

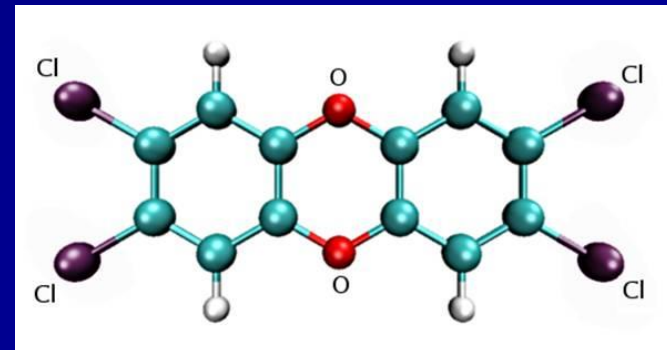
Биохимические механизмы детоксикации

О.В.Островский

Ксенобиотики (Xenobiotics)

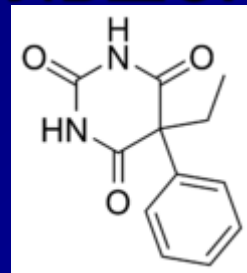
Любые инородные вещества,
попадающие в организм человека.

- Лекарственные препараты
- Токсины природного происхождения
- Синтетические органические вещества искусственного происхождения (пищевые добавки)
- Продукты жизнедеятельности сапрофитной флоры

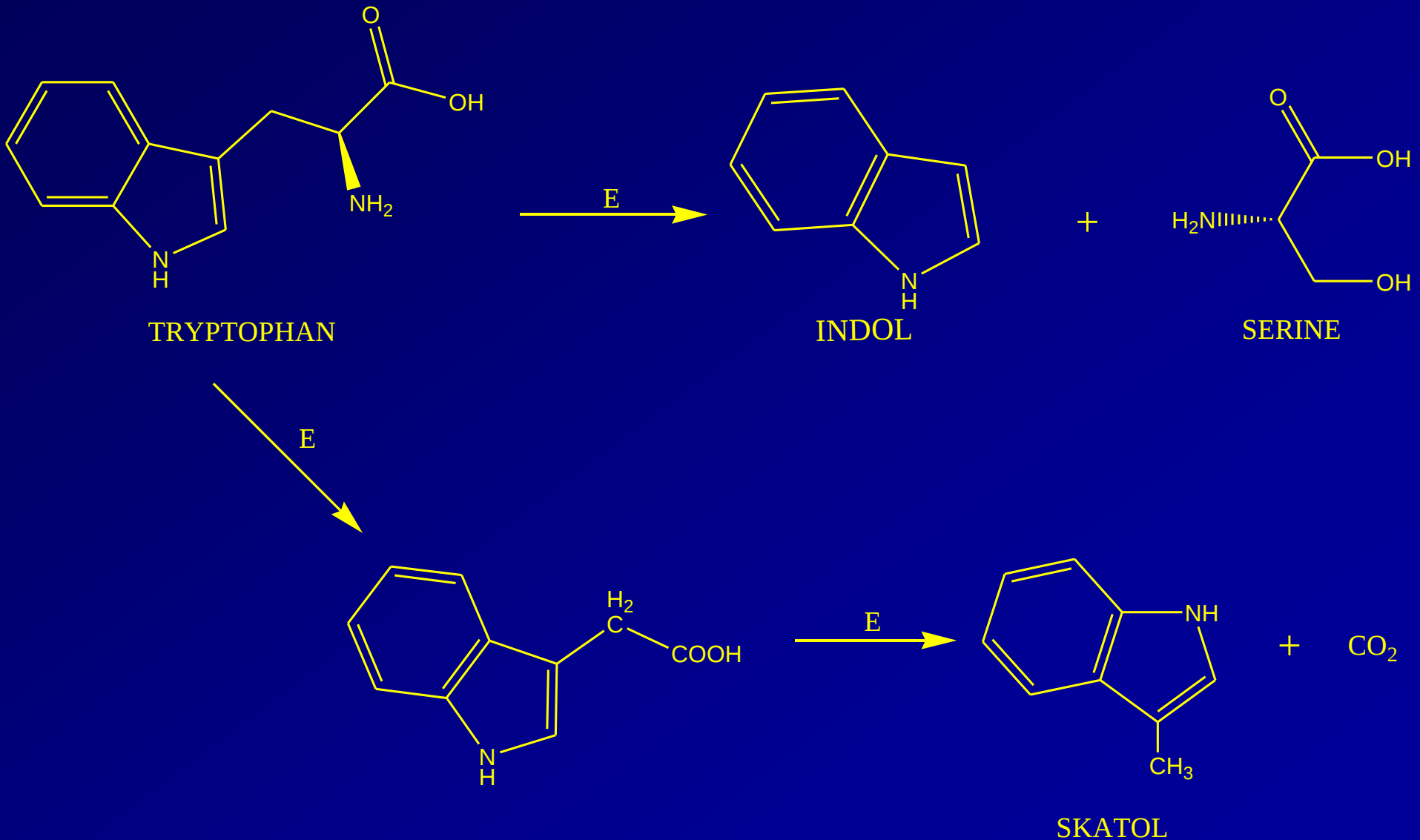


Некоторые факты

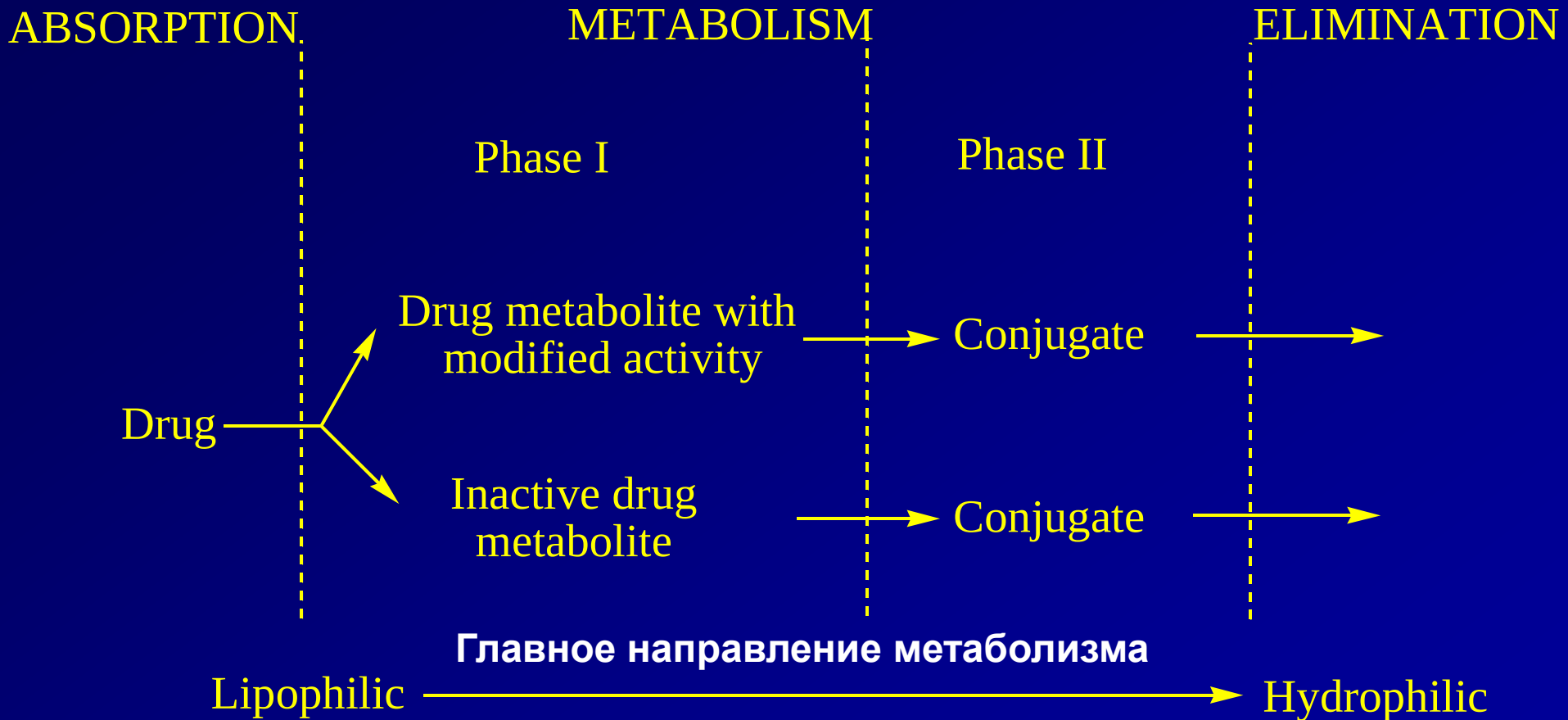
- Фенобарбитал имел бы бесконечно большой период выведения, если бы он не метаболизировался.
- Метаболиты часто менее активны чем их предшественники. Хотя может быть и наоборот



Tryptophan catabolic degradation by bacteria.



