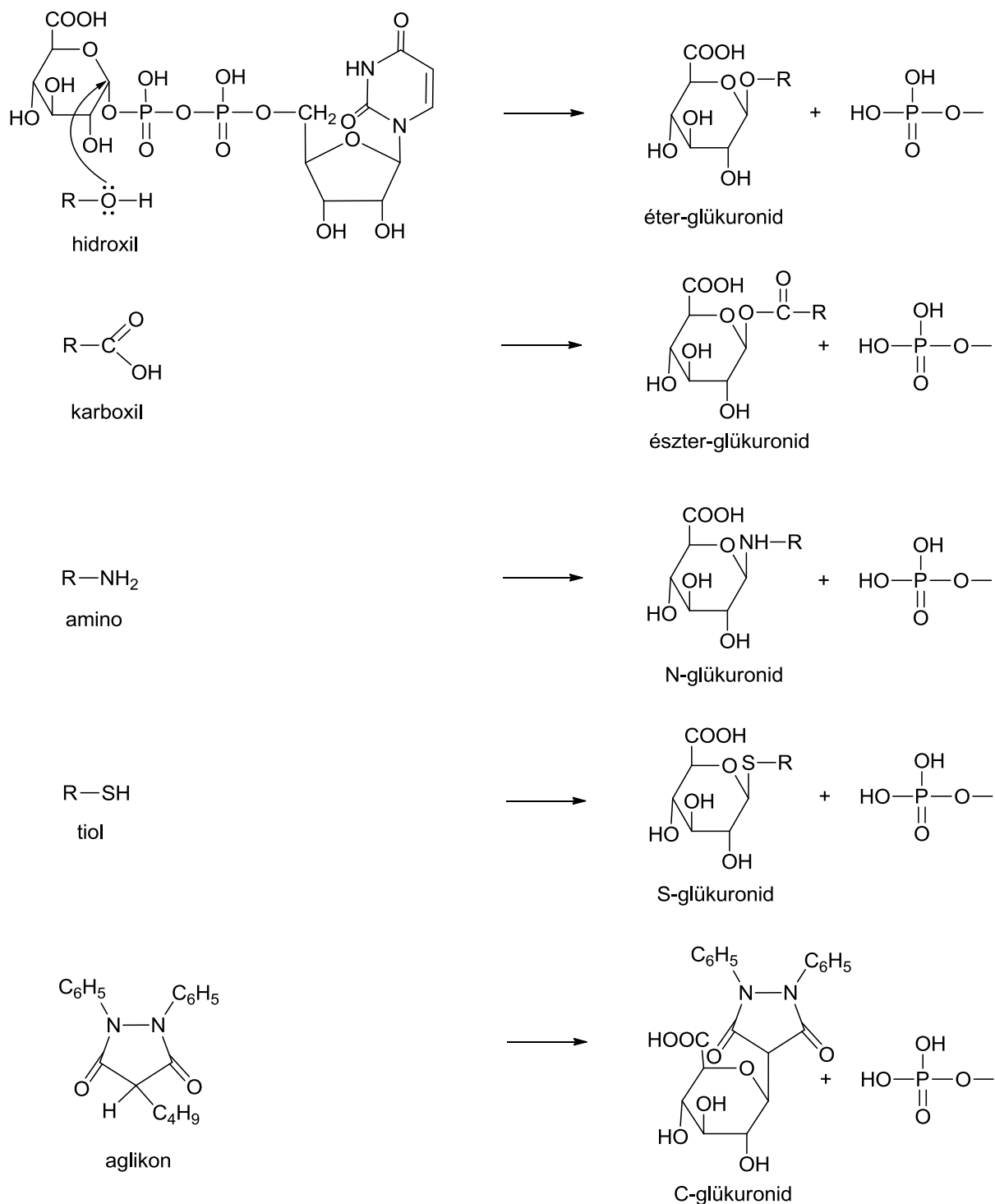
A CYP450 enzimekhez hasonlóan, az aminosav sorrend hasonlósága alapján az UGT enzimek is családokba, illetve alcsoportokba oszthatók. A humán UGT enzimek két családba, UGT1 (UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10) és UGT2 (UGT2A1, UGT2A2, UGT2A3, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17, UGT2B28) sorolhatók. A humán UGT enzimek mindegyike számos testidegen anyag konjugációját katalizálja, és egy adott xenobiotikum általában több UGT enzim szubsztrátja.

Az UGT enzimek szubsztrátjai között szerepelnek endogén vegyületek, mint például a bilirubin, a retinoidok, a pajzsmirigy hormonok, a szteroid hormonok és a katekolaminok. Emellett számos xenobiotikum, többek között gyógyszerek és a kémiai karcinogének jelentős része inaktiválódik glükuronsavas konjugáció segítségével. Az endogén szubsztrátok között a hem lebontásának végtermékét, a bilirubint vizsgálták leginkább. Mivel a bilirubin magas koncentrációban agy- és vesekárosodást okoz, kiürítése létfontosságú. Napjainkban a bilirubin metabolizmusának két olyan örökölt rendellenessége (Criegler-Najjar szindróma és Gilbert szindróma) ismert, melyek elsődleges oka az UGT1 enzimek hiánya, vagy csökkent működése (*genetikai polimorfizmus*). Az újszülöttek glükuronid-képzési képessége csak lassan alakul ki a születés után, emiatt a bilirubin metabolizmusa és kiürülése is gátolt. Ekkor alakul ki az újszülött sárgasága. Újabban kimutatták, hogy 425–475 nm hullámhosszú fény besugárzásával csökkenthető a bilirubin koncentrációja.

Az UGT enzimek szubsztrátjainak közös szerkezeti jellegzetessége, hogy reaktív nukleofil centrummal rendelkeznek, melyek részvételével lejátszódik VIII-2. ábrán bemutatott szubsztitúciós reakció. A szubsztrátok (a) *hidroxil* csoporttal (alkoholok, fenolok, enolok, N-hidroxilaminok), (b) *karboxil* csoporttal (aromás karbonsavak, arilalkil karbonsavak), (c) *aminoc* csoporttal (aromás aminok, alifás aminok, savamidok, szulfonamidok), (d) *tiol* csoporttal (pl. metimazol, propiltiouracil), vagy (e) lazított hidrogénatomot hordozó szénatommal (pl. fenilbutazon, szulfipirazon) rendelkező vegyületek. A különböző funkciós csoporttal lejátszódó reakciók egyszerűsített egyenleteit a VIII-3. ábra mutatja be.

A glükuronid-konjugátumok poláris, vízben jól oldódó metabolitok, melyek az epével, vagy a vizelettel ürülnek ki a szervezetből. A legtöbb metabolit kevésbé toxikus mint a konjugációban résztvevő gyógyszervegyület (xenobiotikum). A karboxil csoporttal bíró vegyületek glükuronsav-konjugátumai (észterkötéses O-glükuronidok) között azonban ismertek toxikus tulajdonságokkal rendelkező metabolitok (pl. a diklofenák glükuronid-származéka).

VIII-3. ábra. Az UGT enzimek legfontosabb funkciós csoportokkal rendelkező szubsztrátjai glükuronsav-konjugátummá történő átalakulásának reakciói.

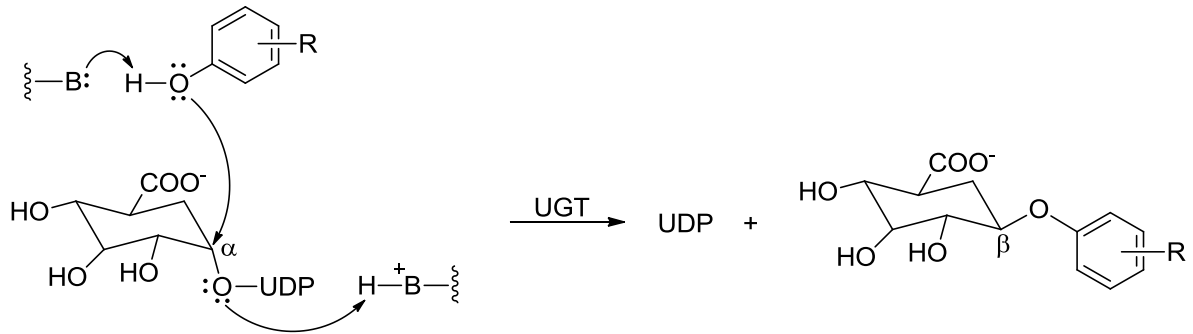


VIII.2 Sztereokémia

A humán UDP enzimek által katalizált reakciók lejátsszódása során a az UDP-glükuronsav kosubsztrát anomer szénatomjának konfigurációja minden esetben ellentétessé válik, a reakció lejátsszódása az aszimmetriás szénatom inverziójával jár

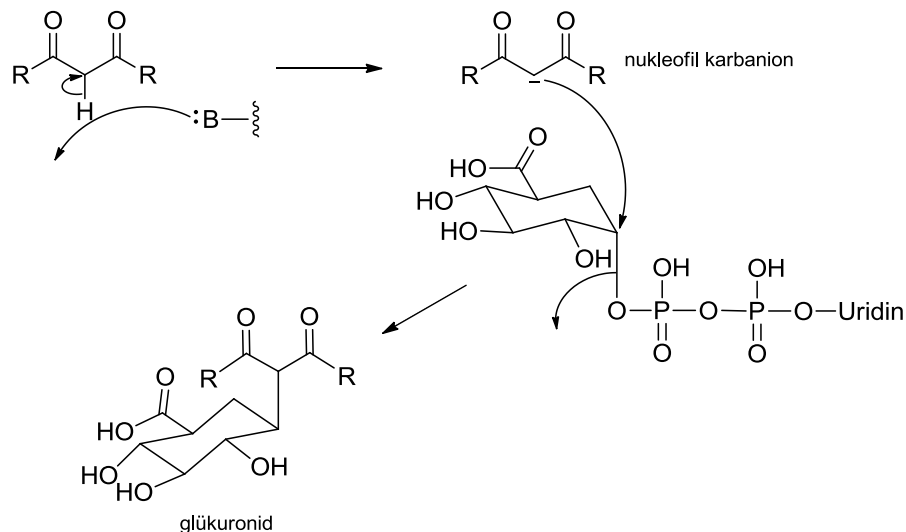
(VIII-2. ábra). E tapasztalat alapján *J. Axelrod* a reakciót a kosubsztrát és a szubsztrát (testidegen anyag) között lejátszódó S_N2 mechanizmus alapján lejátszódó reakcióként értelmezte (1958). A későbbi vizsgálatok eredményei alátámasztották *Axelrod* feltételezését. A szubsztrát kötőhely környezetében lévő hisztidin aminosav egység a szubsztrát deprotonálódását, és ennek eredményeképpen nukleofil erejének megnövekedését eredményezi.

VIII-4. ábra. Az UGT enzimek legfontosabb funkciós csoportokkal rendelkező szubsztrátjai glükuronsav-konjugátummá történő átalakulásának reakciói.



A glükuronsav-konjugációs reakciók egy speciális esetét képviseli a *fenilbutazon* és a *szulfipirazon* glükuronsav-konjugátumának képződése. Mindkét vegyület 4-szubsztituált-1,2-difenil-pirazolidin-3,5-dion-származék. A 3,5-dion (1,3-dikarbonil) szerkezet nagymértékben lazítja a C_4 -H kötést, így a pirazolidin-3,5-dion származékok az alifás karbonsavakéhoz közelítő aciditású savak. A *fenilbutazon* savassága ($\log K=4,8$) megfelel a szintén 1,3-dikarbonil szerkezetű 5-etilbarbitursavénak, melynél $\log K=4,4$. Bár a reakciók lejátszódásának minden részlete nem ismeretes, feltételezhető, hogy az S_N2 reakció az UDP-glükuronsav foszforsavval észteresített a félacetálos hidroxilcsoportját hordozó elektrofil szénatom és a *fenilbutazon* (vagy *szulfipirazon*) 4-es helyzetű szénatomjának deprotonálódásával keletkező karbanion között játszódik le (VIII-5. ábra).

VIII-5. ábra. Az UGT enzimek legfontosabb funkciós csoportokkal rendelkező szubsztrátjai glükuronsav-konjugátummá történő átalakulásának reakciói.

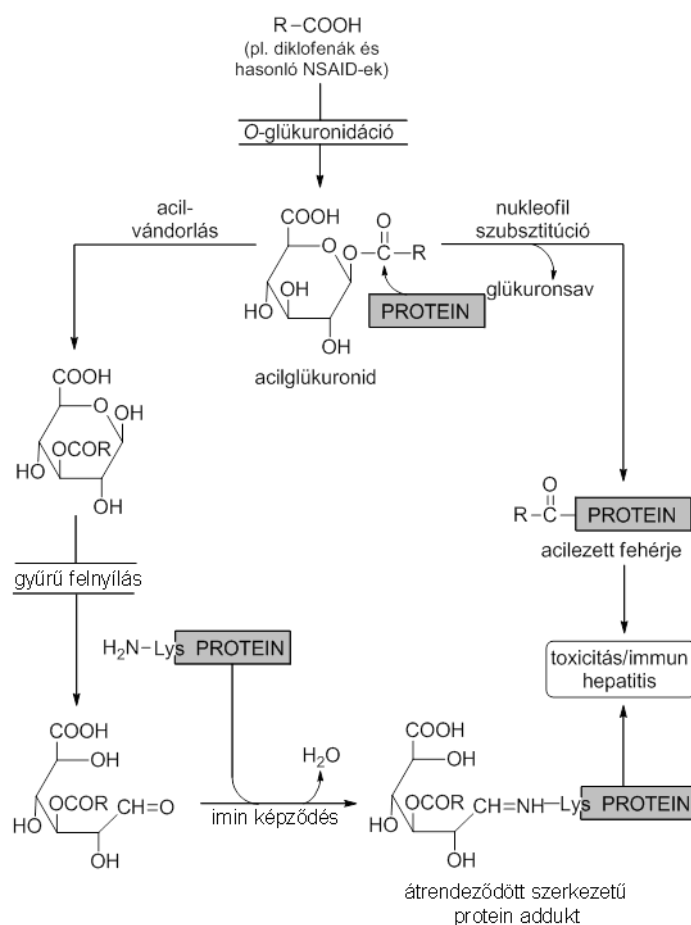


Az észter-típusú glükuronid-konjugátumok nukleofil centrumokkal lejártszódo reakciói toxikus hatások molekuláris alapját képezhetik. Így például, a diklofenák idioszinkráziás hepatotoxicitás kialakulásának molekuláris hátterét többek között a diklofenák-glükuronid további átalakulásai képezhetik. Ezek között megemlítenő, hogy

- a konjugátum intramolekuláris átrendeződés (acilvándorlás) eredményeképpen izomer acil-glükuronidokká alakulhat át, és
- a konjugátum (mint reaktív acilezőszer) a fehérjék nukleofil centrumaival kovalens kapcsolatot alakíthat ki (átacilezés).

A két molekuláris átrendeződést és a keletkező izomerek fehérjékkel lejártszódo reakciót a VIII-6. ábra mutatja be.