Реакции Phase I and phase II в биотрансформации ксенобиотиков



Иногда Phase II реакции могут предшествовать phase I реакциям

I фаза детоксикации

- Оксидазы со смешанными функциями
- Эстеразы, амидазы и другие гидролазы

Синонимы

- Ферменты микросомального окисления
- Оксидазы со смешанными функциями
- Монооксигеназная система
- Система цитохрома P450

Ферменты микросомального окисления

Локализация

Микросомы - мелкие гранулы (размером до 100 нм), получаемые при фракционном центрифугировании клеточных гомогенатов, представляющие собой рибосомы, обломки мембран эндоплазматического ретикулума

Оксидазы (гидроксилазы) со смешанными функциями

Монооксигеназная система

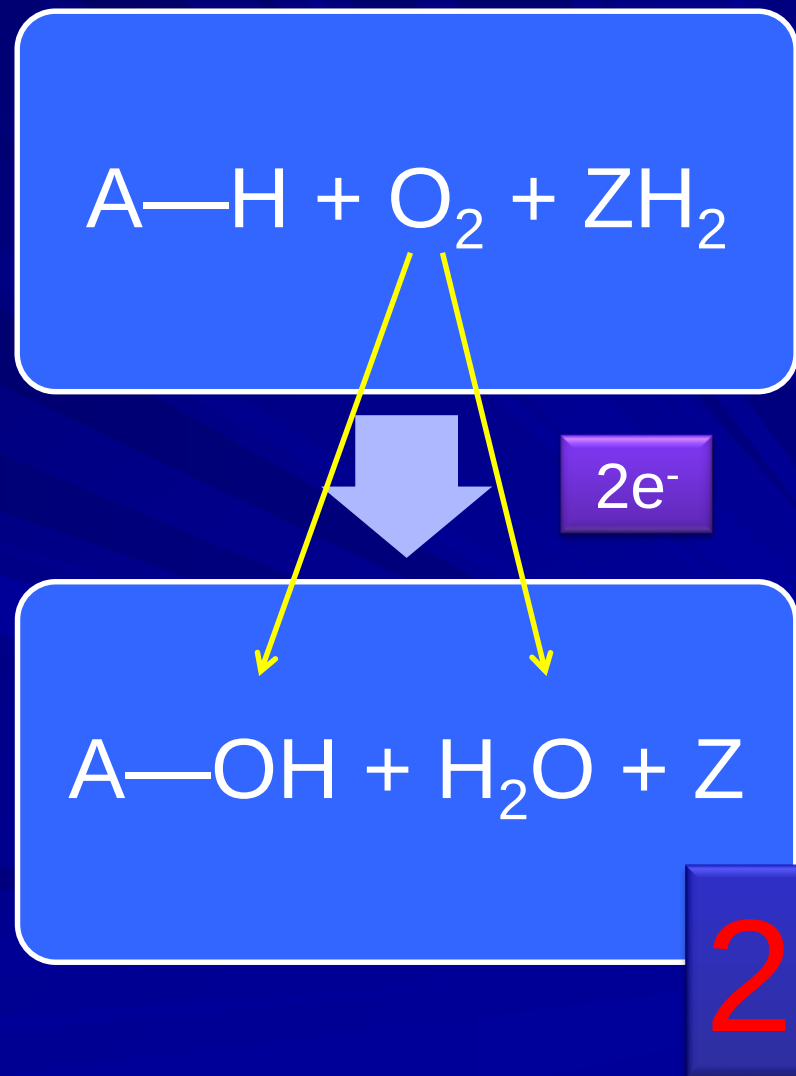
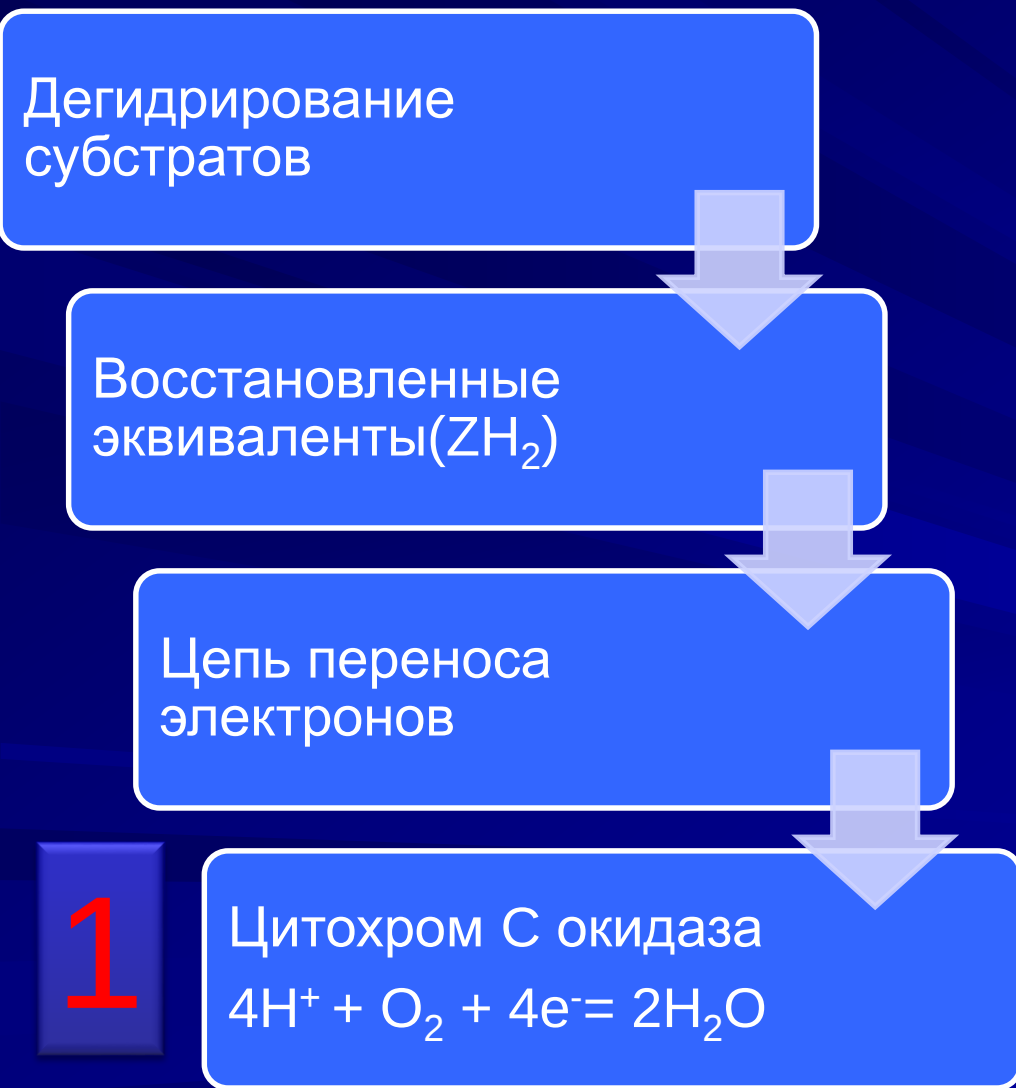
- Только один атом O_2 присоединяется к субстрату, другой получает $2 e^-$ (реализуется 2-х электронный перенос).
- Этот тип окисления отличается от биологического окисления, приводящего к синтезу АТФ (реализуется 4-х электронный перенос в митохондриальной ЦПЭ)



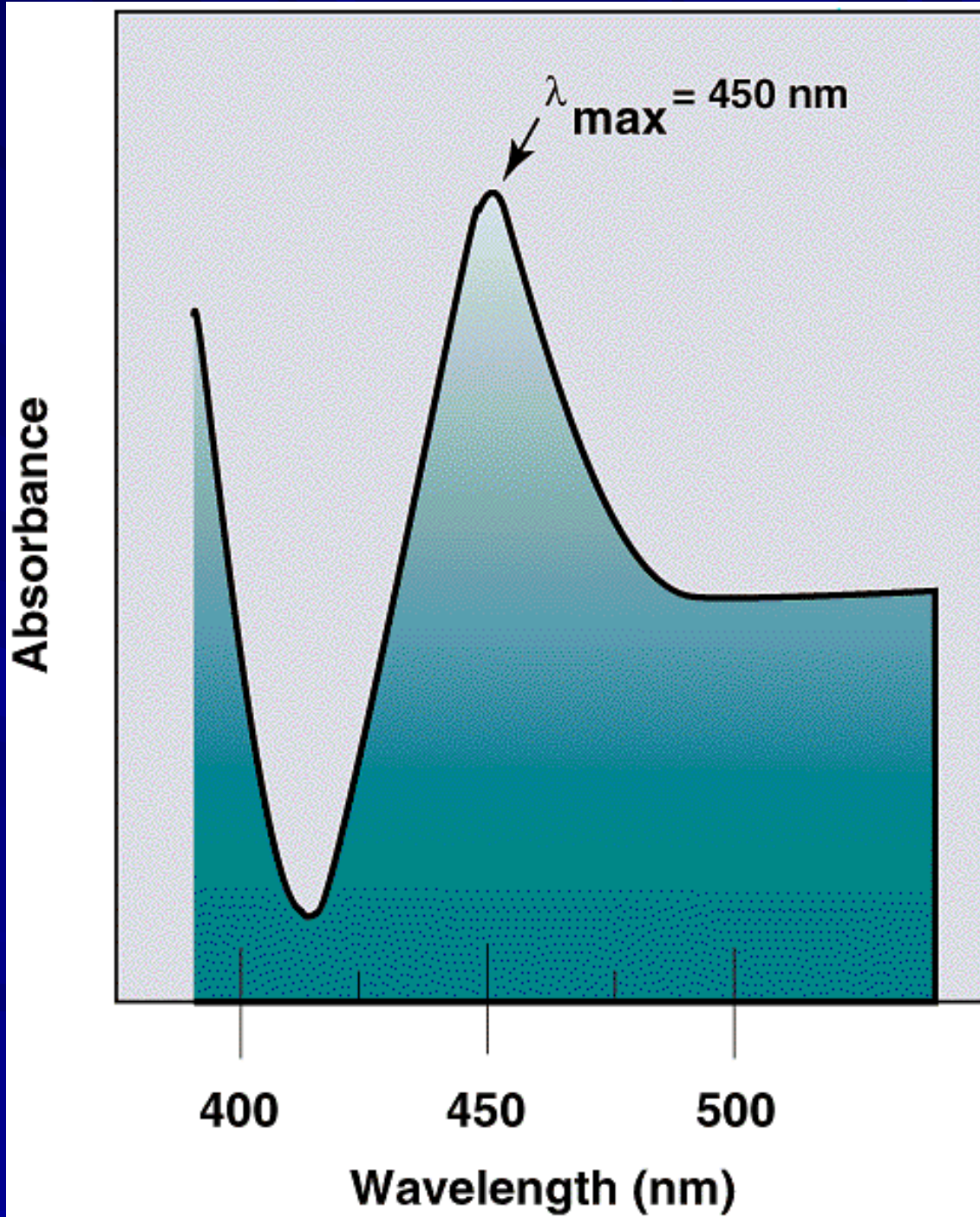
Окисление субстрата происходит в 2 этапа

- Связывание кислорода в активном центре
- Реакция в которой кислород восстанавливается или вставляется в молекулу субстрата.

Окисление в ЦПЭ (1) против **Монооксигеназной системы (2)**



Цитохром Р450



Цитохром Р450

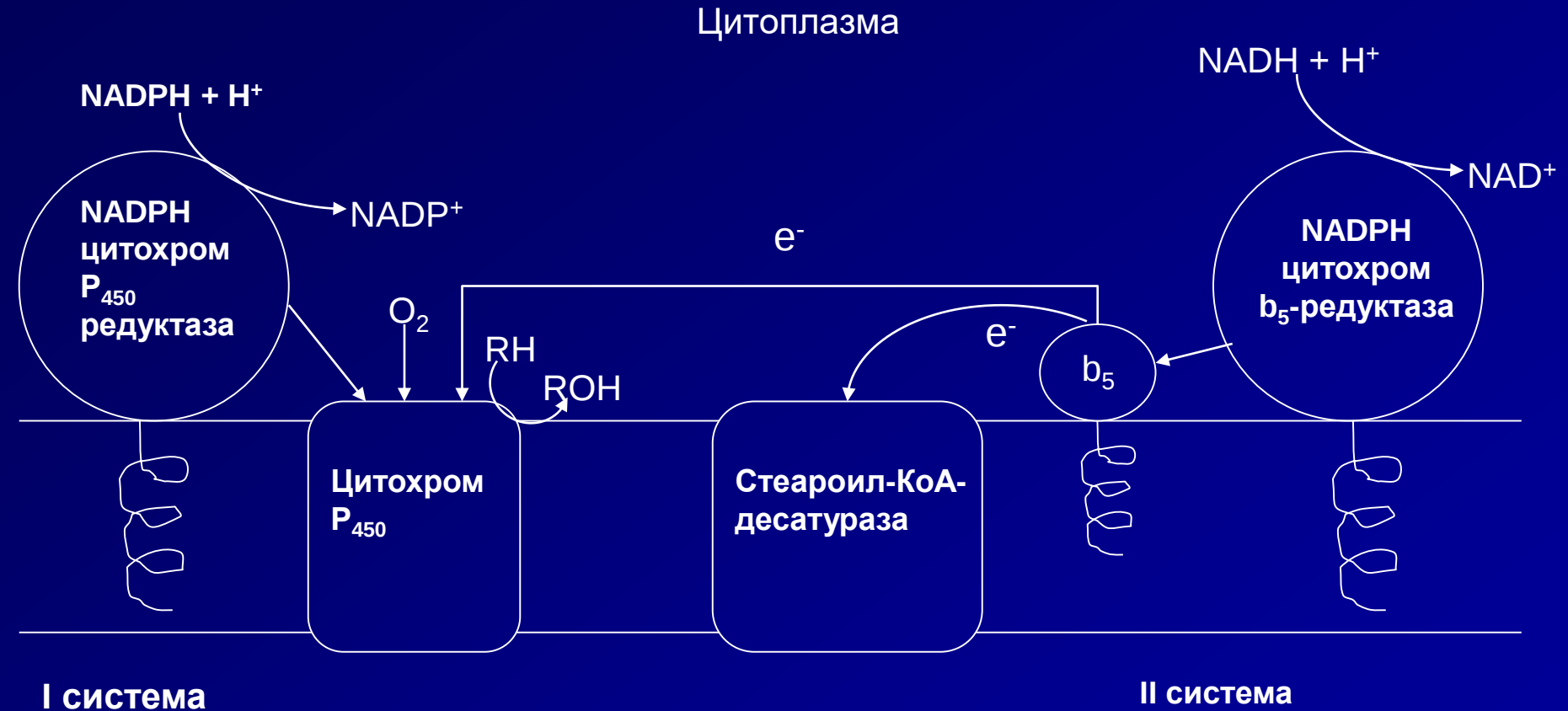
- Система цитохрома Р-450 относится к одной из самых древних ферментативных систем и выявлена у всех прокариотов и эукариотов.
- Структурная организация монооксигеназной системы и ее функциональное значение имеют свои отличия у животных, стоящих на различных ступенях эволюционной лестницы

Структура системы цитохрома Р-450

■ 2 фермента

- НАДФН-цитохром Р450 или НАДФН-цитохром b5 редуктаза
 - Флавопротеин. Содержит 1 молекулу ФМН и одну молекулу ФАД
- Цитохром Р450
 - Гемопrotein содержит железо, которое в ходе реакций меняет валентность между Fe^{++} и Fe^{+++}
 - Тиолатный фермент
 - Акцептор электронов
 - Проявляет оксидазную активность
 - rate-limiting step in the oxidation reaction