VIII-6. ábra: A diklofenák-glükuronid reakciója fehérjékkel



VIII.3 Irodalom

- Smith and Williams' Introduction to the Principles of Drug Design and Action. (Editor: Smith H.J.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam (1998)
- Novák L., Nyitrai J., Hazai L.: Biomolekulák kémiája. MKE, Budapest (2001)
- Ádám V., Dux L., Faragó A., Fésüs L., Machovich R., Mandl J., Sümegi B.: Orvosi biokémia. Medicina Kiadó, Budapest (2001)
- Silverman R.B.: The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions, Revised edition. Elsevier, London (2002)

- Parkinson A.: Biotransformation of xenobiotics. In Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Seventh Edition. (Editor: Klaassen C.D.). McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY (2008)
- Gyógyszerészi kémia. Szerk.: Fülöp F., Noszál B., Szász Gy., Takácsné Novák K. Semmelweis Kiadó, Budapest (2010)
- A gyógyszerkutatás kémiája. Szerk. Keserű Gy. M. Akadémiai Kiadó, Budapest (2011)
- Gyógyszerek. Szerk. Faigl F. Elektronikus tankönyv. BME, Budapest (2011)
- Jancová P., Siller M.: Phase II drug metabolism. In Topics on drug metabolism (Editor: Paxton J.) Intech (2012) (<http://www.intechopen.com/books/topics-on-drug-metabolism>)
- Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., Zito S.W.: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2013)
- Perjési P.: Gyógyszermetabolizmus és gyógyszertoxicitás. Elektronikus tananyag. PTE, Pécs (2014)

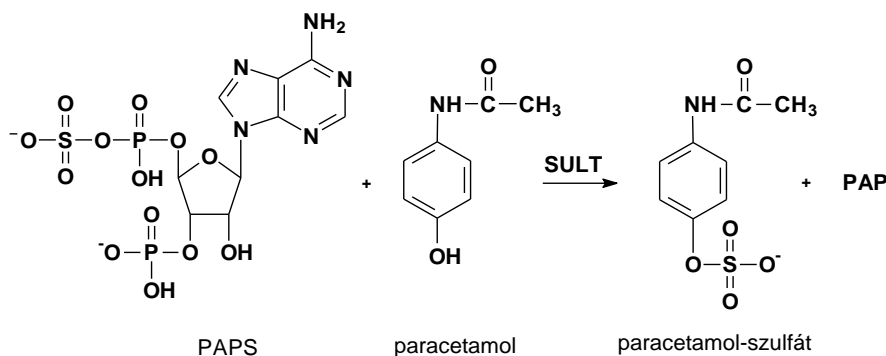
IX Szulfonát konjugáció

A szulfonát-konjugáció (szulfonálás) a második leggyakoribb átalakulás a Fázis II reakciók között. A szulfonálás igen fontos metabolikus átalakulási reakciója többek között a szteroid hormonoknak, az epesavaknak, a pajzsmirigyhormonoknak, a katecholamin neurotranszmittereknek, valamint a fenol funkciós csoporttal rendelkező gyógyszervegyületeknek és egyéb testidegen anyagoknak. A szulfonát-konjugátumok fiziológiai szempontból legfontosabb tulajdonsága azok megnövekedett vízdékonysága és kiválasztódása, mivel a keletkező szulfátészterek pKs értéke 1-2 közötti érték. (Így a konjugátumok fiziológiás körülmények között teljesen ionizált formában találhatók.) Néha azonban a szulfonát-konjugáció reaktív (toxikus) elektrofil részek képződését eredményezi.

IX.1 Mechanizmus

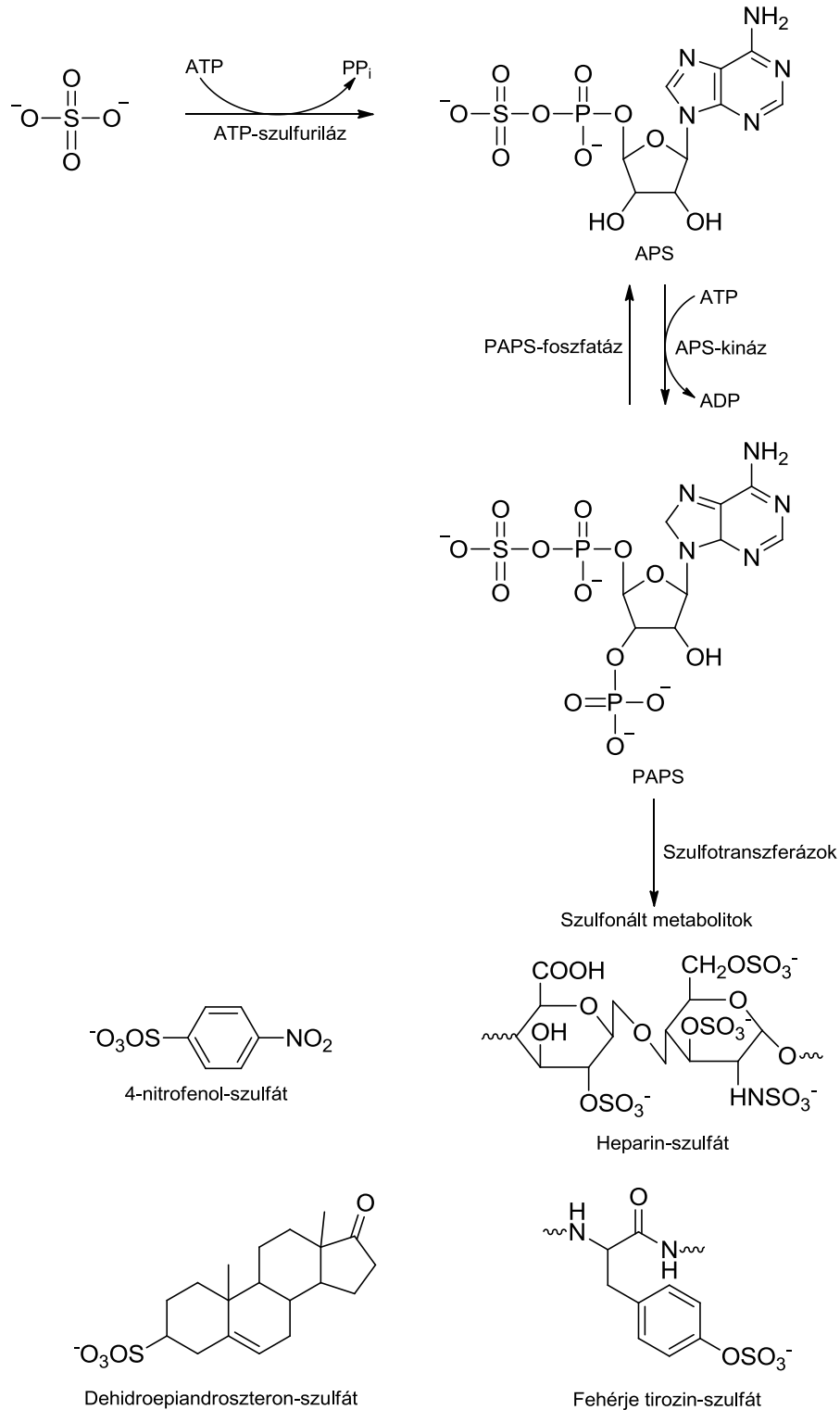
A szulfonát-konjugáció felfedezése a benzol és oxidált származéka, a fenol szerkezetben lejátszódó metabolizmusának vizsgálatához kapcsolódik. Antiszeptikumként alkalmazott fenollal kezelt betegek vizeletéből elsőként *E. Baumann* izolálta és azonosította a fenol szulfonátát-konjugátumát (1876). Bár a metabolikus átalakulás meglehetősen régóta ismert, a szulfonát-konjugáció mechanizmusát, illetve abban a *szulfotranszferáz (SULT)* enzimek és a *3'-foszfoadenozin-5'-foszfoszulfát (PAPS)* kofaktor szerepét csak az 1950-es évektől kezdődően írták le. A szulfonát-konjugáció általános reakcióútját - a paracetamol szulfonát-konjugátuma képződésének példáján - a IX-1. ábra mutatja be.

IX-1. ábra. A paracetamol szulfonát-konjugátummá történő átalakulásának szulfotranszferáz (SULT) enzimek által katalizált reakciója.



Az aktivált szulfát (3'-foszfoadenozin-5'-foszfoszulfát - PAPS) szerves szulfát és ATP reakciójában, kétlépéses reakcióban képződik. Az első - *ATP szulfuriláz* (E.C. 2.7.7.4.) enzim által katalizált - reakcióban a szerves szulfát és ATP reakciójában adenzin-5'-foszfoszulfát (adenil-szulfát) képződik, ami a foszfoadenozin-foszfoszfát enzimkomplex második tagja, az *adenozin-5'-foszfoszulfát-kináz* (E.C. 2.7.1.25.) enzim által katalizált reakcióban - egy következő ATP molekulával reagálva - 3'-foszfoadenozin-5'-foszfoszulfáttá (PAPS) alakul (IX-2. ábra).

IX-2. ábra. Az aktív szulfát (PAPS) szintézise és részvétele a szulfonát-konjugátumok képződésében.



Az aktivált szulfát (PAPS) és az akceptor vegyület közötti reakciót a szulfotranszferáz enzimek katalizálják (IX-2. ábra). A metabolikus transzformáció leírására az irodalomban gyakran találkozhatunk a szulfát-konjugáció kifejezéssel is.

Amint azonban az ábrán látható, a szulfátkonjugáció kifejezés egy szulfonát ($-\text{SO}_3^-$) és nem egy szulfát (SO_4^{2-}) átvitelét jelenti a PAPS-ről a szubsztrát molekulára. A SULT enzimek a szulfonátcsoportnak hidroxilcsoportokra és aminocsoportokra történő átvitelét katalizálják. Az SULT enzimek több gén által kódolt enzimes család tagjai, melyek két nagy csoportba sorolhatók:

(1) *Membránhoz kötött SULT enzimek*, melyek a sejtek Golgi apparátusában lokalizálódnak és endogén peptidek, proteinek, lipidek és glükóz-aminoglikánok szulfonálását katalizálják, valamint

(2) Elsősorban a máj, a bélfal epithel sejtek, a vese, az agy, és a vérlemezkék *citoszoljában lokalizálódó SULT enzimek*, melyek a testidegen anyagok és kis molekulatömegű endogén szubsztrátok (szexuáliszteroidok, epesavak, neurotranszmitterek) szulfonálását katalizálják.

Jelen tananyag keretében csak az utóbbi csoportba tartozó enzimek által katalizált folyamatok kerülnek bemutatásra.

A citoszolban lokalizálódó SULT (EC.2.8.2.) enzimek emlősökben hat géncsaládba (SULT1 – SULT6) csoportosíthatók. Az egy géncsaládba tartozó enzimek legalább 45% aminosav homológiát mutatnak. A SULT3 családba tartozó enzimek ezideig halakban, madarakban, kétéltűekben, emlősökben, a SULT5 családba tartozó SULT5A1 rágcsálókban, nyúlban, kétéltűekben, halakban, míg a SULT6 családba tartozó enzimek számos emlősben, madárban és halban voltak ezideig megtalálhatók. Emberben a SULT1, a SULT2 és a SULT4 családba tartozó szulfotranszferázok voltak ezideig megtalálhatók.

Az egyes családokba tartozó szulfotranszferázok aminosav homológiájuk alapján alcsaládokba csoportosíthatók. Az egy alcsaládba tartozó individuális enzimek legalább 60%-os homológiát mutatnak. Ez alapján a SULT1 családba tartozó enzimek öt alcsaládba (SULT1A - SULT1E), a SULT2 családba tartozó enzimek két alcsaládba (SULT2A és SULT2B) sorolhatók. A SULT4 családba tartozó enzimek egy alcsaládot (SULT4A1) alkotnak. A SULT1A2, SULT1A3 és SULT1A5 izoenzimek katalizálják számos fenolos gyógyszervegyület (pl. paracetamol), a szteroid hormonok, és a katecholamin hormonok szulfonálását. A SULT1B1 preferáltan a pajzsmirigyhormonok, a SULT1E1 az ösztradiol (E2) és az ösztron (E1) szulfonát-konjugációját katalizálja.

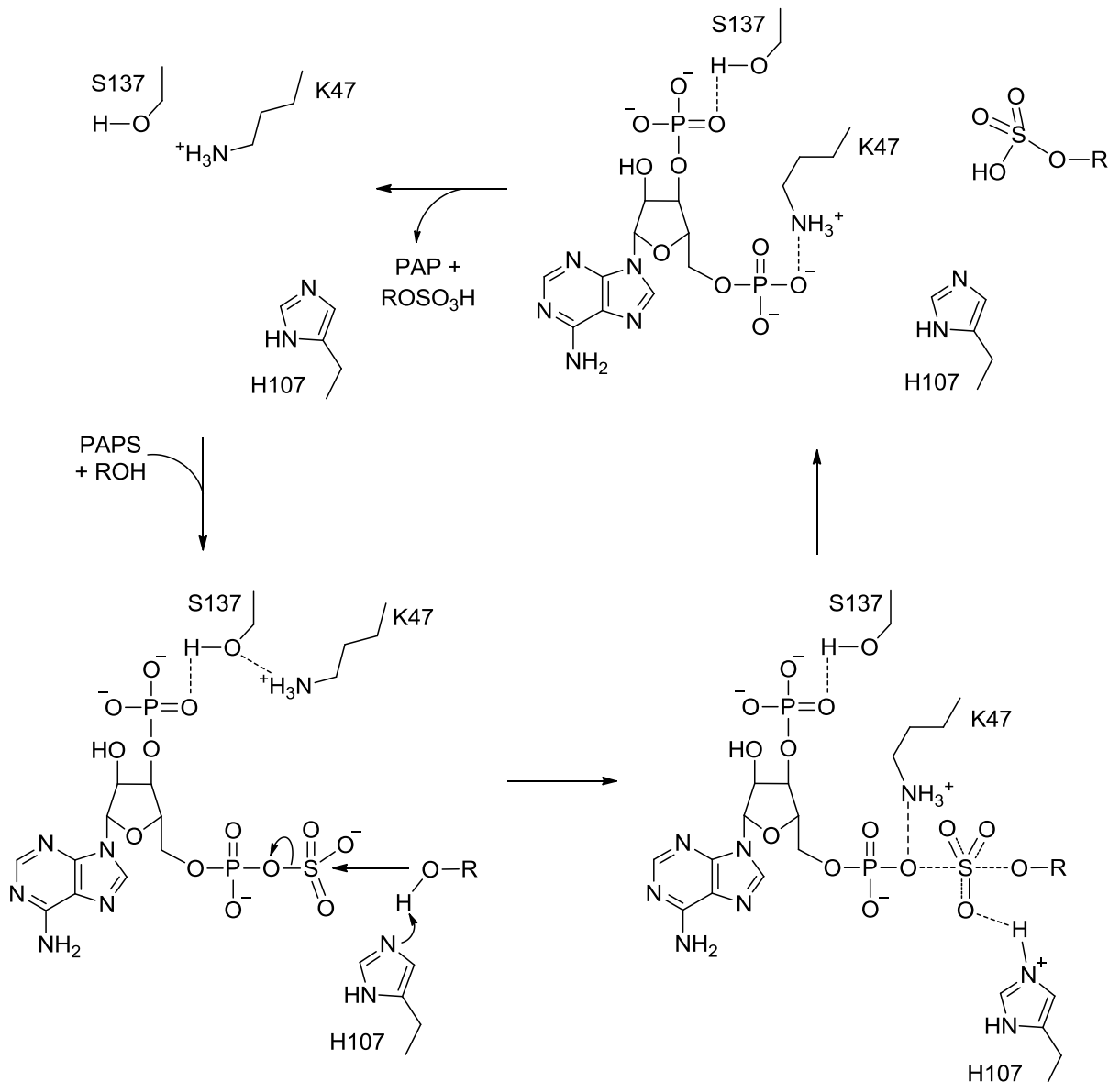
A szulfonát-konjugáció elsődlegesen a fenolos vegyületek metabolikus transzformációs reakciója. A PAPS, illetve a szerves szulfát kínálat a reakciók sebességét meghatározó tényezők. A szulfát kínálat általában alacsony, ezért az könnyen kimeríthető. A gyógyszervegyület növekvő dóziséval a szulfonát-konjugáció dominanciája csökken. A szerves szulfát mellett szerves szulfát prekursorok (L-metionin, L-cisztein) is növelik a celluláris PAPS szintet. Alacsony PAPS, szerves szulfát, és kéntartalmú aminosav szintek, illetve magas fenolos gyógyszervegyület koncentrációk esetén a fenolos funkció szulfonálása helyett annak kompetitív metabolikus átalakulásai, így a glükuronsav-konjugáció, illetve az O-metilázás kerülnek előtérbe.

IX.2 Sztereokémia

A SULT enzimek által katalizált reakciók molekuláris mechanizmusának vizsgálatáról elsőként megjelent közlemények kinetikai mérésekkel azt igazolták, hogy a szulfonát-transzfer egy lépésben játszódik le. A szubsztrát (R-OH) és a kosubsztrát (PAPS) kötődését követően a szulfonát-transzfer egy $\text{S}_{\text{N}}2$ -folyamatban játszódik le. Az

ösztadiol (E2) szulfonálását katalizáló SULT1E1 (E.C. 2.8.2.4.) enzim röntgendiffrakciós módszerrel meghatározott szerkezete alapján az enzim által katalizált reakció feltételezett molekuláris mechanizmusát a IX-3. ábra mutatja be. A reakció során a szubsztrát hidroxilcsoportjának az enzim H107 hisztidin aminosav egységével történő kölcsönhatása eredményeképpen megnövekedett nukleofil erővel bíró oxigénatomja nukleofil támadást indít a vegyes anhidrid terminális kénatomja felé, aminek eredményeképpen egyidejűleg megtörténik a vegyes anhidrid O-S kötésének felszakadása és a szulfonát molekularésznek a szubsztrát oxigénatomhoz történő kovalens kötődése.

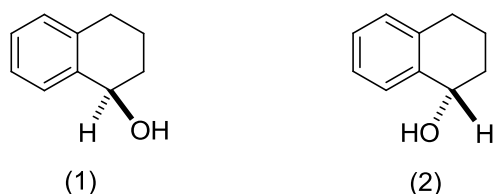
IX-3. ábra. A SULT1E1 enzim által katalizált reakciók feltételezett mechanizmusa



A fenti, feltételezett mechanizmust királis benzilalkohol szubsztrátokkal végzett kísérletek eredményei is alátámasztották, melyek során megállapították, hogy a kiindulási benzilalkohol konfigurációja a reakció során változatlan marad. A

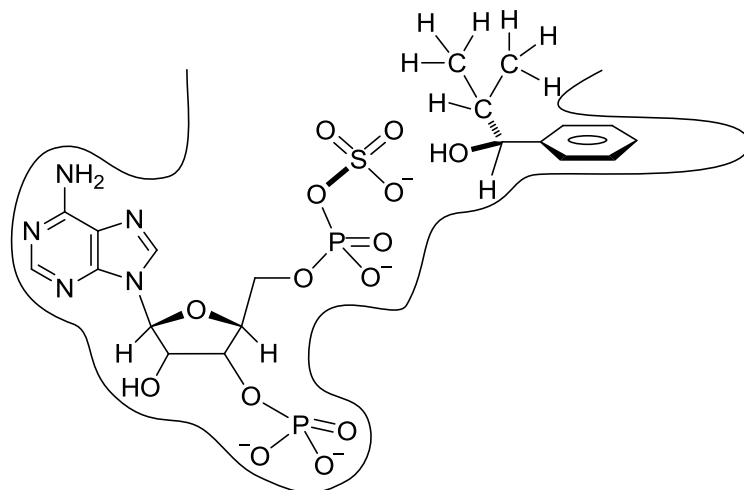
vizsgálatok igazolták, hogy a benzilalkohol szubsztrát (Ar-(CHR)-OH) aromás molekularészének mérete és lipofil karaktere erős befolyást gyakorol az enantiomer benzilalkohol-származékok kötődésére és a reakciók sebességére. Így például az (R)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftol (**1**) az aril-szulfotranszferáz IV (SULT1A1; E.C. 2.8.2.1.) enzim szubsztrátjaként, míg az enantiomer (S)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftol (**2**) az enzim kompetitív inhibitoraként írták le (IX-4. ábra).

IX-4. ábra. Az (R)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftol (**1**) és az (S)-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftol (**2**) szerkezete és térszerkezete



További rokon szerkezetű vegyületek összehasonlító vizsgálata alapján megállapítható volt, hogy a flexibilis hidrofób szubsztrátkötőhely – ellentétben a PAPS kötőhellyel – számos aromás benzilalkohol-származék kötődését teszi lehetővé. Ugyanakkor, a PAPS specifikus kötődésének eredményeképpen, a szubsztrát hidroxilcsoportjának térállása (a szubsztrát konfigurációja) erőteljesen befolyásolja a szulfonát-transzfer lejátszódását. A kísérleti tapasztalatokkal megegyező kötődési modellt - (S)-2-metil-1-fenil-1-propánnal, mint szubsztráttal ábrázolva - a IX-5. ábra mutatja be.

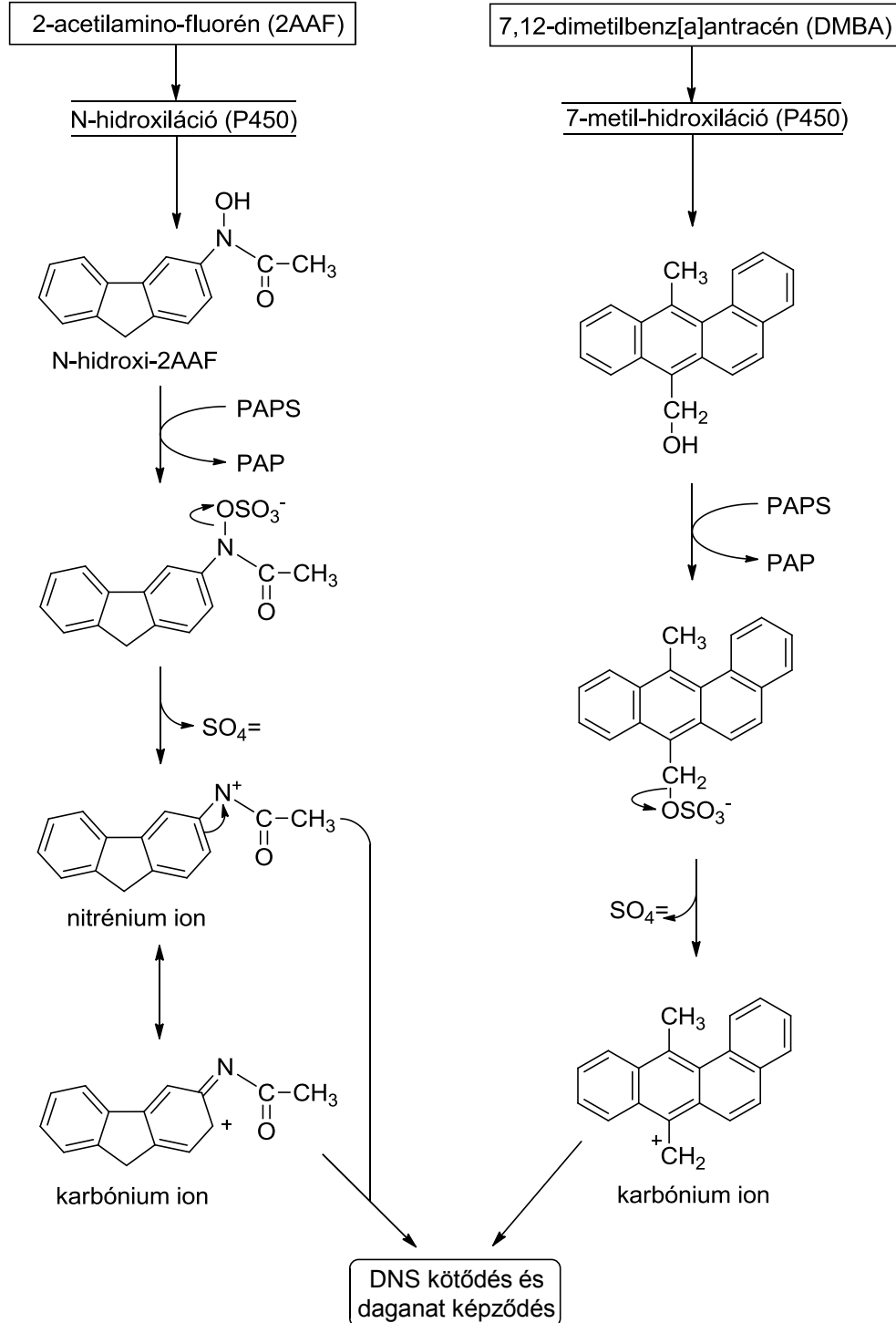
IX-5. ábra. A PAPS és az (S)-2-metil-1-fenil-1-propán feltételezett kötődése az aril-szulfotranszferáz IV (SULT1A1) enzim aktív helyéhez.



Általánosságban megállapítható, hogy a szulfátkonjugáció eredményeképpen csökken a testidegen vegyületek farmakológiai hatása. Vannak esetek azonban, amikor a szulfát konjugáció növeli a vegyületek toxicitását. Ez általában annak a következménye, hogy a keletkező szulfát-konjugátum kémiaiailag kis stabilitású és átalakulása reaktív elektrofil részek képződését eredményezi. Amint a IX-6. ábra bemutatja, a szulfátkonjugáció fontos szerepet játszhat az aromás aminok (pl. 2-acetilaminofurén), a szafrol, valamint a metilszubsztituált policiklusos szénhidrogének

(pl. 7,12-dimetilbenz[a]antracén) reaktív nitrogén- és széncentrumú kationokká történő metabolikus aktivitásában, melyek a vegyületek karcinogén hatásáért tehetőek felelőssé.

IX-6. ábra. A 2-acetilaminofurén és 7,12-dimetilbenz[a]antracén reaktív nitrogén- és széncentrumú kationokká történő metabolikus aktivitása



IX.3 Irodalom

- Smith and Williams' Introduction to the Principles of Drug Design and Action. (Editor: Smith H.J.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam (1998)
- Novák L., Nyitrai J., Hazai L.: Biomolekulák kémiája. MKE, Budapest (2001)
- Ádám V., Dux L., Faragó A., Fésüs L., Machovich R., Mandl J., Sümegi B.: Orvosi biokémia. Medicina Kiadó, Budapest (2001)
- Silverman R.B. :The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions, Revised edition. Elsevier, London (2002)
- Parkinson A.: Biotransformation of xenobiotics. In Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Seventh Edition. (Editor: Klaassen C.D.). McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY (2008)
- Gyógyszerészi kémia. Szerk.: Fülöp F., Noszál B., Szász Gy., Takácsné Novák K. Semmelweis Kiadó, Budapest (2010)
- A gyógyszerkutatás kémiája. Szerk. Keserű Gy. M. Akadémiai Kiadó, Budapest (2011)
- Gyógyszerek. Szerk. Faigl F. Elektronikus tankönyv. BME, Budapest (2011)
- Jancová P., Siller M.: Phase II drug metabolism. In Topics on drug metabolism (Editor: Paxton J.) Intech (2012) (<http://www.intechopen.com/books/topics-on-drug-metabolism>)
- Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., Zito S.W.: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2013)
- Perjési P.: Gyógyszermetabolizmus és gyógyszertoxicitás. Elektronikus tananyag. PTE, Pécs (2014)

X Aminosav-konjugáció

A szervezetbe kerülő testidegen anyagok metabolizmusának első humán kísérleti bizonyítéka – amint az e közlemény első részében is említésre került – a benzoészav glicinnel történő konjugációja volt (*A. Ure*). Az első kísérleti tapasztalat óta eltelt időben számos további aromás, elágazó láncú alifás, aromás-alifás és heterociklusos karbonsav aminosav-konjugátuma került azonosításra, igazolva ezzel a testidegen anyagok aminosavakkal lejátszódó konjugációjának jelentőségét azok metabolizmusában.

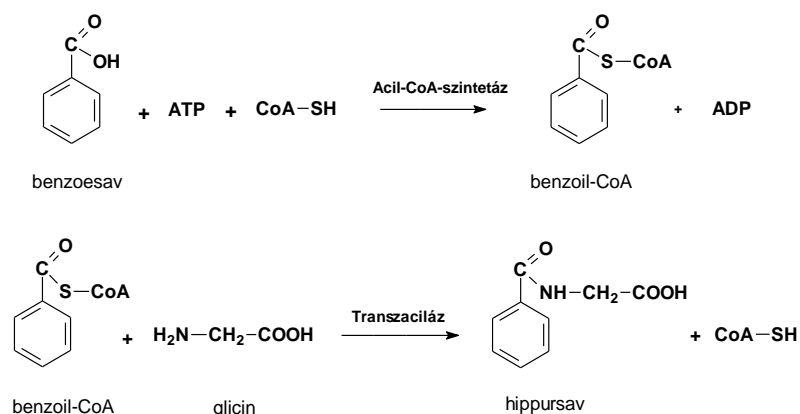
A karboxilcsoporttal bíró gyógyszervegyületek (testidegen anyagok) a szervezetben konjugálódhatnak glükuronsavval és/vagy aminosavakkal. A vegyületek metabolikus átalakulásainak természetét nagymértékben befolyásolja a karboxilcsoportot hordozó szénatom természete, illetve szubsztitúciója. Emberben leggyakoribb a glicinnel, a glutaminnal és taurinnal lejátszódó konjugáció, de képződnek többek között arginin-, hisztidin- és szerinkonjugátumok is. Az aromás és heteroaromás vegyületek elsősorban glicinnel konjugálódnak. A legtöbb nem-elágazó láncú alifás karbonsav szinte kizárólagos transzformációja a béta-oxidáció. Ugyanakkor az elágazó láncú alifás és aromás-alifás karbonsavak konjugációs reakcióiban speciestől függően más aminosavak is részt vehetnek. A karbonsavakkal leggyakrabban konjugációs reakciókban résztvevő aminosavak szubsztrát és species függését a X-1. táblázat foglalja össze.

X-1 táblázat. A leggyakoribb aminosav-konjugációs reakciók szubsztrát és species függése.

Aminosav	Species	Karbonsav
Glicin	Emlősök	Aromás és heterociklusos karbonsavak
	Nem-főemlősök	Arilecetsavak
Glutamin	Főemlősök	Arilecetsavak
Taurin	Emlősök	Arilecetsavak

Az aminosav-konjugáció egyszerűsített folyamatát, a benzoészav glicin-konjugátumának képződése példáján, a X-1. ábra mutatja be.

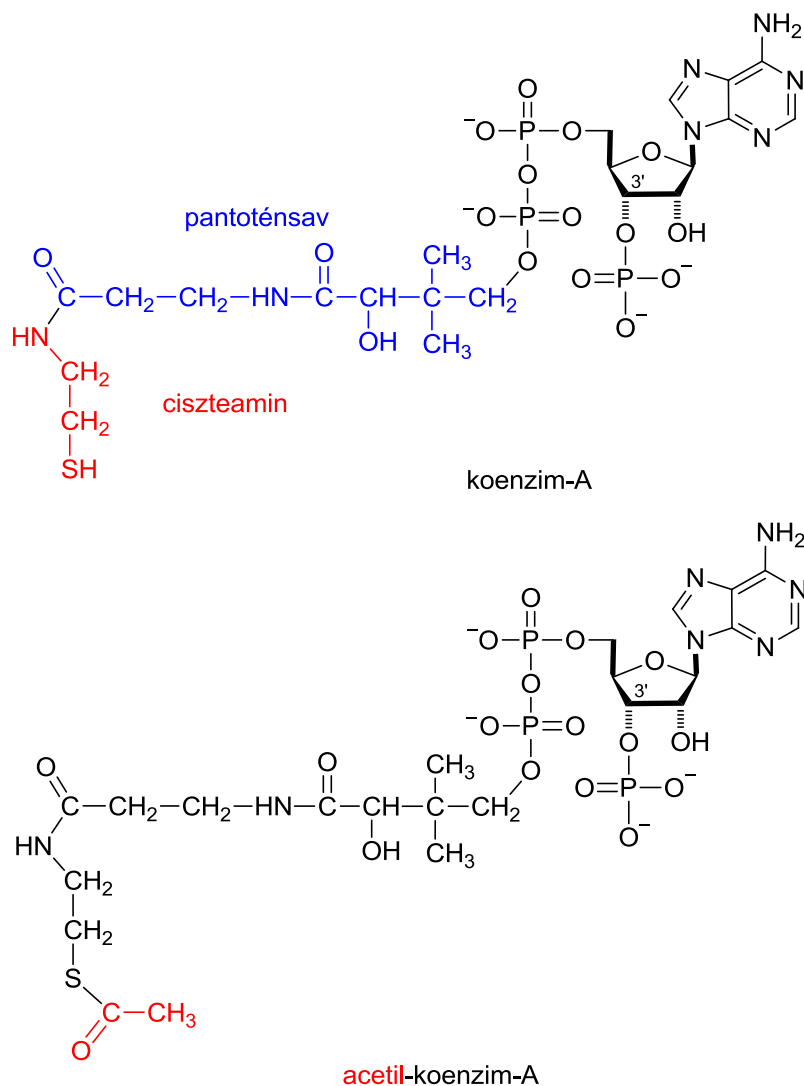
X-1. ábra. A benzoészav glicin-konjugátuma (hippursav) képződésének reakciója



X.1. Mechanizmus

A testidegen karbonsavak aminosav-konjugációja két egymást követő lépésből áll. A folyamat első lépése a testidegen vegyület karboxilcsoportjának aktivált formába történő átalakulása. Hasonlóan az endogén karbonsavak (pl. ecetsav) karboxilcsoportjainak aktiválásához, a testidegen karbonsavak esetén is az aktivált forma a karbonsav koenzim-A-val (HSCoA) képzett tioésztere (acil-SCoA) (X-2. ábra).