Электронтранспортные цепи ЭР

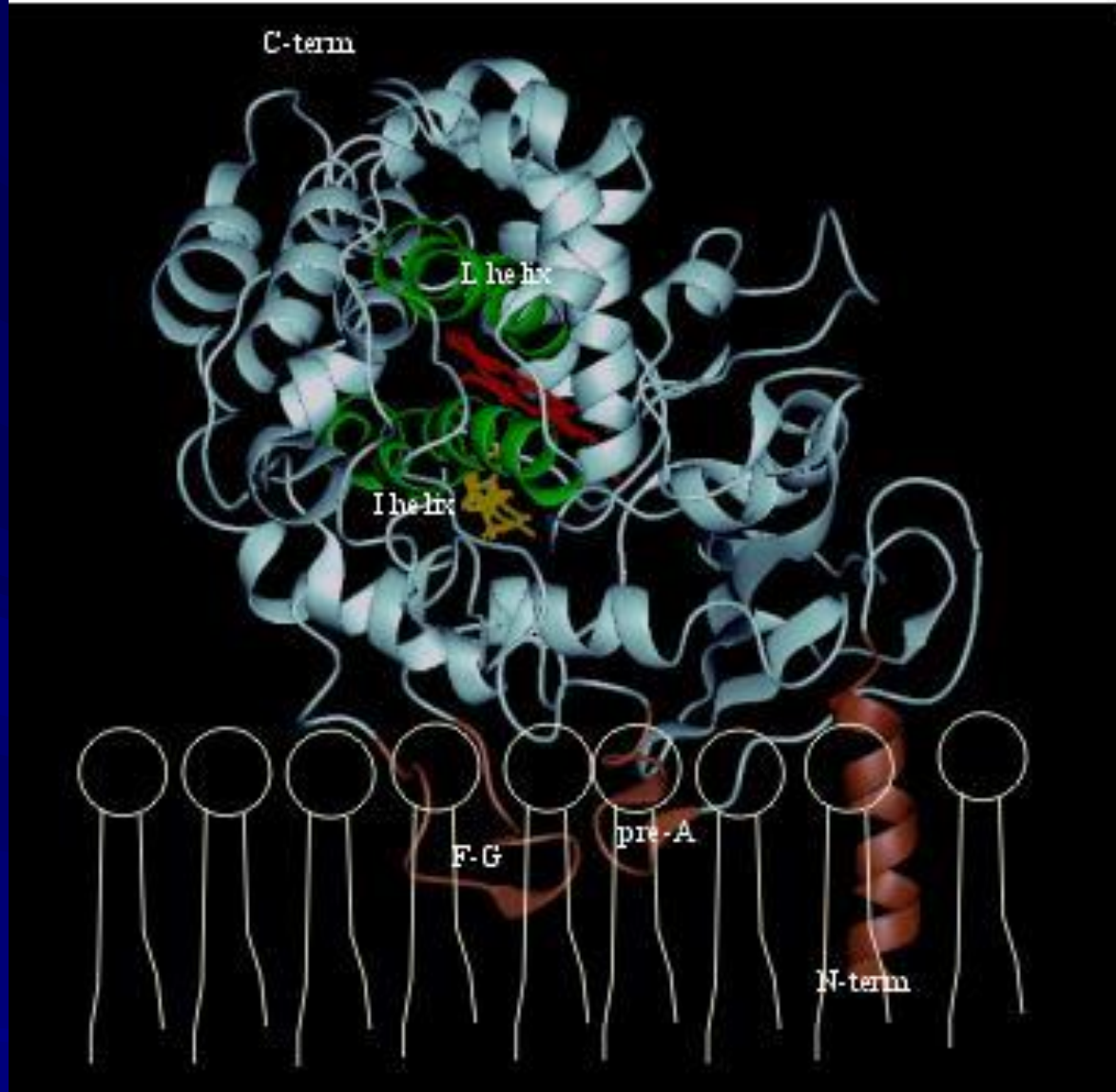


These monooxygenases are found in the microsomes of the liver together with cytochrome P_{450} and **cytochrome b_5** . Both $NADH$ and $NADPH$ donate reducing equivalents for the reduction of these cytochromes, which in turn are oxidized by substrates in a series of enzymatic reactions collectively known as the **hydroxylase cycle**.

CYTOCHROME P450 - Alignment

Bacteria 101A1	F	G	H	G	S	H	L	C	L	G	Q	H	L	A	R	R	E	I	I	V	T	L	K	E	W	L
Yeast 51A1	F	G	G	G	R	H	R	C	I	G	E	H	F	A	Y	C	Q	L	G	V	L	L	M	S	I	F
Fish 1A1	F	G	M	D	K	R	R	C	A	G	E	A	I	G	R	N	E	V	F	L	F	L	A	I	L	L
Chicken 2H1	F	S	A	G	K	R	I	C	V	G	E	G	L	A	R	M	E	I	F	L	F	L	T	S	I	L
Cow 19A1	F	G	W	G	V	R	Q	C	V	G	R	R	I	A	E	L	E	M	T	L	F	L	I	H	I	L
Rabbit 2B	F	S	L	G	K	R	I	C	L	G	E	G	I	A	R	T	E	L	F	L	F	F	T	T	I	L
Rat 3A1	F	G	N	G	P	R	N	C	I	G	M	R	F	A	L	M	N	M	K	L	A	L	T	K	V	L
Rat 4A1	F	S	G	G	A	R	N	C	I	G	K	Q	F	A	M	S	E	M	K	V	I	V	A	L	T	L
Mouse 1a2	F	G	L	G	K	R	R	C	I	G	E	I	P	A	K	W	E	V	F	L	F	L	A	I	L	L
Human 21A1	F	G	C	G	A	R	V	C	L	G	E	P	V	A	R	L	E	L	F	V	L	L	T	R	L	L
Human 19A1	F	G	F	G	P	R	G	C	A	G	K	Y	I	A	M	V	M	M	K	A	I	L	V	T	L	L

Структурный мотив (FXXGXXXCXG)



Model of rat P450 2B1, showing mode of membrane attachment
home.ccr.cancer.gov

Гидроксилазный цикл



Реакции метаболизма различных эндогенных и экзогенных соединений с участием ферментов системы цитохрома Р450

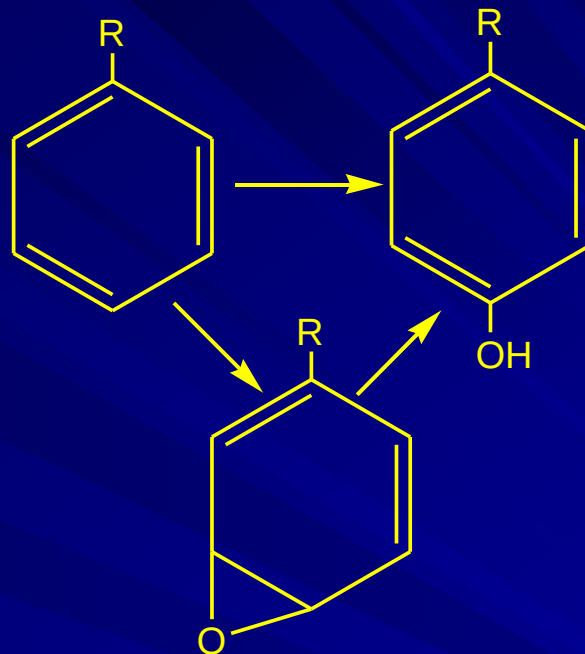
- связывание субстрата (S) с ферментом (железо 3^+);
- восстановление субстрат-ферментного комплекса (присоединение первого электрона) при участии НАДФН цитохром Р450 редуктазы (железо 3^+);
- присоединение молекулы кислорода с образованием фермент-субстратного оксикомплекса (возможно образование супероксиданиона);
- присоединение второго электрона с восстановлением иона железа до валентности 2^+ (НАДФН цитохром Р450 редуктаза);
- присоединение иона водорода к атому кислорода с окислением иона железа, образованием воды и, возможно, пероксида водорода;
- расщепление фермент-субстратного комплекса с образованием окисленного метаболита.

«Неспецифичность» ферментной активности цитохрома Р450

- Субстратная специфичность
- Реакционная специфичность

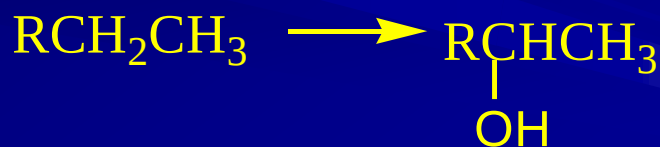
Oxidations

■ Cytochrome P450-dependent Aromatic hydroxylations



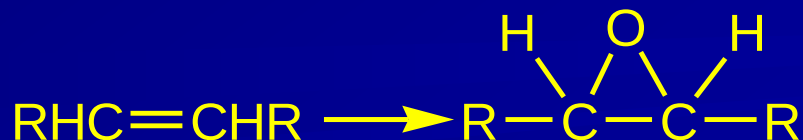
Acetanilid,
propranolol,
phenobarbital,
phenytoin,
phenylbutazone,
amphetamine,
warfarin, 17α-
ethinyl estradiol,
naphthalene,
benzpyrene

■ Aliphatic hydroxylations



Amobarbital,
pentobarbital,
secobarbital,
chlorpropamide,
ibuprofen,
meprobamate,
glutethimide,
phenylbutazone,
digitoxin