X-2. ábra. A koenzim-A (HSCoA) és az acetil-koenzim-A (acetil-SCoA) szerkezete



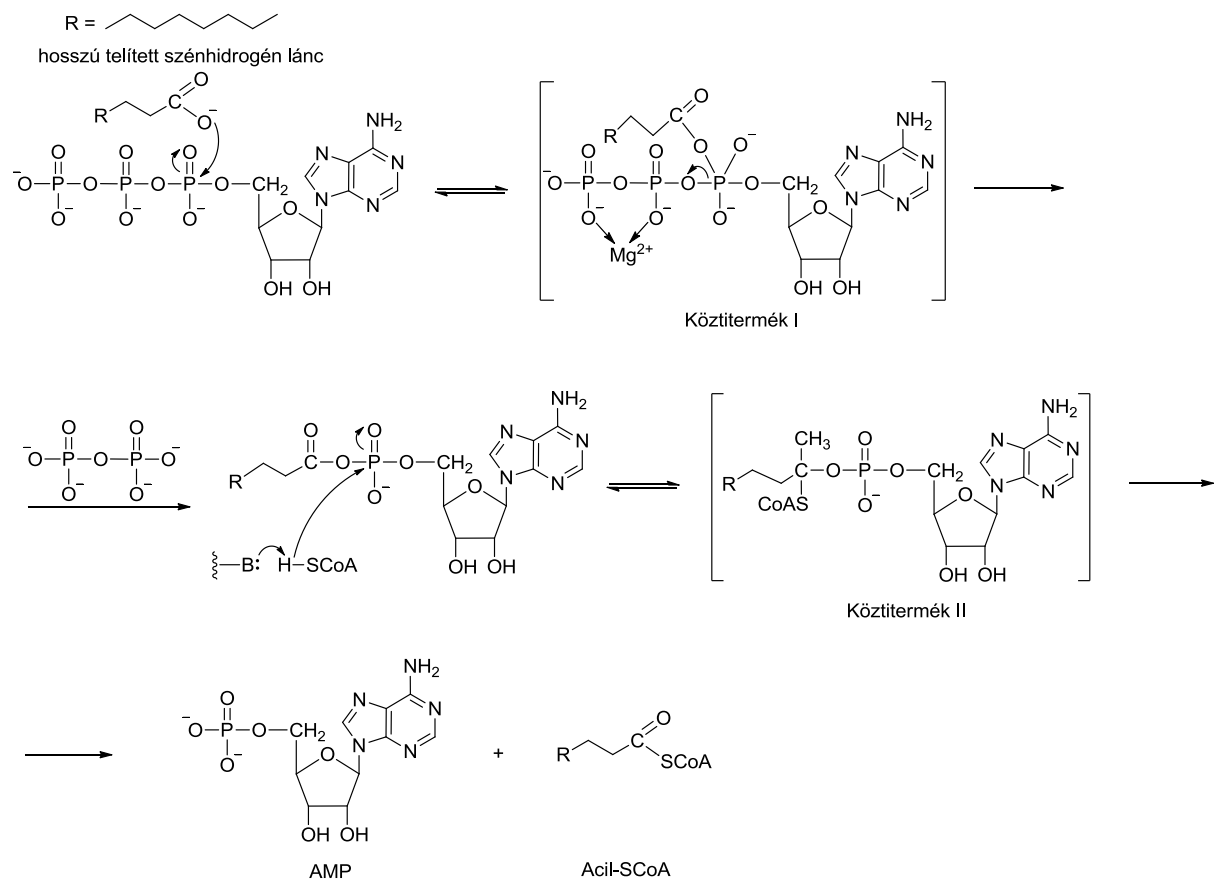
A koenzim-A építőkövei a következők:

- egy *adenin-tartalmú nukleotid* rész, melynek ribofuranozid-gyűrűje a 3'-helyzetben foszforilezve van és az 5'-helyzethez kapcsolódó pirofoszforsav köti össze a vitaminként is ismert pantoténsavval;
- a *pantoténsav*, ami két részből áll: D-2,4-dihidroxi- 3,3-dimetilbutánsavból, és β -alaninból (3aminopropionsav);
- a pantoténsav β -alanin karboxilcsoportjához savamid kötéssel kapcsolódó *ciszteamin*.

A koenzim-A acilszármazékai – mint tioészterek - közepes aktivitású acilezőszerek. Az észternél nagyobb reaktivitásuk teszi őket alkalmassá az acilezési reakcióra, ugyanakkor a savanhidrideknél kisebb reaktivitásuk miatt a tioészter funkció nem hidrolizál vizes közegben.

A tioészter-képződést a máj mikroszómális, mitokondriális és peroxiszómális közép- (E.C. 6.2.1.2.) és hosszú-szénláncú (E.C. 6.2.1.3.) *acil-CoA-szintetáz* enzimek katalizálják. Az acil-CoA-szintetáz enzimek endogén szubsztrátjai a különböző szénatomszámú karbonsavak, de az említett hepatikus enzimek részt vesznek testidegen karbonsavak CoA-észterre történő átalakításában is. Megemlítendő, hogy a mikroszómális és peroxiszómális acil-CoA-szintetáz enzimek részt vesznek az (R)-arilpropionsavak (pl. ibuprofén) (R)→(S) epimerizációjában is. A hosszú szánláncú *acil-CoA-szintetáz* (E.C. 6.2.1.3.) enzim által katalizált reakció egyszerűsített mechanizmusát a X-3. ábra mutatja be.

X-3. ábra. A hosszú szánláncú acil-CoA-szintetáz által katalizált tioészter-képződési reakció egyszerűsített mechanizmusa

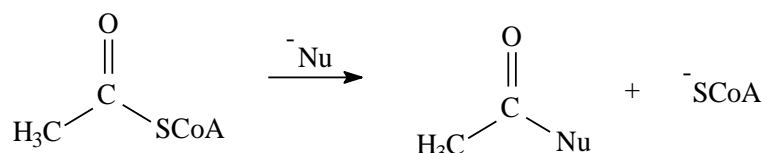


A zsírsav-SCoA-észter képződés magnéziumion, ATP és koenzim-A (HSCoA) kofaktorok jelenlétében játszódik le. Az ATP terminális (gamma és béta) foszforilcsoportjai komplexálják a magnéziumiont, aminek következtében az alfa-foszforilcsoport foszforatomja elegendően elektrofillé válik, hogy a zsírsav karboxilát nukleofil oxigénatomjával reagáljon. A reakcióban pirofoszfát válik szabaddá és a keletkező vegyes anhidrid (adenilil-acilát) S_N2 reakcióban reagál a koenzim-A nukleofil

tiolát-csoportjával a megfelelő acil-SCoA és adenzin-monofoszfát (AMP) képződését eredményezve. Ez utóbbi reakció mellékterméke adenzin-monofoszfát (X-3. ábra).

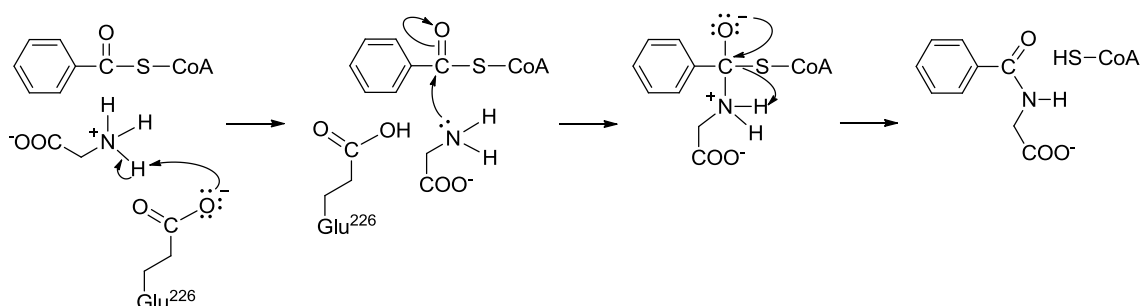
Az acetil-koenzim-A a leggyakoribb tioészter a természetben. Az acetilezési reakció lényege az, hogy a tiolát-anion jó kilépő csoportként lehasad és a nukleofil reagens acileződik (X-4. ábra). Hasonló reakció játszódik le testidegen karbonsavak koenzim-A észterei és nukleofil reaktánsok (pl. aminosavak aminocsoportjai) között is.

X-4. ábra. Az acetil-koenzim-A (acetil-SCoA) nukleofil reaktánsokkal lejátszódó reakciója.



Az aktivált karboxilcsoport és az aminosavak aminocsoportja között lejátszódó reakciót a citoszolban vagy a mitokondriumban lokalizálódó *transz-aciláz* (acil-CoA: aminosav N-aciltranszferáz) enzimek katalizálják. Az *acil-CoA:glicin N-aciltranszferáz* (E.C. 2.3.1.13.) enzim által katalizált reakciók kinetikai méréseinek és pH-függése vizsgálatainak eredményei alapján feltételezett molekuláris mechanizmusát a X-5. ábra mutatja be.

X-5. ábra. Az acil-CoA:glicin N-aciltranszferáz enzim által katalizált reakciók feltételezett mechanizmusa



A reakció az általános bázis-katalizált reakciók mechanizmusának megfelelő kinetika szerint játszódik le, melyben az enzim glutamát építőeleme vesz részt mint általános bázis-katalizátor. A glutamát deprotonálja a glicin protonált aminocsoportját, így az nukleofil reaktánsként reagálhat az acetil-SCoA tioészter funkciós csoportjával.

X.2 Irodalom

Smith and Williams' Introduction to the Principles of Drug Design and Action. (Editor: Smith H.J.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam (1998)

Novák L., Nyitrai J., Hazai L.: Biomolekulák kémiája. MKE, Budapest (2001)

Ádám V., Dux L., Faragó A., Fésüs L., Machovich R., Mandl J., Sümegi B.: Orvosi biokémia. Medicina Kiadó, Budapest (2001)

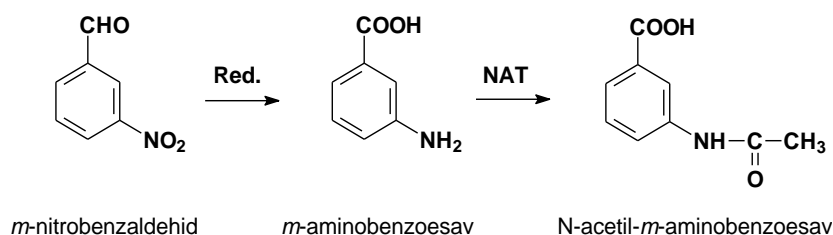
Silverman R.B.: The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions, Revised edition. Elsevier, London (2002)

- Scheibner K.A., De Angelis J., Burley S.K., Cole P.A.: Investigation of the roles of catalytic residues of Serotonine N-acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 277: 18118-18126 (2002)
- Knights K.M., Sykes M.J., Miners J.O.: Amino acid conjugation: contribution to the metabolism and toxicity of xenobiotic carboxylic acids. *Exp. Opin. Drug Metabol. Toxicol.* 3: 159-168 (2007)
- Parkinson A.: Biotransformation of xenobiotics. In Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Seventh Edition. (Editor: Klaassen C.D.). McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY (2008)
- Gyógyszerészi kémia. Szerk.: Fülöp F., Noszál B., Szász Gy., Takácsné Novák K. Semmelweis Kiadó, Budapest (2010)
- A gyógyszerkutatás kémiája. Szerk. Keserű Gy. M. Akadémiai Kiadó, Budapest (2011)
- Gyógyszerek. Szerk. Faigl F. Elektronikus tankönyv. BME, Budapest (2011)
- Badenhorst C.P.S., Jooste M., van Dijk A.A.: Enzymatic characterization and elucidation of the catalytic mechanism of a recombinant bovine Glycine N-acetyltransferase. *Drug Metabol. Distrib.* 40:346–352 (2012)
- Jancová P., Siller M.: Phase II drug metabolism. In Topics on drug metabolism (Editor: Paxton J.) Intech (2012) (<http://www.intechopen.com/books/topics-on-drug-metabolism>)
- Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., Zito S.W.: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2013)
- Perjési P.: Gyógyszermetabolizmus és gyógyszertoxicitás. Elektronikus tananyag. PTE, Pécs (2014)

XI Acetilezés

Az acetilezés elsődlegesen az aromás primer aminok (Ar-NH₂), hidrazinok (Ar-NH-NH₂), valamint az aminosavak aminocsoportjának és az acetyl-S-CoA acetylcsoportja között lejátszódó acetilezési reakció. Az első N-acetilezett metabolit felfedezése *R. Cohn* nevéhez fűződik, aki nyulakkal végzett kísérletei során a *m*-nitrobenzaldehid N-acetyl-*m*-aminobenzoészavvá történő átalakulását, illetve utóbbi vegyületnek a vizelettel történő kiürülését igazolta (XI-1. ábra).

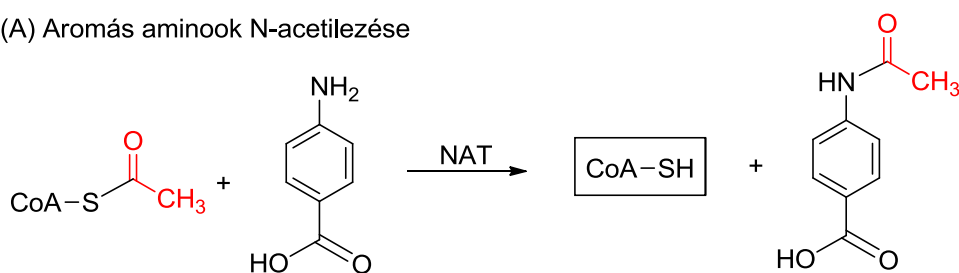
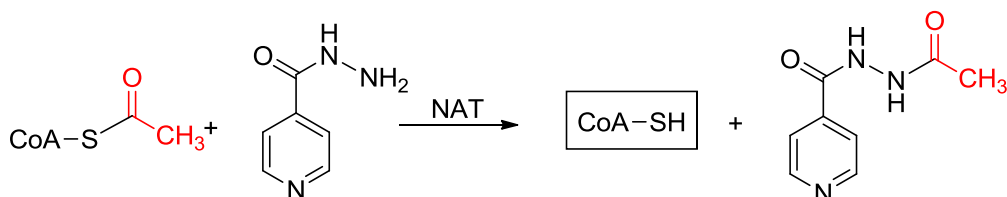
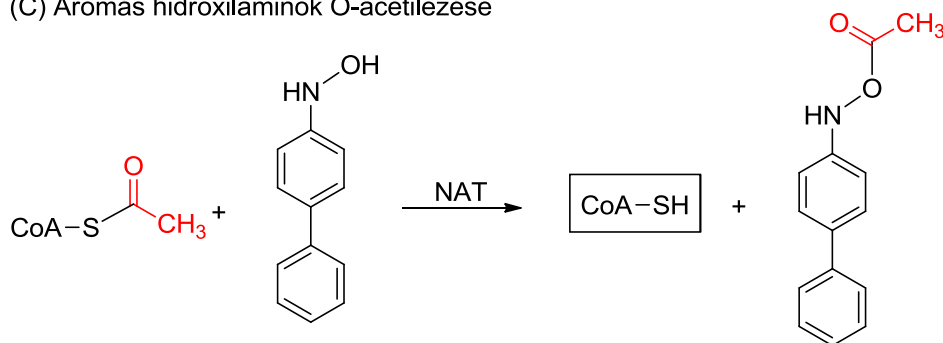
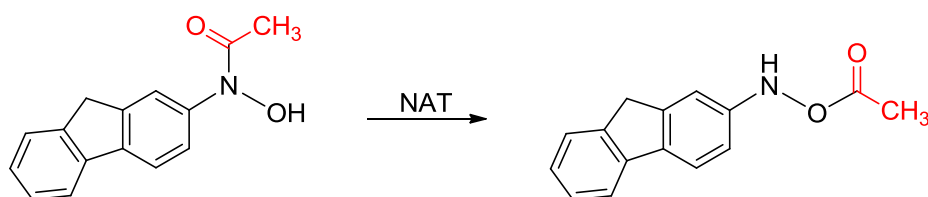
XI-1. ábra: A *m*-nitrobenzaldehid N-acetyl-*m*-aminobenzoészavvá történő metabolizmusának reakcióútja



Mintegy 50 évvel később kezdődtek a Nobel díjas *F.A. Lipmann* kísérletei, melyek során a CoA-tioészterek savgyök átviteli folyamatait tanulmányozta, többek között a szulfonamidok acetilezésének vizsgálata során. Elsősorban *F.A. Lipmann* munkája alapján sikerült tisztázni az acetilezés, illetve a testidegen karbonsavakkal lejátszódó acetilezési (aminosav-konjugációs) folyamatok molekuláris szintű részleteit.