■ Epoxidation



■ Oxidative
dealkylation
N-Dealkylation



Morphine, ethylmorphine, benzphetamine, aminopyrine,
caffeine, theophylline

■ O-Dealkylation



Codeine, p-nitroanisol

■ S-Dealkylation



6-Methylthiopurine, methitural

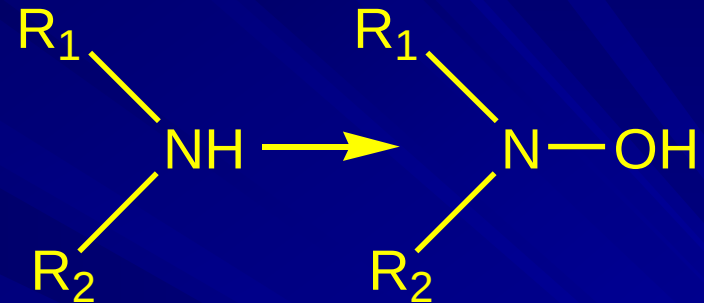
■ N-Oxidation Primary amines

Aniline

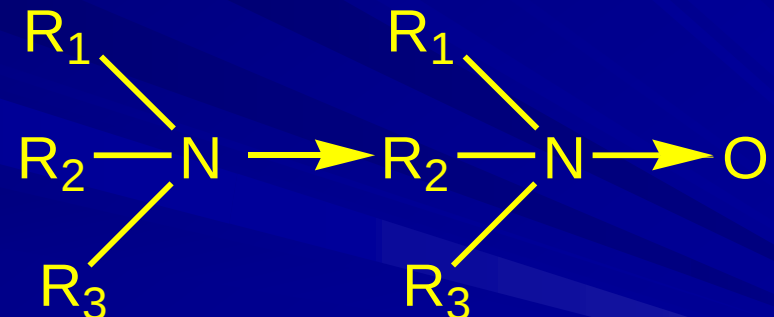


■ Secondary amines

acetaminophen

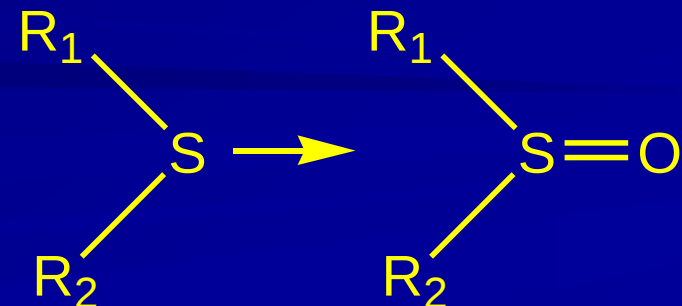


■ Tertiary amines



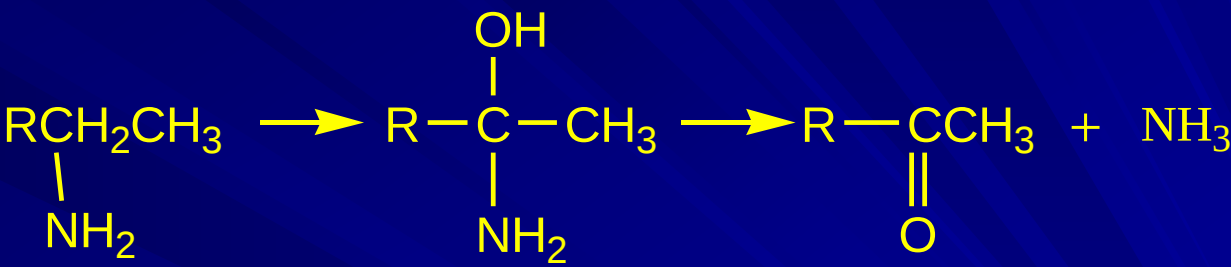
■ S-Oxidation

Thioridazine, cimetidine, chlorpromazine



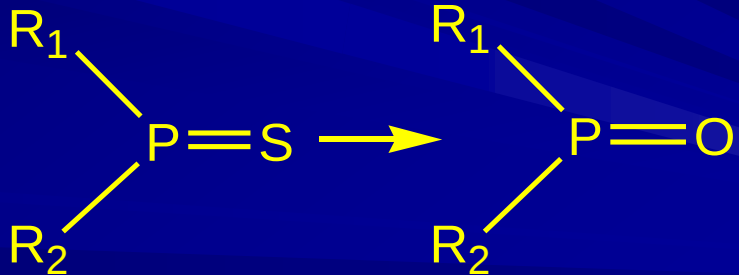
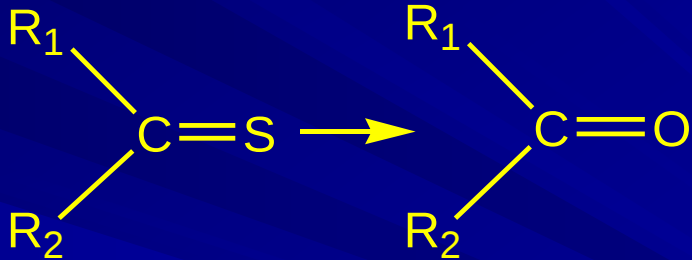
■ Deamination

Amphetamine, diazepam



■ Desulfuration

Thiopental.



■ Dechlorination

Carbon tetrachloride

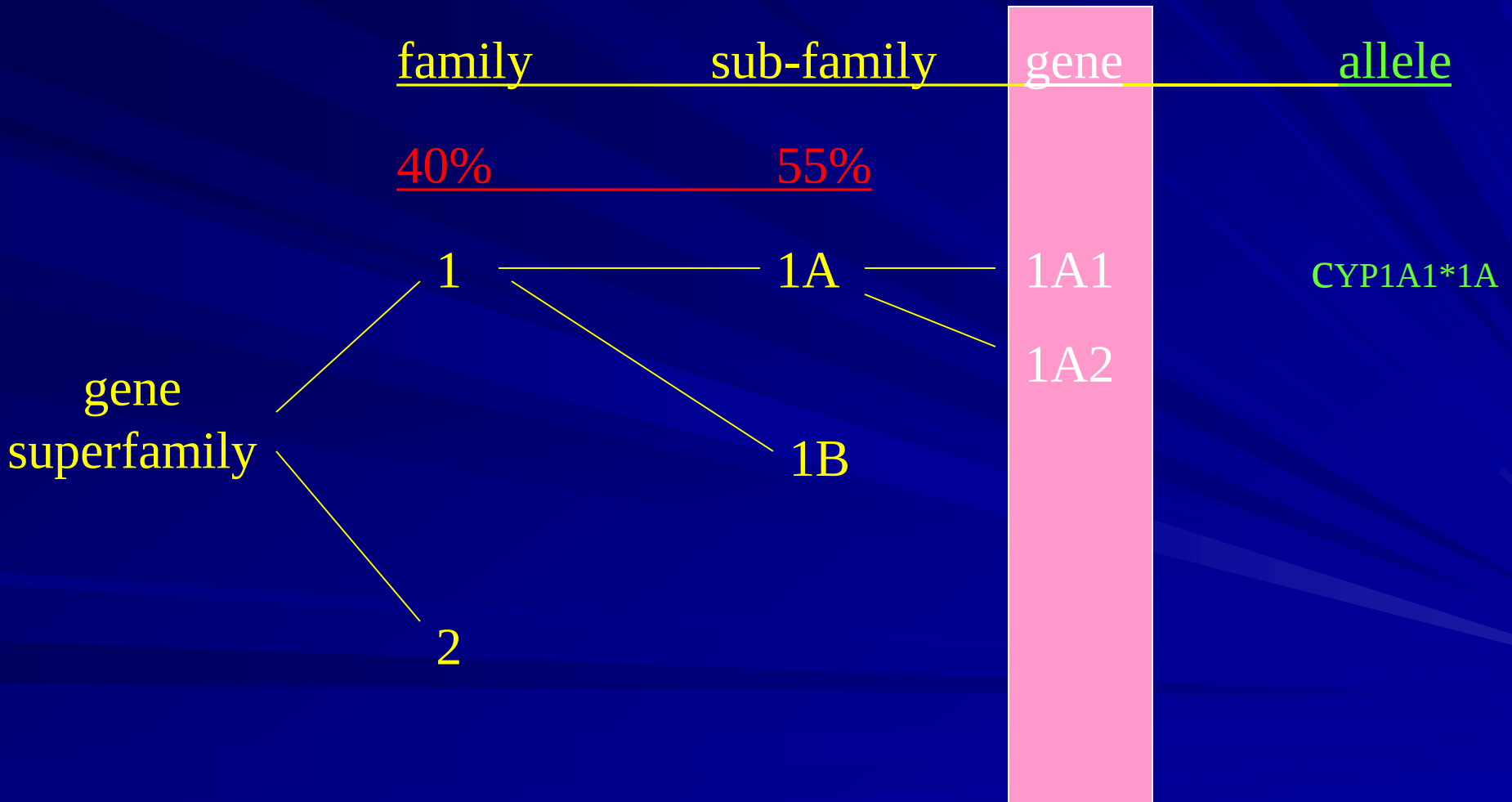


Одна из причин отсутствия
специфичности –
множественность форм
Цитохрома Р450

Cytochrome P450

- **Heme thiolate enzyme**
 - More than 1500 genes identified
 - Humans - approx 60 genes
 - Mice - definitely 80, possibly 86
 - *Drosophila Melanogster* - 90 genes
 - Rice – 485 genes
 - *Caenorhabditidis elegans* - 80 genes
 - *Dictyostelium discoideum* - at least 43 genes
 - *Arabidopsis Thaliana* - 274 genes