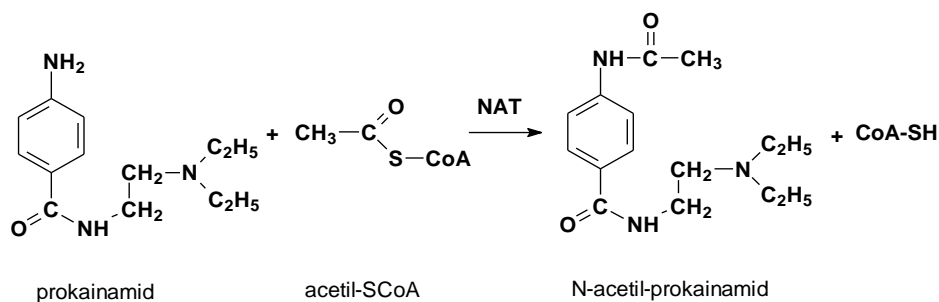
Az előző fejezet részletesen bemutatta az acyl-S-CoA (tio)észterek szintézisét, valamint – aminosavak példáján – az acyl-S-CoA (tio)észterek nukleofil reaktánsokkal lejátszódó acetilezési reakcióinak mechanizmusát. Így e fejezetben a korábban bemutatott folyamatok nem kerülnek ismét tárgyalásra.

A testidegen anyagok acetyl-S-CoA észterrel történő acetilezési reakcióit az N-acetyltranszferáz (NAT) (E.C. 2.3.1.5.) enzimek katalizálják. A NAT enzimek által katalizált folyamatok során aromás gyűrűhöz kapcsolódó amino- vagy hidrazinocsoportok nitrogénatomjának, vagy aromás hidroxilamin-származékok oxigénatomjának acetilezése, illetve aromás N-acetyl-hidroxilamin-származékok N,O-acetyl-vándorlási reakciója játszódik le (XI-2. ábra).

XI-2. ábra Az *N*-acetiltranszferáz (NAT) enzimek által katalizált reakciók(A) Aromás aminok *N*-acetilezése(B) Aromás hidrazinok *N*-acetilezése(C) Aromás hidroxilaminok *O*-acetilezése(D) *N,O*-acetilvándorlás

A prokainamid és az acetil-sCoA között lejátszódó, *N*-acetiltranszferáz (NAT) enzimek által katalizált reakcióját a XI-3. ábra mutatja be.

XI-3. ábra: A prokainamid acetilszármazékká történő átalakulásának *N*-acetiltranszferáz (NAT) enzimek által katalizált reakciója



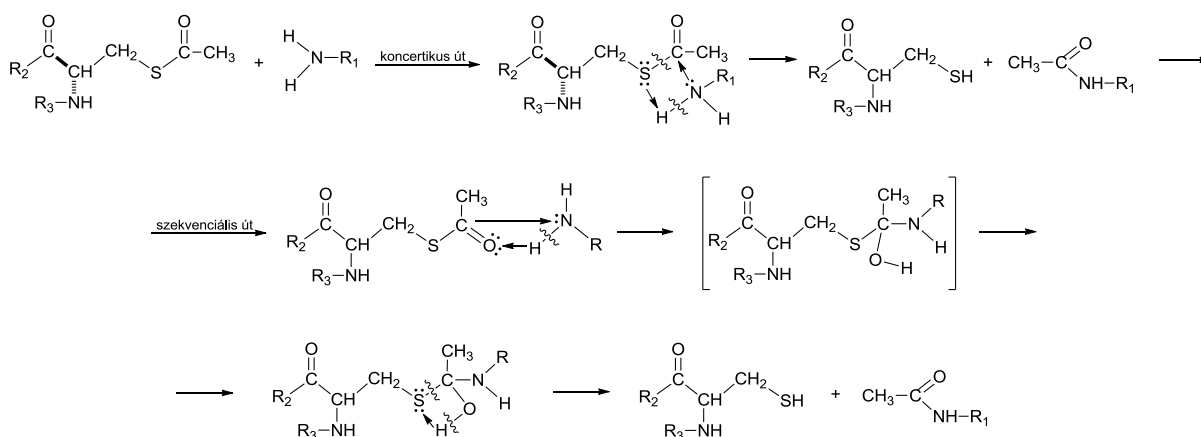
XI.1 Mechanizmus

Az *N*-acetiltranszferázok (NAT) a citoszolban található enzimek. Emberben két formája, a NAT1 és NAT2 imert. A NAT1 megtalálható a legtöbb szervben/szövetben, míg a NAT2 elsősorban a májban és a vékonybélben expresszálódik. A két izoenzim eltérő, de átfedő szubsztrátspecifitással rendelkezik. A NAT1-preferenciával rendelkező gyógyszerek közül megemlítendő a *p*-aminobenzoesav, a *p*-aminoszalicilsav, a koffein és a szulfametoxazol, míg a NAT2-preferenciával bíró gyógyszerek között találhatjuk az izoniazidot, a hidralazint, számos antibakteriális szulfonamidot, a nitrazepámot, valamint a prokainamidot.

Az *N*-acetilezés - a metilezési reakciókhoz hasonlóan - egy poláros, ionizálható funkciós csoportot egy apolárosabb, nem-ionizálható csoporttá alakít, csökkentve a nem-acetilezett anyavegyület (szubsztrát) vízdékonyságát. Ugyanakkor néhány vegyület, pl. izoniazid, *N*-acetilezési reakciója elősegíti annak vizelettel történő kiürülését.

Az *N*-acetiltranszferázok által katalizált reakciók két molekuláris mechanizmus szerint játszódhatnak le: (a) koncertikus, vagy (b) szekvenciális (XI-4. ábra)

XI-4. ábra: Az *N*-acetiltranszferáz enzimek által katalizált reakciók koncertikus és szekvenciális mechanizmusa



A *koncertikus mechanizmus* szerint lejátszódó reakcióban a nukleofil nitrogénatomnak a karbonilcsoporttal, illetve a tioészter kötésben lévő kénatomnak a nitrogénatomhoz kapcsolódó hidrogénatommal létesítendő kötéseinek kialakulása (és a

reaktánsokban eredetileg meglévő kötések felbomlása) egyidejűleg, szinkronizáltan – egy aktivált komplex képződésén keresztül - történik.

A *szekvenciális mechanizmus* szerint lejátszódó reakció első lépése az aromás aminocsoport hidrogén- és a tioészter funkció oxigénatomjai közötti kölcsönhatás (kötés), és az aminocsoport nitrogén- és a tioészter karbonilcsoportjának szénatomja közötti kötés kialakulása. (Addíció a karbonilcsoportra.) A keletkező tiolészter intermedieren belüli következő hidrogénatom-vándorlás és a kén-szén-kötés felbomlása eredményeképpen kialakul az acetilezett szubsztrát, illetve a dezacetilezett HSCoA (XI-4. ábra). Teoretikus számítások eredményei azt mutatják, hogy a két mechanizmus közül a koncertikus mechanizmus energetikailag kedvezményezett.

Az *N*-acetiltranszferáz enzimek jól ismert genetikai polimorfizmusa jelentős befolyással bír a fenti gyógyszervegyületek *N*-acetilezésének sebességére, és annak következtében a vegyületekkel folytatott gyógyszeres terápiára, valamint a vegyületek potenciális toxikus hatásának kialakulására. A humán *N*-acetiltranszferáz izoenzimek szubsztrátjai között a gyógyszervegyületeken kívül számos karcinogén arilamin származék (pl. 2-aminofluorén) is megtalálható, melyek acetilezéssel aktiválódnak (lásd IX-6. ábra).

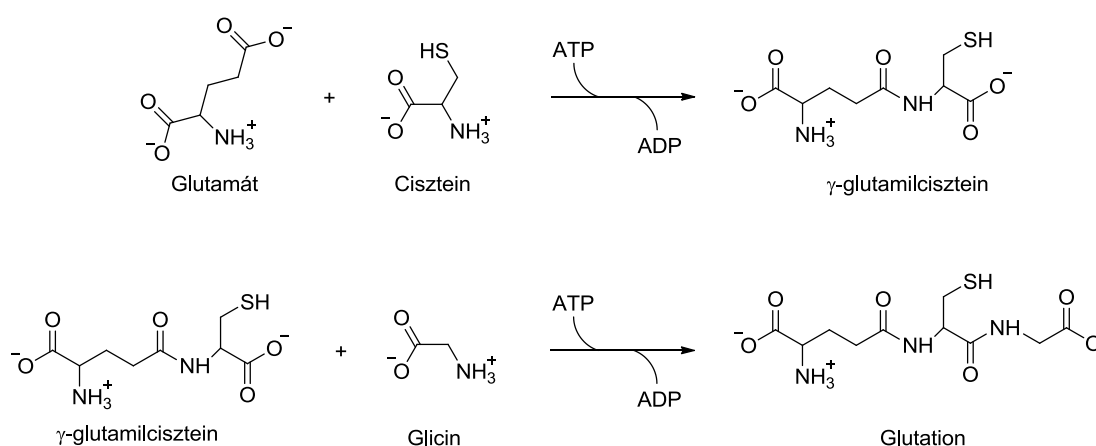
XI.2 Irodalom

- Smith and Williams' Introduction to the Principles of Drug Design and Action. (Editor: Smith H.J.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam (1998)
- Novák L., Nyitrai J., Hazai L.: Biomolekulák kémiája. MKE, Budapest (2001)
- Ádám V., Dux L., Faragó A., Fésüs L., Machovich R., Mandl J., Sümegi B.: Orvosi biokémia. Medicina Kiadó, Budapest (2001).
- Silverman R.B.: The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions, Revised edition. Elsevier, London (2002)
- Parkinson A.: Biotransformation of xenobiotics. In Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Seventh Edition. (Editor: Klaassen C.D.). McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY (2008)
- Qiao Q.-A., Sun X.-M., Jing J., Chen X., Wang H.-Y., Yang C.-L., Cai Z.-T.: What differs on the enzymatic acetylation mechanisms for arylamines and arylhydrazines substrates? A theoretical study. Res. Letters Biochem. 2009: Article ID 783035 (2009) (<http://dx.doi.org/10.1155/2009/783035>)
- Gyógyszerészi kémia. Szerk.: Fülöp F., Noszál B., Szász Gy., Takácsné Novák K. Semmelweis Kiadó, Budapest (2010)
- A gyógyszerkutatás kémiája. Szerk. Keserű Gy. M. Akadémiai Kiadó, Budapest (2011)
- Gyógyszerek. Szerk. Faigl F. Elektronikus tankönyv. BME, Budapest (2011)
- Jancová P., Siller M.: Phase II drug metabolism. In Topics on drug metabolism (Editor: Paxton J.) Intech (2012) (<http://www.intechopen.com/books/topics-on-drug-metabolism>)
- Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., Zito S.W.: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2013)
- Perjési P.: Gyógyszermetabolizmus és gyógszertoxicitás. Elektronikus tananyag. PTE, Pécs (2014)

XII Konjugáció glutationnal

A *glutation* (GSH) a citoszolban relatíve magas koncentrációban (1-10 mM) megtalálható tripeptid: γ -glutamil-ciszteinil-glicin. A glutation a szervezetben építőelemeiből, L-ciszteinből, glicinből és L-glutaminsavból szintetizálódik. A bioszintézis első lépése a cisztein aminocsoportja és a glutaminsav γ -karboxilcsoportja között kialakuló savamid kötés, melyet a *γ -glutamilcisztein-szintetáz* (E.C. 6.3.2.2.) enzim katalizál. A szintézis második lépését, a γ -glutamilcisztein (cisztein egységének) karboxilcsoportja és a glicin aminocsoportja közötti savamid kötés kialakulását, a *glutation-szintetáz* (E.C. 6.3.2.3.) enzim katalizálja. Mindkét folyamat energiaigényes. A keletkező termék a redukált glutation (GSH) (XII-1. ábra).

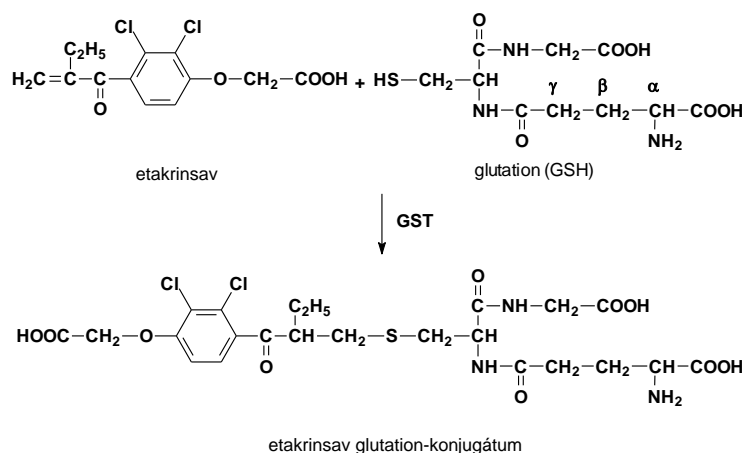
XII-1. ábra. A redukált glutation (GSH) bioszintézise



A redukált glutation (GSH) tiolfunkciójának következtében fiziológias körülmények között *erős nukleofil*, egyidejűleg, két GSH molekula tiolcsoportjának diszulfid-származékká (GSSG) történő könnyű oxidációja eredményeképpen, redukáló (*antioxidáns*) tulajdonságú vegyület. Az oxidáció reverzibilis, az oxidált glutation (GSSG) NAD(P)H-dependens enzimek segítségével redukált glutationná (GSH) alakulhat. A GSH nukleofil tulajdonsága következtében fontos szerepet játszik a reaktív elektrofil metabolitok biopolimerek (pl. fehérjék, DNS) nukleofil centrumaival (O-, S-, N-atomok) lejátszódó reakciójának megakadályozásában (*citoprotektív hatás*), míg redox tulajdonsága kapcsán fontos szerepet tölt be a sejtek redox-egyensúlyának fenntartásában (*antioxidáns hatás*).

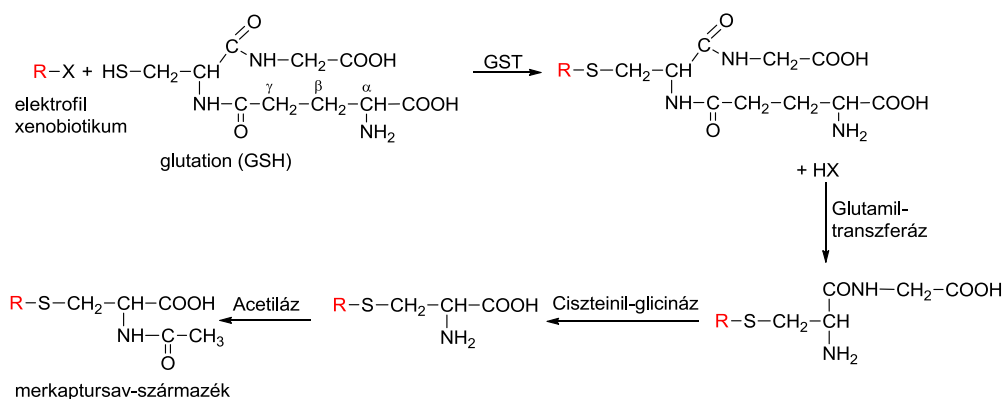
A redukált glutation (GSH) kémiai természetéből adódóan reakcióba lép olyan testidegen anyagokkal, melyekben elektronhiányos (*elektrofil*) centrum található, vagy az eredeti gyógyszervegyület metabolizmusának eredményeképpen elektrofil centrum alakul ki. A glutation-konjugáció egyik példáját, az etakrinsav glutation-konjugátumának képződését a XII-2. ábra mutatja. A reakció spontán is lejátszódik, a *glutation-S-transzferáz* (GST) enzimek azonban meggyorsítják a spontán lezajló reakció sebességét. A GST enzimek (E.C. 2.5.1.18.) a legtöbb szövetben expresszálódnak, legnagyobb koncentrációban a májban, a bélben, a vesében, és a tüdőben, ahol legnagyobb mennyiségben (>95%) a citoplazmában lokalizálódnak.

XII-2. ábra. Az etakrinsav és a redukált glutation (GSH) glutation-S-transzferáz (GST) enzimek által katalizált reakciója



A májban képződő GSH-konjugátumok kiürülnek az epével, vagy a vesében merkaptursav-származékokká alakulva a vizelettel ürülnek ki a szervezetből. A merkaptursav-származékok képződése során a konjugátumok - a glutacion molekularész glutaminsav és glicin építőelemeinek hidrolízise eredményeképpen ciszteinkonjugátumokká alakulnak, melyek az N-acetiltranszferáz (NAT) enzimek által katalizált reakcióban a megfelelő N-acetilszármazékokká (ún. merkaptursav-származékokká) konvertálódnak (XII-3. ábra).

XII-3. ábra. A glutacion-konjugátumok merkaptursav-származékká történő metabolizmusának reakcióútja



XII.1 Mechanizmus

A GST enzimek két azonos alegységből álló dimerek, vannak azonban melyek heterodimer szerkezetűek. Mindkét alegységen két kötőhely található, melyek egyike GSH-specifikus (G-kötőhely), míg a másik lipofil molekulákat képes koordinálni (H-kötőhely). A kötődésre képes molekulák legnagyobb hányada elektrofil centrummal rendelkezik és az enzim szubsztrátjaként részt vesznek a GSH-val lejátsszódo rekcioiban. Néhány elektrofil centrummal nem rendelkező endogén molekula – így pl. szteroid hormonok, tiroid hormonok, epesavak, bilirubin, szabad zsírsavak – is kapcsolódhat a GST enzimek aktív helyéhez, ezek azonban nem reagálnak GSH-val. E kötődések biológiai következményei részleteiben nem ismertek, de az enzim-nem-

szubsztrát komplexek szerepet játszhatnak más enzimek aktivitásának növelésében, nukleáris receptorok aktivitásának megváltozásában, illetve a vegyületek transzportjában.

Számos alegység klónozása és szekvenciájának meghatározása megtörtént, ami alapját képezi a GST enzimek szisztematikus nevezéktanának. Számos alegység klónozása és szekvenciájának meghatározása megtörtént, ami alapját képezi a GST enzimek szisztematikus nevezéktanának. Például, a két 1 illetve 2 alegységből felépülő enzimet az 1-1, illetve 2-2, míg a heterodimer enzimet 1-2 nevezéktannal különböztethetjük meg egymástól.

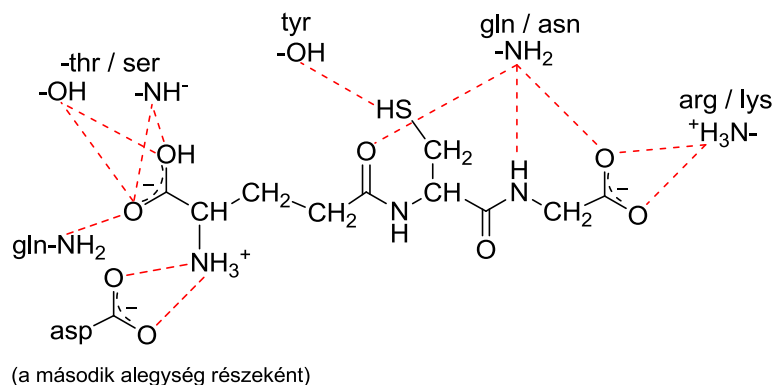
A GST enzimek celluláris lokalizációjuk alapján három nagy szupercsaládba sorolhatók: a (a) *citoszolban* és a (b) *mitokondriumban* lokalizálódó, valamint a (c) *mikroszómális* enzimek.

A citoszolban oldódó GST enzimeket korábban négy osztályba sorolták, melyeket A, M, P és T betűjelekkel különböztetünk meg egymástól (a betűk megfelelnek a még korábban alkalmazott *alfa*, *mű*, *pi*, és *teta* névvel jelölt osztályoknak). Újabb három további oldható enzimcsalád azonosítása történt meg, melyek az O (*omega*), az S (*szigma*) és a Z (*zeta*) nevet kapták. E hét osztály egyike sem azonos a mikroszómális GST enzimekkel, melyek két képviselőjének azonosítása történt meg. Az egyik egy trimer szerkezetű enzim, ami az oldható enzimekhez hasonlóan a GSH és testidegen anyagok konjugációs reakcióit katalizálja. A másik egy ettől különböző enzim, ami a leukotrién A₄ és GSH konjugációs reakciójában keletkező leukotrién C₄ képződését katalizálja. Az egy osztályba tartozó GST enzimek elsődleges fehérje szerkezete legalább 40% homológiát mutat. A különböző osztályokba sorolt enzimek elsődleges fehérjeszerkezetének hasonlósága kisebb mint 25%.

A GST enzimek szubsztrátjai három közös tulajdonsággal rendelkeznek: a.) *hidrofób* tulajdonságúak, b.) *elektrofil* (elektronhiányos) C-, N-, vagy S-atommal (centrummal) bírnak, és c.) a GSH-val szemben *spontán reaktivitással* rendelkeznek. A konjugációs reakciók kémiai szempontból két csoportba sorolhatók: (1) *addíciós* reakciók, melyekben a GSH telítetlen kötésre (pl. a GSH és az etakrinsav reakciója), vagy feszült gyűrűre (pl. epoxidok) addicionálódik, és (2) *szubsztitúciós* reakciók, melyekben a GSH helyettesít egy leváló csoportot (pl. halogénatomot, vagy nitrátésztert).

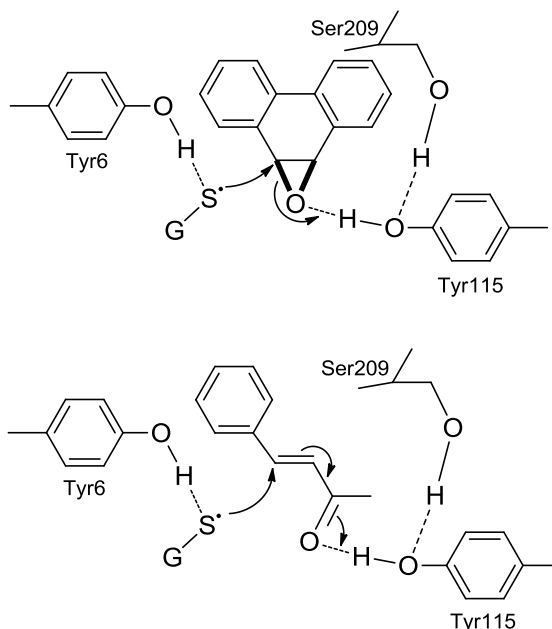
A GST enzimek katalizátor hatásának alapja, hogy a redukált glutationnal (GSH) történő kölcsönhatásuk eredményeképpen a GSH pK_s értékét (9,65) pK_s 6-7 értékre csökkenti az enzim aktív helyének környezetében. Ezáltal megnő a nagyobb nukleofil erővel bíró tiolátiót hordozó GSH molekulák száma. GSH-analóg vegyületek összehasonlító reaktivitásának vizsgálata során megállapították, hogy a GSH-kötődés fő determináló tényezője a γ -glutamil molekularész és annak deprotonált karboxilátcsoportja. A GSH tiolcsoportja savi disszociációs állandójának megnövekedése az A, M és P formák esetén az enzim-kötött GSH tiolcsoportjának és a GST G-kötőhelyének tirozin, míg a T forma esetén a GST G-kötőhelyének szerin hidroxilcsoportjának kölcsönhatásával értelmezhető. A kísérleti tapasztalatok alapján feltételezett kötődés molekuláris alapjait a XII-4. ábra mutatja be.

XII-4. ábra. A redukált glutation (GSH) feltételezett kötődése a GST A, M és P formáinak G-kötőhelyén.



A GST enzimek szubsztrát (H-) kötőhelye hidrofób aminosavak határolják. Egyes enzimek esetén a kötőhelyet képző aminosavak az enzim által katalizált reakció lejátszódását elősegítő funkciós csoportokat is hordoznak. E funkciós csoportok részvétele a reakciókban csak specifikus szubsztrátok esetén valósul meg. Így a GST M formák esetén az epoxidokkal és az alfa,béta-telítetlen karbonilvegyületekkel lejátszódó GSH-addíciós reakciókban elektrofil reakciópartnerként segíti elő a reakciók lejátszódását (XII-5. ábra).

XII-5. ábra. Az aromás epoxidok és az alfa,béta-telítetlen karbonilvegyületek feltételezett kötődése a GST M enzimek kötőhelyén

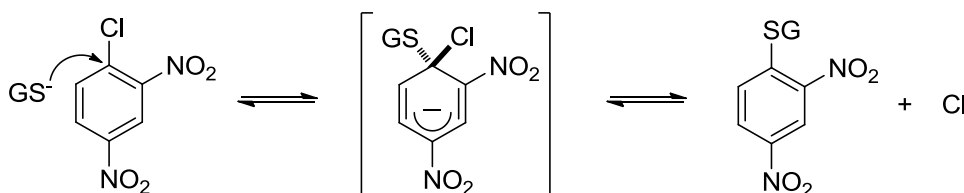


Egyes gyógyszervegyületek GSH-konjugációját minden osztályba tartozó GST enzim katalizálja. Más reakciók azonban meglehetősen specifikusak az adott osztályba tartozó enzimekre. A *mű* GST enzimek például preferenciát mutatnak néhány arénoxid és alkén-epoxid GSH-val lejátszódó reakcióinak katalizálására. A *pi* GST enzimek preferáltan katalizálják az etakrinsav GSH-konjugációját. Ugyanakkor megjegyzendő,

hogyan az egyes osztályokba tartozó individuális enzimek szubsztrátspecifitása nagymértékben különbözhet.

A citoszolban oldódó GST enzimek egyik általános szubsztrátja az 1-klór-2,4-dinitrobenzol (CDNB). A reakció a klóratomot hordozó elektronhiányos szénatomon lejátszódó nukleofil aromás szubsztitúció. A nukleofil GS^- anion támadása eredményeképpen kialakuló Meisenheimer komplex stabilizációja eredményeképpen a GS-szubsztituált nitrofenol-származék képződik (XII-6. ábra).

XII-6. ábra. A 1-klór-2,4-dinitrobenzol redukált glutationnal (GSH) lejátszódó reakciója

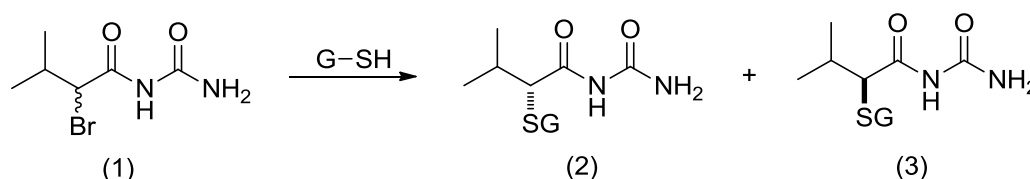


XII.2 Sztereokémia

A glutation (GSH) – bioszintéziséből adódóan – enantiomertiszta vegyület, melyben a glutamát aszimmetrikus szénatomjának konfigurációja (S), míg a ciszteiné (R). Így amennyiben a GSH-konjugátumokban aszimmetrikus szénatom található, vagy a konjugációs reakciók során aszimmetrikus szénatom alakul ki, úgy a keletkező sztereoiszomerek minden esetben diasztereoiszomer viszonyban állnak egymással. E jellegzetessége a GSH-val lejátszódó reakcióknak viszonylag könnyebbé teszi a reakciók sztereokémiájának vizsgálatát.

A GST enzimek által katalizált aszimmetrikus szénatomon lejátszódó szubsztitúciós reakciók egyik részletesen vizsgált példája a brómizovál ((R,S)-2-brómizovalerilurea) GSH-konjugátumának képződése (XII-7. ábra).

XII-7. ábra. A brómizovál redukált glutationnal (GSH) lejátszódó GST-katalizált reakciója



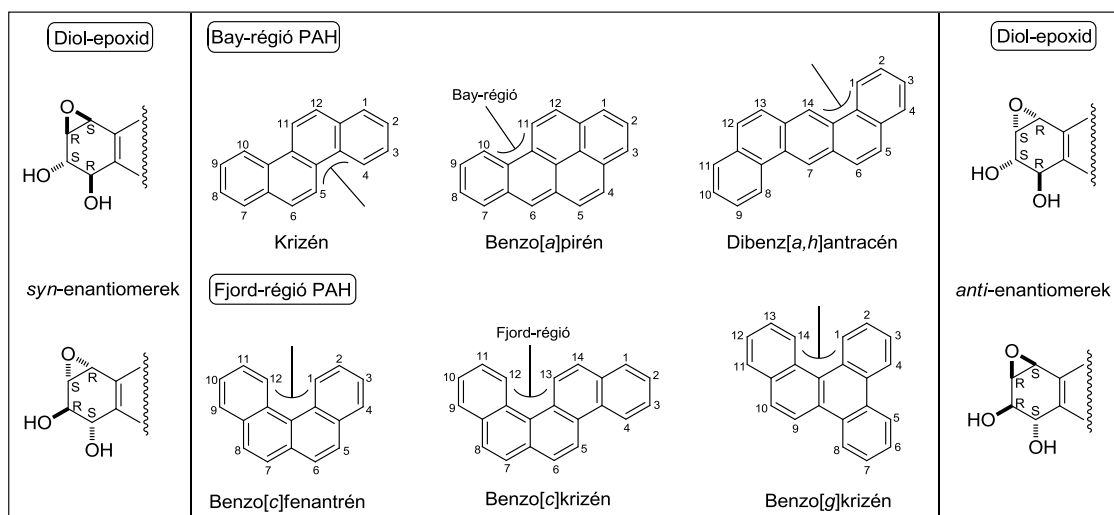
A racem brómizovál GSH-val lejátszódó reakciója két diasztereoiszomer GSH-szubsztituált származékot (2 és 3) eredményez. Enantiomertiszta (R)- és (S)-brómizovál citoszolban oldható GST-enzimek (legnagyobb mennyiségben GST M enzimek) által katalizált szubsztitúciós reakciókban megállapítható volt, hogy a reakciók teljes sztereospecifikus módon játszódnak le: az (R)-brómizoválból csak az egyik, az (S)-brómizoválból csak a másik diasztereomer származék képződése volt megfigyelhető.