CYP450 genes are classified/arranged according to their AMINO ACID sequence similarity



As of 1998 – humans 60 genes + 4 pseudogenes

Often easy to identify orthologues between species eg CYP1A

<u>August 2001</u>	<u>genes</u>
--------------------	--------------

bacteria	75
----------	----

lower eukaryotes	72
------------------	----

plants	52
--------	----

animals	69
---------	----

Номенклатура цитохромов (Cytochrome P450)

Cytochrome P450 Naming



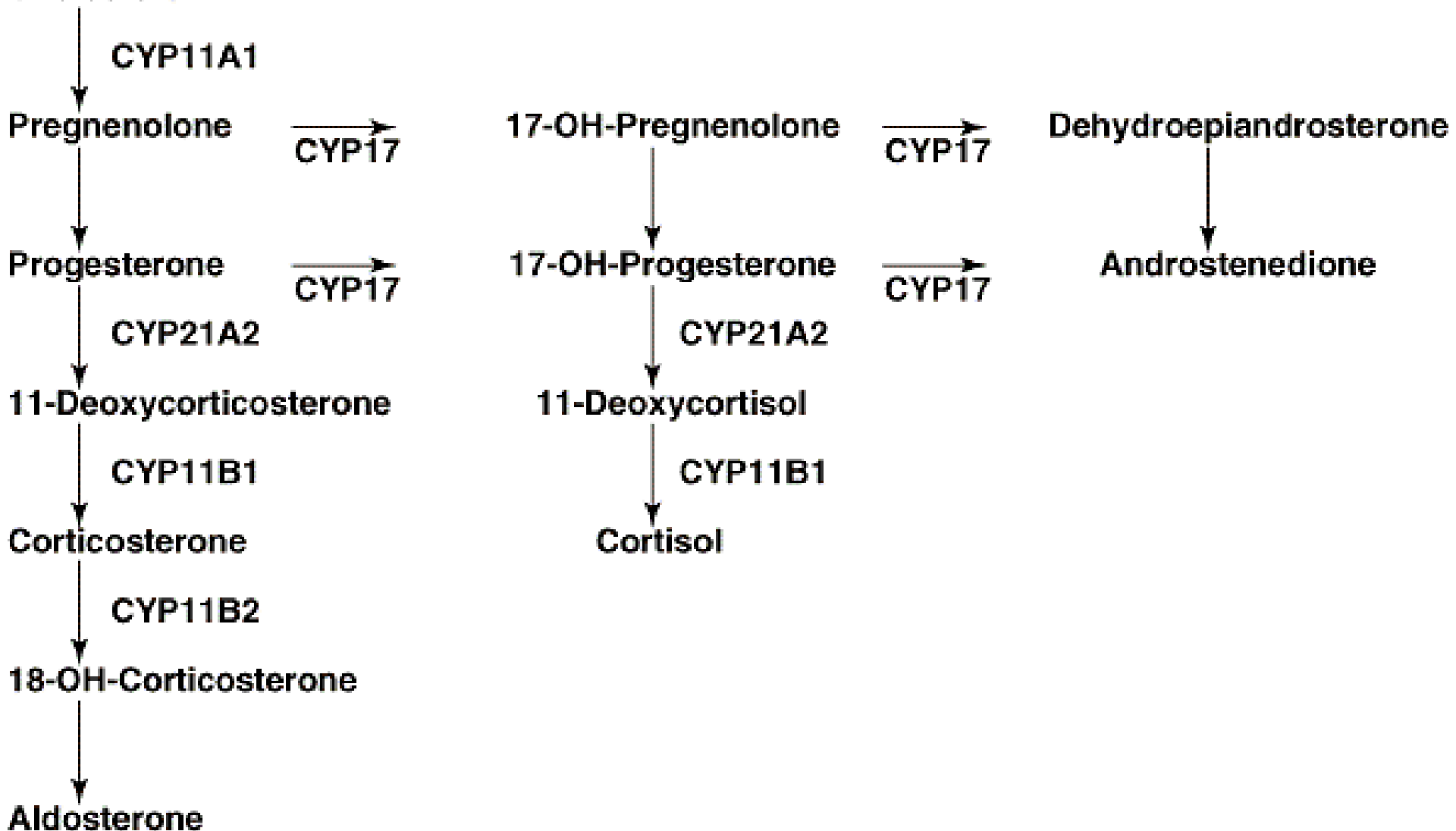
Humans have 18 families of cytochrome P450 genes and 43 subfamilies:

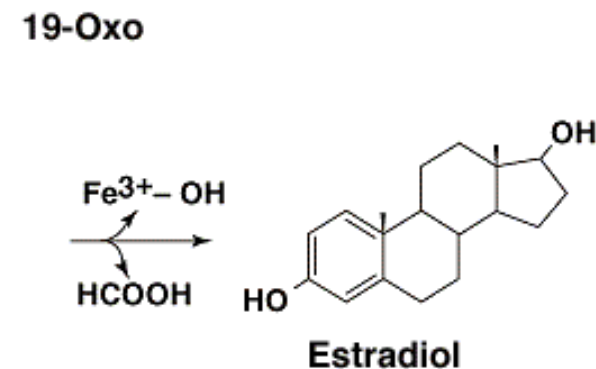
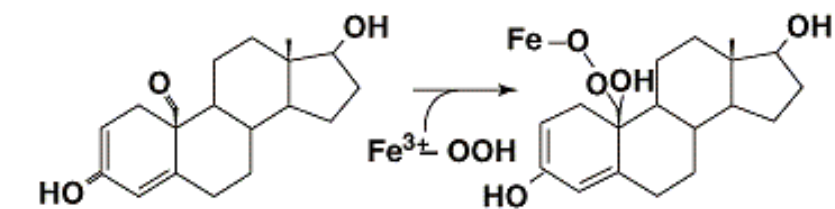
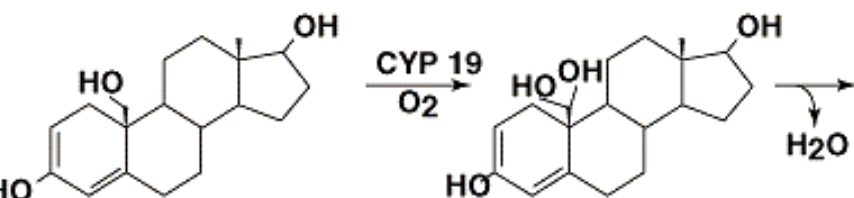
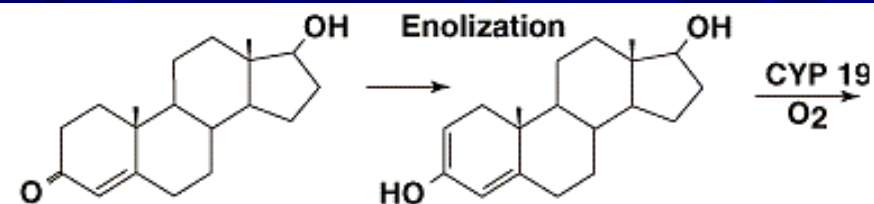
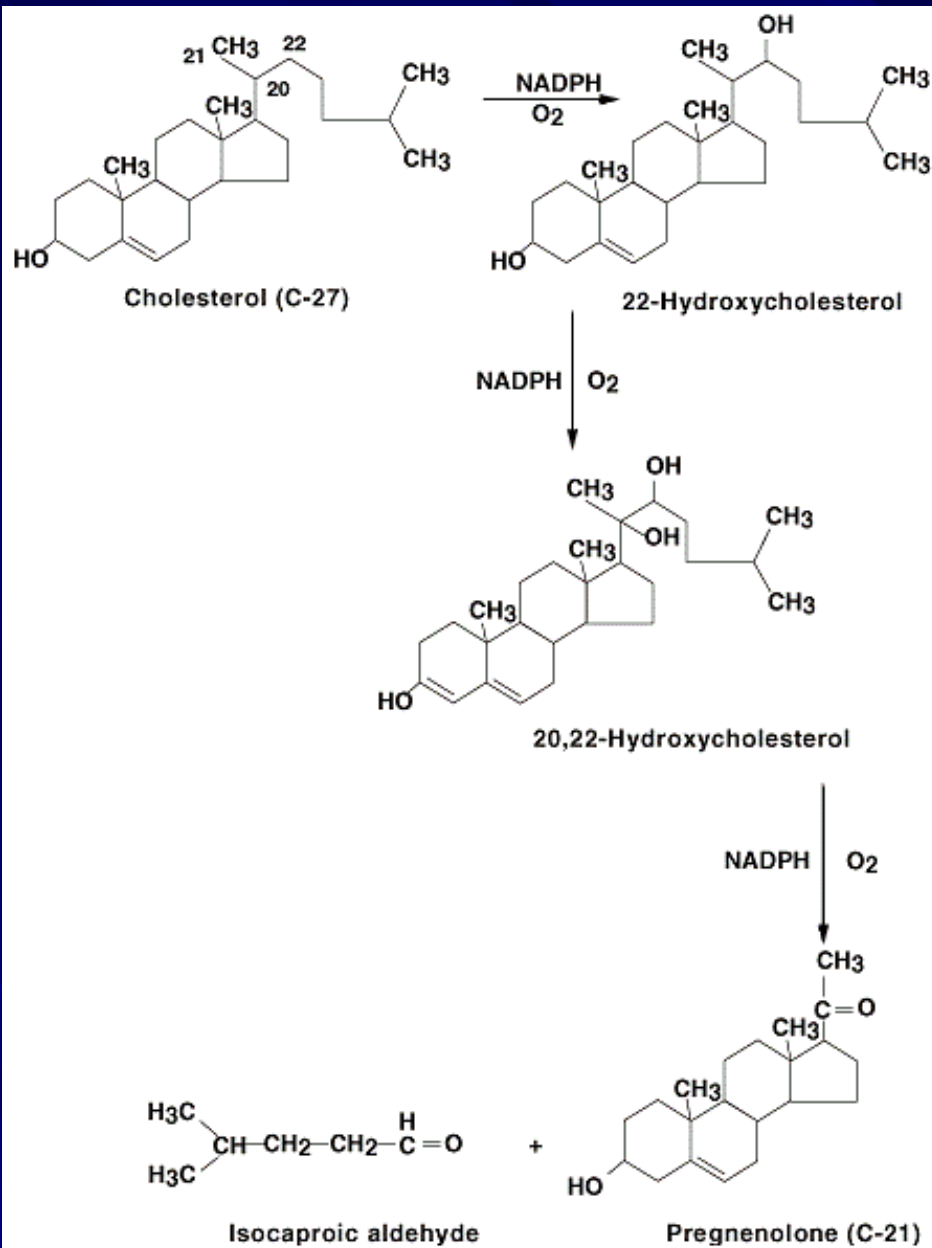
- **CYP1 drug metabolism** (3 subfamilies, 3 genes, 1 pseudogene)
- **CYP2 drug and steroid metabolism** (13 subfamilies, 16 genes, 16 pseudogenes)
- **CYP3 drug metabolism** (1 subfamily, 4 genes, 2 pseudogenes)
- CYP4 arachidonic acid or fatty acid metabolism (5 subfamilies, 11 genes, 10 pseudogenes)
- CYP5 Thromboxane A2 synthase (1 subfamily, 1 gene)
- CYP7A bile acid biosynthesis 7-alpha hydroxylase of steroid nucleus (1 subfamily member)
- CYP7B brain specific form of 7-alpha hydroxylase (1 subfamily member)
- CYP8A prostacyclin synthase (1 subfamily member)
- CYP8B bile acid biosynthesis (1 subfamily member)
- CYP11 steroid biosynthesis (2 subfamilies, 3 genes)
- CYP17 steroid biosynthesis (1 subfamily, 1 gene) 17-alpha hydroxylase
- CYP19 steroid biosynthesis (1 subfamily, 1 gene) aromatase forms estrogen
- CYP20 Unknown function (1 subfamily, 1 gene)
- CYP21 steroid biosynthesis (1 subfamily, 1 gene, 1 pseudogene)
- CYP24 vitamin D degradation (1 subfamily, 1 gene)
- CYP26A retinoic acid hydroxylase important in development (1 subfamily member)
- CYP26B probable retinoic acid hydroxylase (1 subfamily member)
- CYP26C probable retinoic acid hydroxylase (1 subfamily member)
- CYP27A bile acid biosynthesis (1 subfamily member)
- CYP27B Vitamin D3 1-alpha hydroxylase activates vitamin D3 (1 subfamily member)
- CYP27C Unknown function (1 subfamily member)
- CYP39 7 alpha hydroxylation of 24 hydroxy cholesterol (1 subfamily member)
- CYP46 cholesterol 24-hydroxylase (1 subfamily member)
- CYP51 cholesterol biosynthesis (1 subfamily, 1 gene, 3 pseudogenes) lanosterol 14-alpha demethylase

Митохондриальная P450 монооксигеназная система катализирует гидроксилирование стероидов

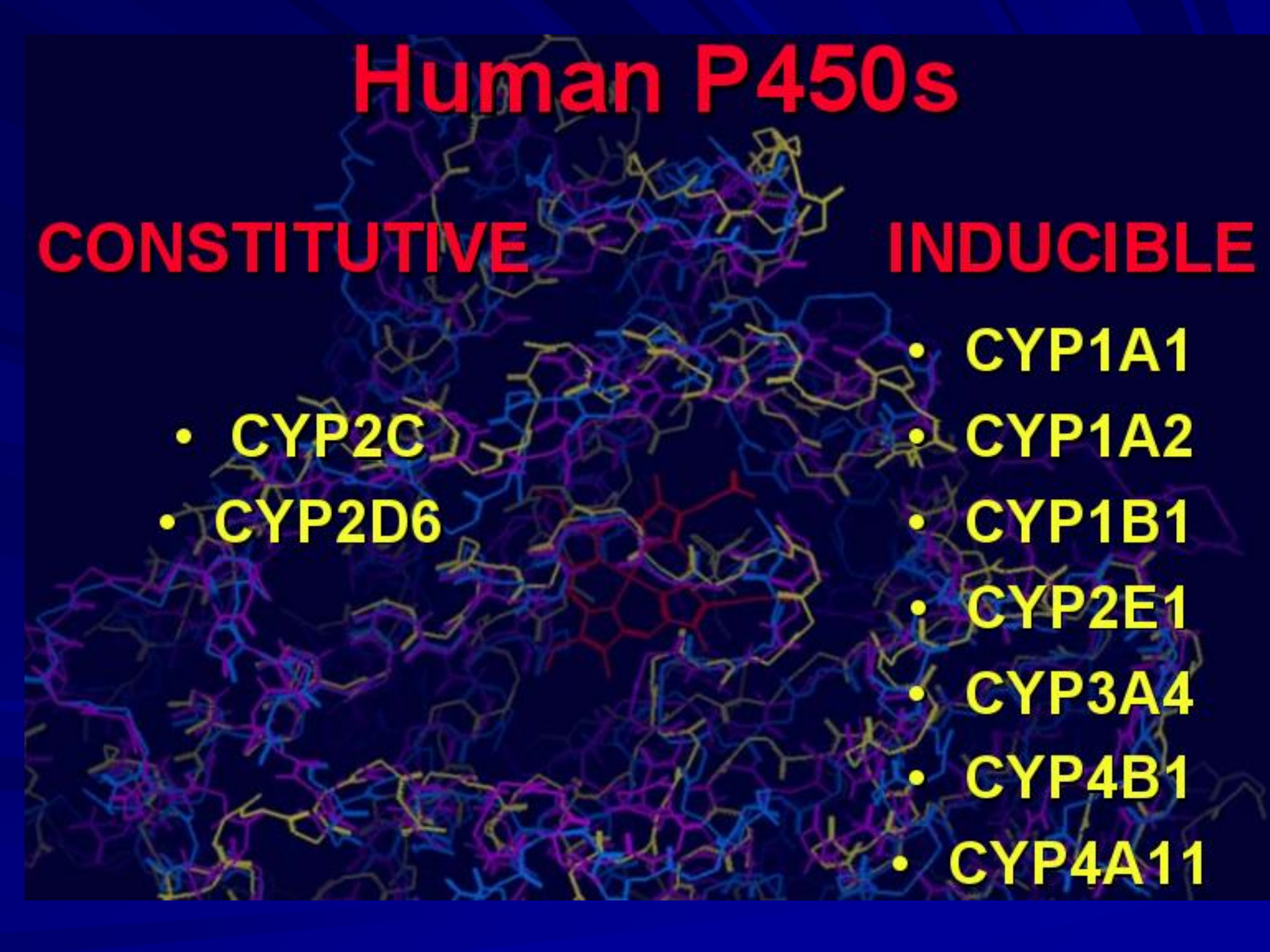
- Эта система сосредоточена в стероидогенных тканях (adrenal cortex, testis, ovary, and placenta)
- В почках она катализирует 1 α - and 24-hydroxylations of 25-hydroxycholecalciferol,
- В печени она катализирует 26-hydroxylation in bile acid biosynthesis.
- В надпочечниках, митохондриальный cytochrome P450 в 6 раз более активен чем цитохромы ЦПЭ