Humán GST A, M és P tisztított izoenzimek által katalizált reakciók a legtöbb esetben sztereoszelektív módon játszódtak le. A legtöbb vizsgált izoenzim az (S)-enantiomerrel szemben mutatott szelektivitást (preferenciát). A vizsgált GST P1-1 izoenzim nem katalizálta a reakciót egyik enantiomer esetén sem. A humán M1a-1a és a patkány mu izoenzimek sztereoszelektivitása ellentétesnek mutatkozott. A kísérleti tapasztalatok

alapján a rokon szerkezetű izoenzimek sztereoselektivitása különböző is lehet. Mindezek az eredmények kiemelik a GST enzimek szubsztrát (H-) kötőhelyei és a szubsztrát enantioszelektív kapcsolódásának jelentőségét.

A GST enzimek szubsztrátjainak másik nagy csoportját az epoxidszármazékok képviselik. Az epoxidok közül különös jelentősége van a karcinogén tulajdonságú policiklusos aromás szénhidrogének (PAH) epoxidjainak. A rokon szerkezetű vegyületek közül az egyik legintenzívebben vizsgált vegyületek a benzo[*a*]pirén (BP) epoxidszármazékai. A szervezetbe kerülő BP a májba jut, ahol a CYP450 enzimek által 7,8-epoxidszármazékokká oxidálódik. A keletkező epoxidot (arénoxidot) az ugyancsak mikroszómális epoxid-hidrolázok (E.C. 3.3.2.9.) 7,8-dihidroxi származékká alakítják. A végső átalakítást ugyancsak a CYP450 enzimek katalizálják. Ez utóbbi reakció eredményeképpen a BP 7,8-dihidriol-9,10-epoxid-származéka képződik. Hasonlóképpen metabolizálódnak a BP rokon szerkezetű származékai is, melyeket szerkezetük alapján két nagy csoportba oszthatunk. A csoportosítás alapját a terminális aromás gyűrűhöz viszonyítva öbolszerűen (Bay) vagy csatornaszerűen (Fjord) helyezkedik el egy, a kondenzált aromás rendszer aromás gyűrűje (XII-8. ábra).

XII-8. ábra. A Bay- és a Fjord-régiós policiklusos aromás szénhidrogének (PAH) és diol-epoxid származékainak szerkezete



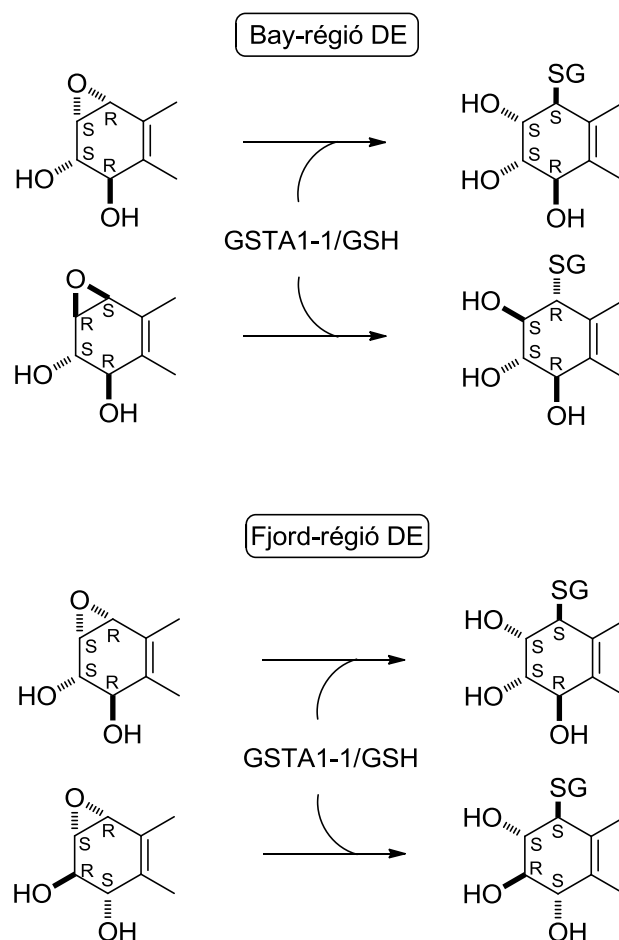
A diol-epoxidok képződéséhez vezető reakciók sztereokémiájával kapcsolatosan megemlítendő, hogy az aromás szénhidrogének prokirális centrumának CYP450-katalizált sztereoselektív oxidációja során predominantán az egyik enantiomer arénoxid képződik (Lásd aromás vegyületek CYP450-katalizált hidroxilációja). Ennek megfelelően az aromás epoxidok sztereoselektív *transz* hidrolitikus gyűrűnyílása két enantiomer aromás dihidroxiszármazékot eredményez. A következő CYP450 oxidáció epoxidgyűrűjének síkja és a benzil-hidroxilcsoport elhelyezkedése alapján a keletkező diol-epoxid diasztereomerek *szün*- és *anti*-prefixumokkal különböztethetők meg. Mind a *szün*- mind az *anti*-diasztereomer diol-epoxidok két enantiomer formában keletkezhetnek (XII-8. ábra).

A fenti módon szintetizálódó, sztérikusán gátolt környezetben kialakuló epoxidok reaktív elektrofil metabolitok, melyek képesek a DNS-bázisokkal (főként

guaninnal) reagálni. E reaktív elektrofil PAH metabolitok detoxifikálási reakciói közül kiemelkedő fontosságú a diol-epoxidok epoxid funkciójának GSH-val lejátszódó, GST-katalizált reakciója. A különböző GST-izoformák különböző PAH-származékok diol-epoxid enantiomerjeivel szemben megfigyelhető sztereo- és enantiosztereoselektivitása különbözőségeket mutat. A vizsgálatok diszkussziójában szinte minden esetben megemlítésre kerül a GST enzimek szubsztrát (H-) kötőhelyei és a szubsztrát enantioszelektív kapcsolódásának jelentősége.

A XII-8. ábrán bemutatott diol-epoxid enantiomerek GSTA1-1 enzimmal katalizált reakcióiban megfigyelhető volt, hogy a GSH-inicializált *transz* gyűrűfelnnyílás során a GSH mindig a benzil-szénatomhoz kapcsolódik. Ez a megfigyelés a legtöbb irodalmi tapasztalat alapján általánosítható. A reakció mechanizmusa, illetve a keletkező termékek sztereokémiája a nukleofil GS⁻ ion és az elektrofil oxirán szénatom között lejátszódó, S_N2 mechanizmus szerint lejátszódó mechanizmussal magyarázható.

XII-9. ábra. A Bay- és a Fjord-régiós policiklusos aromás szénhidrogének (PAH) és diol-epoxid származékainak GSTA1-1 enzimkatalizált reakciója

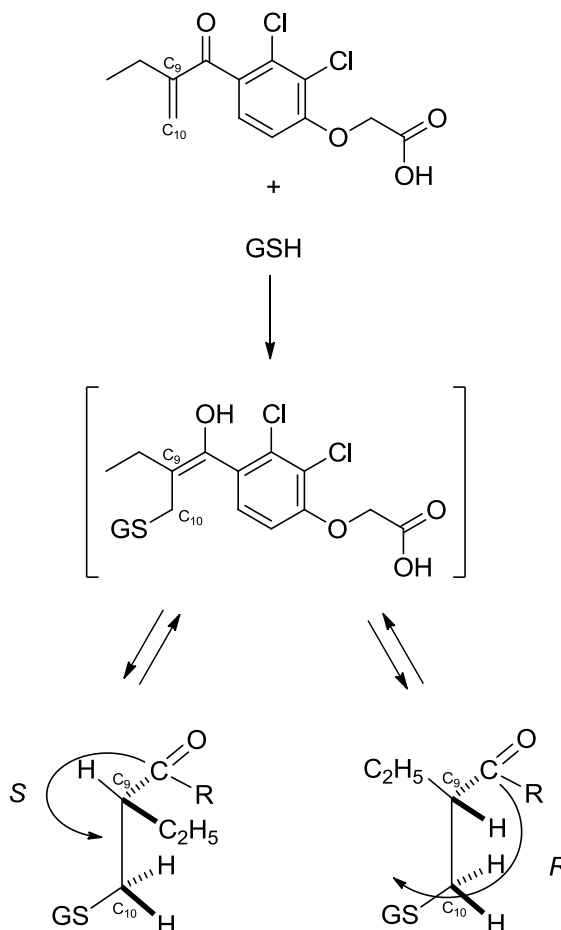


A megfigyelések szerint mint Bay- mint a Fjord-régiós *anti*-diolepidok GST-katalizált reakciójában az oxirángyűrű benzil-szénatomján R-konfigurációjú enantiomerek sebessége bizonyult nagyobbak. A szün-diasztereontiomerek esetén a kép különböző volt. A Fjord-régiós izomerek esetén az oxirángyűrű benzil-

szénatomján (R)-, míg a Bay-régiós enantiomerek estén a megfelelő (S)-konfigurációjú diaszereoemek bizonyultak nagyobb reaktivitásúnak. A megfigyelt különbségek a vegyületek nem-enzimkatalizált reakcióban mért reaktivásával sem lipofilitásával nem volt magyarázható.

A GST-katalizált reakciók egy további gyakori formája a GSH aktivált kettőskötésre történő addíciója. E reakciók egyik jól ismert példája az etakrinsav GSH addíciója a GSH polarizált szén-szén kettős kötésére.

XII-10. ábra. Az etakrinsav GSTA1-1 enzim által katalizált reakciója



Az etakrinsav karbonilcsoporttal konjugált szén-szén kettős kötése készségesen reagál redukált glutationnal. Az addíció elvileg lejátszódhat az GS⁻ ion *cisz*- és *transz*-addíciójával. Az etakrinsav szimmetrikus molekula. Ha azonban a C9-C10 kettős kötésre GSH addicionálódik, úgy a C9-atom kiralitáscentrummá válik. Így a reakció eredményeként – mivel a GSH enantiomertiszta vegyület – két disztereomer addukt képződhet (vö. IV-4. ábra).

A reakció enolát intermedieren keresztül játszódik le, így a kialakuló aszimmetrikus szénatom konfigurációját az enol ketonizációjának sztereokémiája határozza meg. A GSTA1-2, valamint a GSTA2-2 enzimek által katalizált reakciók nem szeletívek. Ugyanakkor a GSTP1-1 által katalizált reakció kizárólagosan csak az egyik diasztereomer képződését eredményezi. A különbségek az enolát intermedier különböző mechanizmus szerinti protonálódásával (ketonizációjával) magyarázható

Bár a glutation-konjugáció egyike a legfontosabb detoxikáló reakciónak, megemlítendő azonban, hogy a GSH-konjugátumok között - azok további spontán, vagy enzim-katalizált reakcióik eredményeképpen – található toxikus metabolitokat is. Ilyenek például a vicinális dihaloalkánok (pl. diklórmétán, 1,2-dibrómmétán), a halogénszubsztituált alkének, vagy a kinonok és kinoniminek GSH-konjugátumai.

XII.3 Irodalom

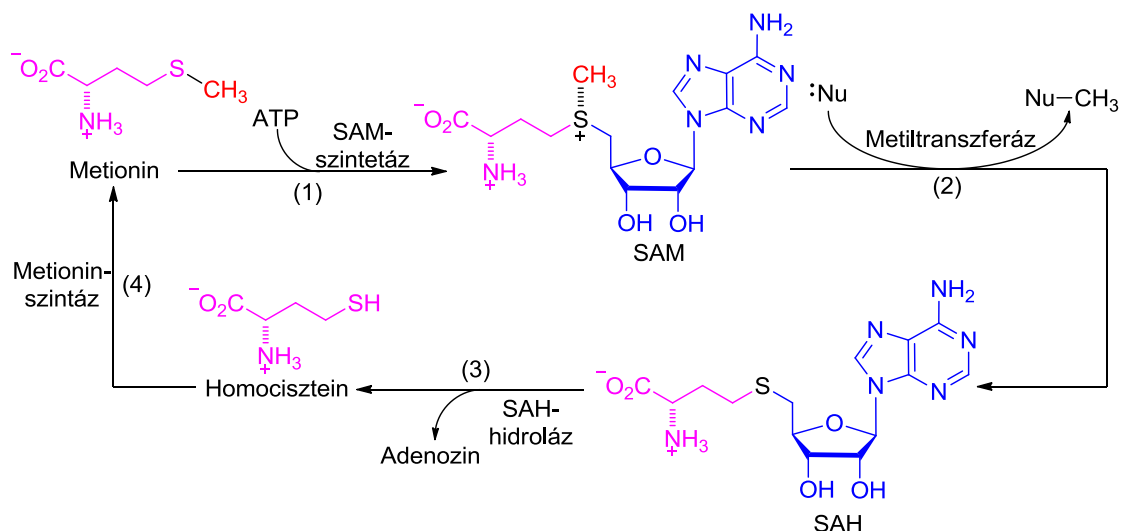
- Jernström B., Funk M., Frank H., Mannervik B., Seidel A.: Glutathione S-transferase A1-1-catalysed conjugation of bay and fjord region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons with glutathione. *Carinogrenesis* 17: 1491-1498 (1996)
- Mulders T.M.T., van Ommen Ben, van Bladeren P.J., Breimer D.D, Mulder G.J.: Stereoselectivity of human liver and intestinal cytosolic fractions as well as purified human glutathione S-transferase isoenzymes towards 2-bromoisovalerylurea enantiomers. *Biochem. Pharmacol.* 46:1775-1780 (1993)
- Smith and Williams' Introduction to the Principles of Drug Design and Action. (Editor: Smith H.J.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam (1998)
- van Bladeren P.J. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem. Biol. Interact.* 129:61-76 (2000)
- Novák L., Nyitrai J., Hazai L.: Biomolekulák kémiája. MKE, Budapest (2001)
- Ádám V., Dux L., Faragó A., Fésüs L., Machovich R., Mandl J., Sümegi B.: Orvosi biokémia. Medicina Kiadó, Budapest (2001).
- Silverman R.B. :The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions, Revised edition. Elsevier, London (2002)
- Anders M.W. Glutathione-dependent bioactivation of haloalkanes and haloalkenes. *Drug Metab. Rev.* 36:583-5899 (2004)
- Parkinson A.: Biotransformation of xenobiotics. In Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Seventh Edition. (Editor: Klaassen C.D.). McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY (2008)
- Gyógyszerészi kémia. Szerk.: Fülöp F., Noszál B., Szász Gy., Takácsné Novák K. Semmelweis Kiadó, Budapest (2010)
- A gyógyszerkutatás kémiája. Szerk. Keserű Gy. M. Akadémiai Kiadó, Budapest (2011)
- Gyógyszerek. Szerk. Faigl F. Elektronikus tankönyv. BME, Budapest (2011)
- Jancová P., Siller M.: Phase II drug metabolism. In Topics on drug metabolism (Editor: Paxton J.) Intech (2012) (<http://www.intechopen.com/books/topics-on-drug-metabolism>)
- Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., Zito S.W.: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2013)
- Perjési P.: Gyógyszermetabolizmus és gyógyszertoxicitás. Elektronikus tananyag. PTE, Pécs (2014)

XIII Metilezés

A metilezés jól ismert biokémiai transzformáció, de sokkal jelentősebb metabolikus útnak tekinthető az endogén vegyületek, mint a testidegen vegyületek (xenobiotikumok) átalakulásai szempontjából. A szerves vegyületek metilezésének első kísérleti bizonyítéka *W. His* nevéhez fűződik, aki piridin-acetáttal kezelt kutyák vizeletéből N-metil-piridínium-hidroxidot tudott kimutatni. A metilezési reakciók molekuláris mechanizmusának megismerése szempontjából alapvető fontossággal bír *G. L. Cantoni* munkássága, aki tisztázta az S-adenozil-metionin (SAM), mint kofaktor szerepét ezekben a reakciókban.

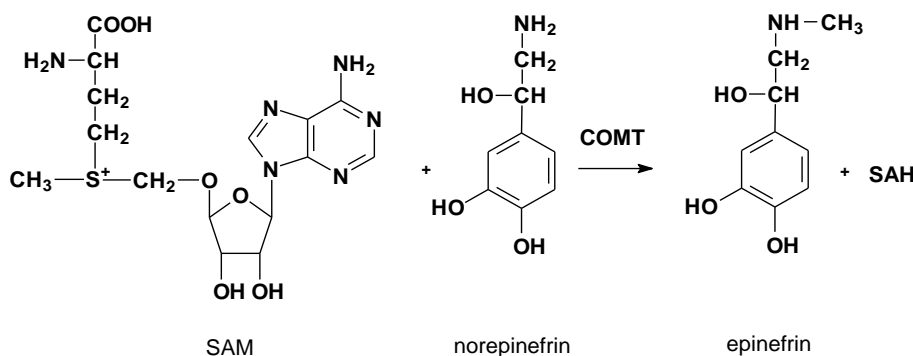
Az S-adenozil-metionin (SAM) szintézisét és regenerálódást az ún. *SAM-ciklus* foglalja össze. A SAM ciklus első lépése maga a metilezési reakció, melyben a SAM-dependens metiltranszferázok (E.C. 2.1.1.) által katalizált reakcióban a szubsztrát N-, O-, S-, vagy C-atomja metileződik. A reakcióban a metilezett szubsztrát (Nu-CH₃) mellett S-adenozil-homocisztein (SAH) képződik. Ezt követően a képződött SAH egy, a SAH-hidroláz (E.C. 3.3.1.1.) enzim által katalizált reakcióban adenzinra és homociszteinre hidrolizál. A képződő homocisztein háromféleképpen alakulhat tovább: remetilálódhat, transzszulfurálódhat (GSH szintézis) és oxidálódhat. A homocisztein remetilációját kobalamin-dependens (E.C. 2.1.1.13.), vagy kobalamin-independens (E.C. 2.1.1.14.) metionin-szintáz enzimek katalizálják. A SAM-ciklus befejező reakciója a metionin ATP-vel lejátszódó, a SAM-szintetáz (E.C. 2.5.1.6.) enzim által katalizált reakciója (XII-1. ábra)

XIII-1. ábra. Az S-adenozil-metionin (SAM) ciklus



A SAM szerkezetéből látható, hogy az egy karbóniumion karakterű vegyület, és így a metiltranszferáz akceptor molekulák nukleofil (elektronban gazdag) centrumaival (pl. O-, S-, N-atomok) kialakuló kölcsönhatás eredményeképpen játszódik le. Következésképpen, a metilezésben résztvevő legfontosabb szerves vegyületek a fenolok, katecholszármazékok, alifás és aromás aminok, nitrogéntartalmú heterociklusok, valamint a tioalkoholok. A norepinefrin katechol-O-metiltranszferáz (COMT) enzim által katalizált O-metilezési reakciójának egyszerűsített folyamatát a XIII-2. ábra mutatja be.

XIII-2. ábra. A norepinefrin katechol-O-metiltransferáz (COMT) enzimek által katalizált O-metilezési reakciója



A metilezés – az acetilezéshez hasonlóan – általában csökkenti az anyavegyület vízdékonyságát és megszünteti olyan nukleofil csoportok reaktivitását, melyek más Fázis II enzimek által katalizált reakciókban az anyavegyületnél polárosabb származékokat képezhetnek. Kivételt képez a piridingyűrűt tartalmazó testidegen anyagok *N*-metilezési reakciója, aminek eredményeképpen pozitív töltésű piridínium-kationt hordozó metabolitok képződnek.

A metilezési reakciók típusai és az azokat katalizáló legfontosabb enzimek a következők:

1.) O-metilezés

Reakció: Fenolos hidroxilcsoportok metilezése
 Enzimek: Fenol-O-metiltransferáz (POMT)
 Katechol-O-metiltransferáz (COMT)

2.) N-metilezés

Reakció: Különböző aminok metilezése
 Enzimek: Fenil-etanolamin-N-metiltransferáz (PNMT)
 Hisztamin-N-metiltransferáz (HNMT)
 Nikotinamid-N-metiltransferáz (NNMT)

3.) S-metilezés

Reakció: Tiolok metilezése
 Enzimek: Tiopurin-metiltransferáz (TPMT)
 Tiol-metiltransferáz (TMT)

4.) C-metilezés

Reakció: Citozin metilezése (DNS-ben)
 Enzimek: m5C DNS-metiltransferáz

Az S-metilezési reakciók az SH-funkciót hordozó testidegen anyagok egyik jelentős metabolikus átalakítása. E csoportba tartozó gyógyszervegyületek közé tartozó gyógyszerek közé tartozik többek között a kaptopril, a D-penicillamin, a 6-merkaptopurin, a 6-tioguanin és az azatioprin.

XIII.1 Mechanizmus

A metilezési reakciókat katalizáló SAM-dependens metiltransferázok az enzimek egy diverz csoportját képezik. E csoportok által katalizált reakciók közül a biológiai folyamatok szabályozásában különösen fontos szerepet tölt be a

1. nukleinsavak metilezése,
2. fehérjék metilezése,

3. anyagcseretermékek és közttermékek metilezése, valamint
4. testidegen anyagok metilezése

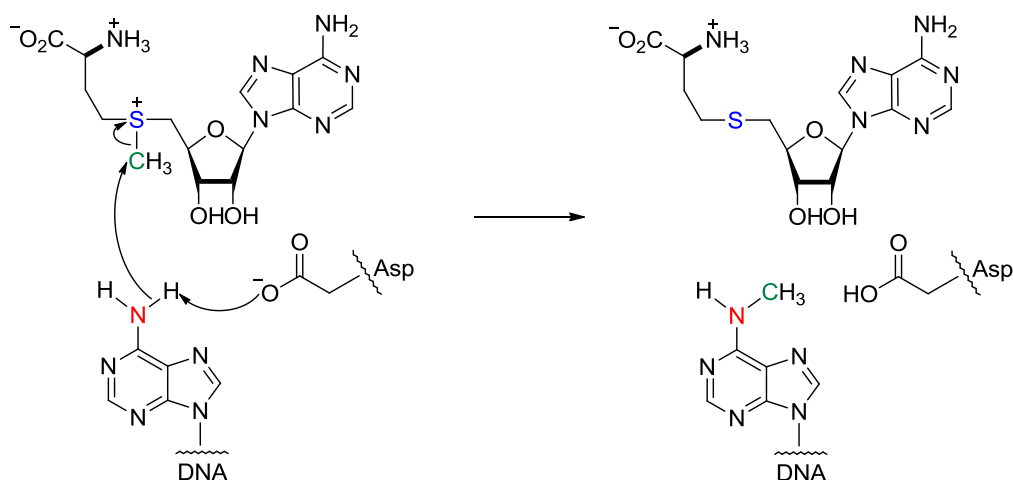
A nukleinsavak metilezését katalizáló DNS-metiltranszferáz enzimek szubsztrát specifitásuk alapján háromcsoportba oszthatók:

- a.) m6A (E.C. 2.1.1.72.) – melyek az N₆-metiladenin,
- b.) m4C (E.C. 2.1.1.113.) – melyek az N₄-citozin, valamint a
- c.) m5C (E.C. 2.1.1.37.) – melyek a C₅-metilcitozin képződését katalizálják.

Az adenin ill. a citozin egységek metilezése fontos szerepet játszik a duplikációt követően a "szülő" és a komplementer "utód" láncok és az idegen DNS megkülönböztetésében ill. a génaktivitás szabályozásában. A metilezés is jelentős szerepet játszik a gének aktivitásában is. Az aktív gének sokkal kevesebb metilezett (5')CG(3') (citozin-guanin) szekvenciapárt tartalmaznak, mint az inaktívak.

A metilezési reakciók a szubsztrát nukleofil karakterű N-, O-, S- vagy C-atomja valamint az elektrofil tulajdonságú metilcsoportja között zajlanak le. A DNS adenin egységei metilezési reakcióinak egyszerűsített mechanizmusát a XII-3. ábra mutatja be.

XIII-3. ábra. A DNS adenin egységének m6A DNS-metiltranszferáz enzimek által katalizált N6-metilezési reakciója

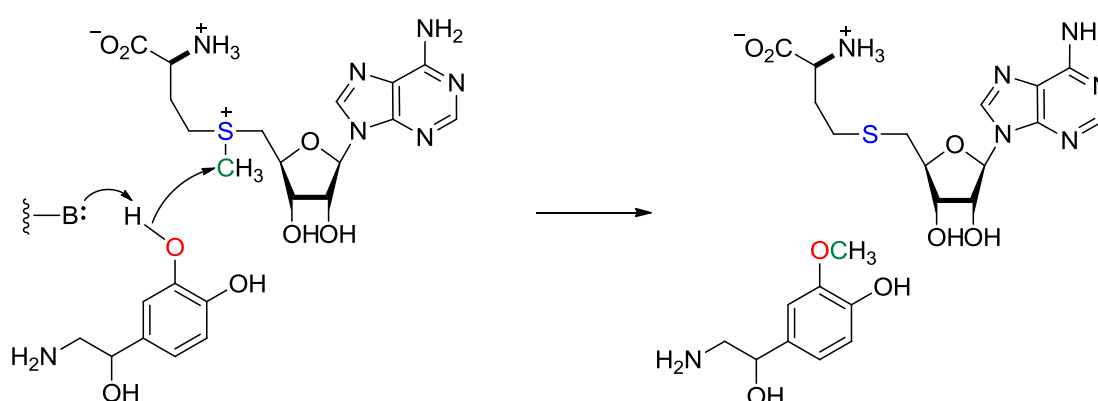


A fehérjék enzimatisz metilezése a prokarióta és eukarióta sejtekre egyaránt jellemző. Ezek utólagosan végrehajtott szubsztitúcióként N-, S-metilezési és karboxilmetilezési (O-metilezési) reakciók lehetnek. Számos fehérje nitrogén atomjain metilezett lizin, arginin, hisztidin, alanin, prolin, glutamin, fenil-alanin, aszparagin és metionin egységekkel rendelkezik. A cisztein ill. aszparaginsav és glutaminsav tartalmúak kén atomokon ill. karboxilcsoportokon keresztül metileződhetnek. Metilezett aminosavakat tartalmaz pl.: a hiszton, a riboszóma fehérje, a kalmodulin, a citokróm c, a miozin, a flagella fehérje, az opszin, a ferredoxin, az α -amiláz, a hősokek fehérje, stb.

A metilezés a makromolekuláris anyagok utólagos módosítása mellett fontos szerepet játszik az anyagcsere termékeinek ill. közttermékeinek szintézisében is. A metilezés részt vesz a pterin, a klorofill, néhány aminosav (pl. lizin, arginin), hormon (pl. hisztamin, norepinefrin), membránalkotó (pl. foszfatidil-etanolamin), stb. keletkezésében. A metiltranszfer reakciók leggyakoribb akceptorai a szubsztrátok N- és S-atomjai valamint fenolos hidroxil- és karboxilcsoportjainak oxigénatomjai.

A metilezés során a N-, S-, O- és C-atomok hidrogénjeinek metilcsoporttal történő helyettesítése megváltoztatja a kiindulási vegyület (szubsztrát) fizikai és kémiai tulajdonságait (molekulatömeg, hidrofóbicitás, kötéserősség, sav-bázis karakter, stb.). Ennek következtében a metilezett származék biológiai sajátsága jelentősen eltérhet az akceptorétól. Szubsztrátok metilezése-demetilezése megakadályozhatja az enzimszubsztrát komplex kialakulását ill. komplexképzés esetén a szubsztráton végrehajtandó kémiai átalakulást. A norepinefrin N-metilezése a biológiai aktivitás fokozódás, O-metilezése az inaktiválódás ismert, klasszikus esetei közé tartozik. A norepinefrin katechol-O-metiltransferáz (COMT) enzimek által katalizált O-metilezési reakciójának egyszerűsített mechanizmusát a XIII-4. ábra mutatja be.

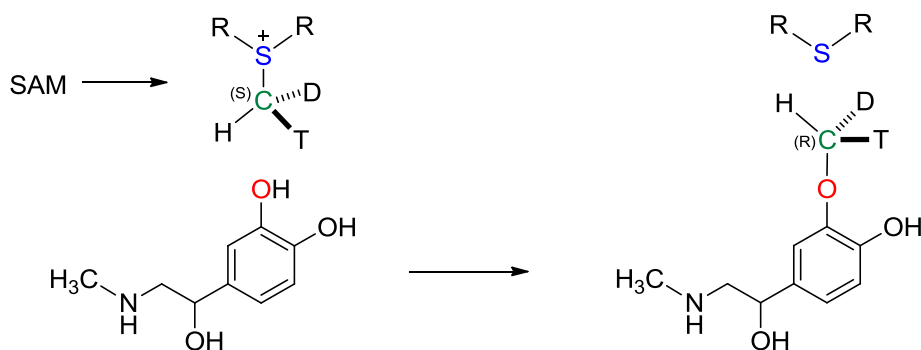
XIII-4. ábra. A norepinefrin katechol-O-metiltransferáz (COMT) által katalizált O-metilezési reakciója



Mindkét bemutatott metilezési reakció esetében az enzim aktív helyén lokalizált szubsztrát nukleofil csoportját az enzimfehérje bázikus funkciós csoportja deprotonálja, megnövelve így a szubsztrát funkciós csoportjának (NH₂, OH) nukleofil erejét. Mindkét reakcióban az elektronban elszegényített metilcsoport szénatomja az elektrofil reakciócentrum. A pozitív töltéssel bíró kénatom az elektrofil metilcsoportnak kiváló távozócsoport tulajdonságot biztosít, elősegítve a reakció lezajlását.

A reakciók mechanizmusát illetően a XIII-5 ábrán bemutatott, katechol-O-metiltransferáz (COMT) enzim alkalmazásával elvégzett kísérlet eredménye nyújtott információt.

XIII-5. ábra. Az epinefrin katechol-O-metiltransferáz (COMT) enzimek által katalizált O-metilezési reakciójának S_N2 reakciója



A kísérleti tapasztalatok alapján a királis – hidrogén (^1H , H), deutérium (^2H , D) és trícium (^3H , T) atomokat hordozó – metilcsoportot tartalmazó SAM koszubsztrát metilcsoportjának konfigurációja ellentétessé vált. A kiralitáscentrum inverziója $\text{S}_{\text{N}}2$ mechanizmussal volt magyarázható.

XIII.2 Irodalom

- Cantoni G.L. Biological methylation: selected aspects. *Ann. Rev. Biochem.* 44:435–451 (1975)
- Smith and Williams' Introduction to the Principles of Drug Design and Action. (Editor: Smith H.J.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam (1998)
- Scavetta R.D., Thomas C.B., Walsh M.A., Szegedi S., Joachimiak A., Gumport R.I., Churchill M.E.A.: Structure of *RsrI* methyltransferase, a member of the *N6*-adenine β class of DNA methyltransferases. *Nucl. Acids Res.* 28: 3950-3961 (2000)
- Novák L., Nyitrai J., Hazai L.: Biomolekulák kémiája. MKE, Budapest (2001)
- Ádám V., Dux L., Faragó A., Fésüs L., Machovich R., Mandl J., Sümegi B.: Orvosi biokémia. Medicina Kiadó, Budapest (2001).
- Silverman R.B.: The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions, Revised edition. Elsevier, London (2002)
- Parkinson A.: Biotransformation of xenobiotics. In Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Seventh Edition. (Editor: Klaassen C.D.). McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY (2008)
- Gyógyszerészi kémia. Szerk.: Fülöp F., Noszál B., Szász Gy., Takácsné Novák K. Semmelweis Kiadó, Budapest (2010)
- A gyógyszerkutatás kémiája. Szerk. Keserű Gy. M. Akadémiai Kiadó, Budapest (2011)
- Gyógyszerek. Szerk. Faigl F. Elektronikus tankönyv. BME, Budapest (2011)
- Jancová P., Siller M.: Phase II drug metabolism. In Topics on drug metabolism (Editor: Paxton J.) Intech (2012) (<http://www.intechopen.com/books/topics-on-drug-metabolism>)
- Lemke T.L., Williams D.A., Roche V.F., Zito S.W.: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2013)
- Perjési P.: Gyógyszermetabolizmus és gyógyszer toxicitás. Elektronikus tananyag. PTE, Pécs (2014)