Cholesterol





Human P450s



CONSTITUTIVE

- CYP2C
- CYP2D6

INDUCIBLE

- CYP1A1
- CYP1A2
- CYP1B1
- CYP2E1
- CYP3A4
- CYP4B1
- CYP4A11

Hydrolases

■ Esters



Procaine,
succinylcholine,
aspirin, clofibrate,
methylphenidate

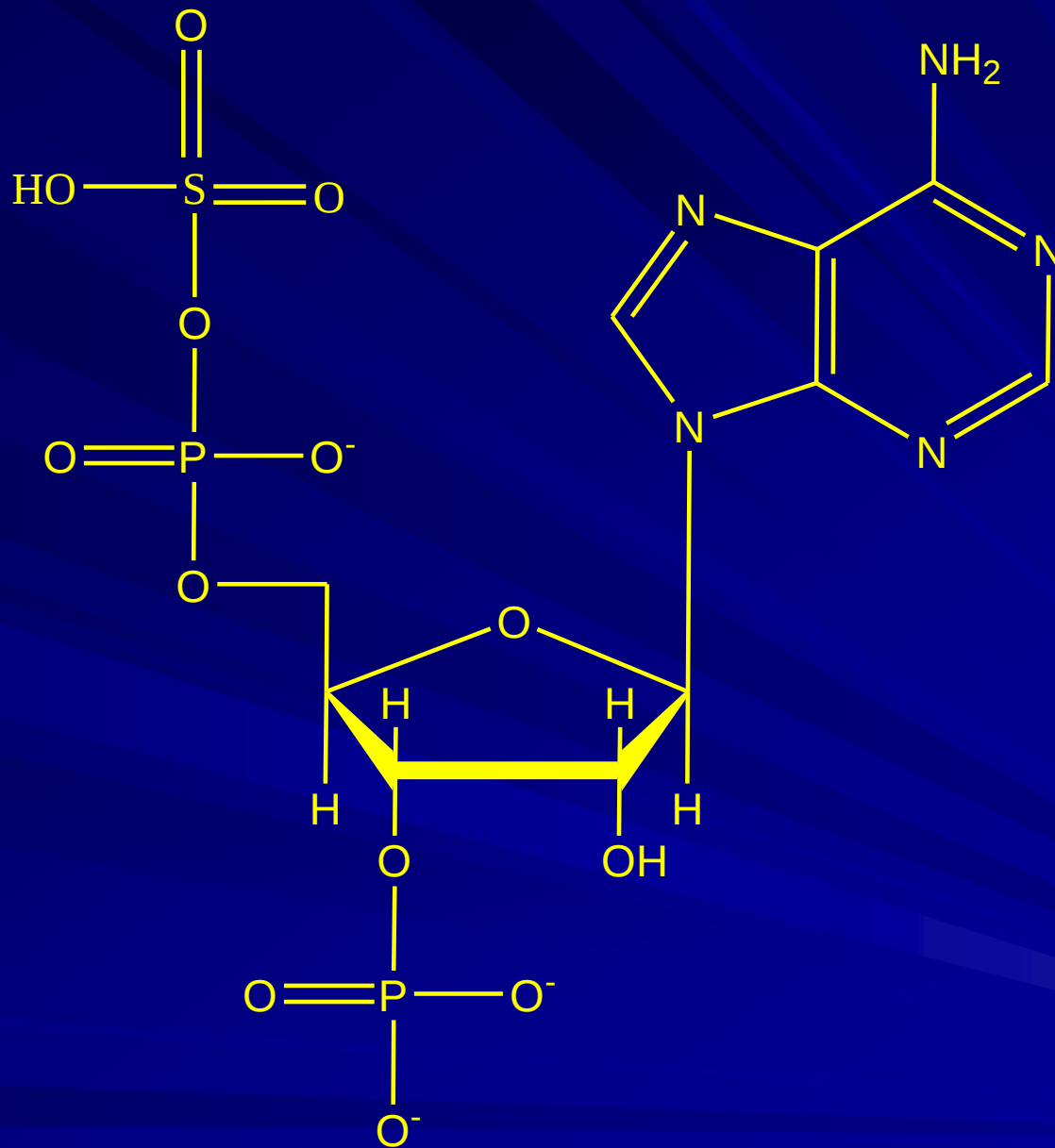
■ Amides



Procainamide,
lidocaine,
indometacin

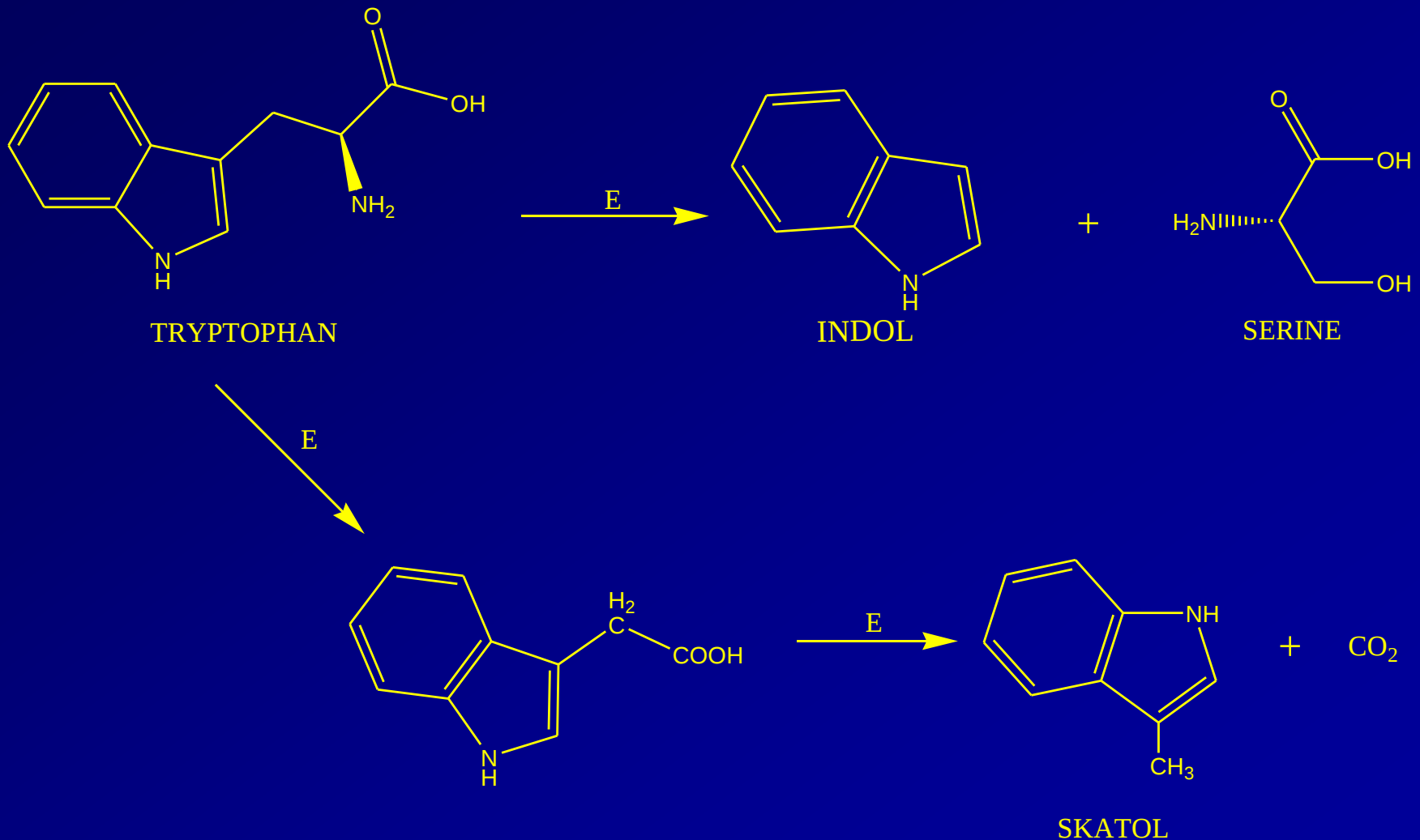
II фаза детоксикации

Тип конъюгации	Эндогенный реактант	Трансферазы (локализация)	Типы субстратов
Глюкуронирование	UDP глюкуроновая кислота	UDP-glucuronyl transferase (microsomes).	Phenols, alcohols, carboxylic acids, hydroxylamines,
Ацетилирование	Acetyl-CoA.	N-Acetyl transferase (cytosol).	Amines.
Конъюгация с глутатионом	Глутатион (GSH)	GSH-S-transferase (cytosol, microsomes).	Epoxides, arene oxides, nitro groups, hydroxylamines.
Конъюгация с глицином	Глицин	Acyl-CoA glycine transferase (mitochondria).	Acyl-CoA derivatives of carboxylic acids.
Сульфатирование	ФосфоаденозилФосфоСульфат	Sulfotransferase (cytosol).	Phenols, alcohols, aromatic amines.
Метилирование	S-Аденозилметионин	Transmethylases (cytosol).	Catecholamines, phenols, amines, histamine.

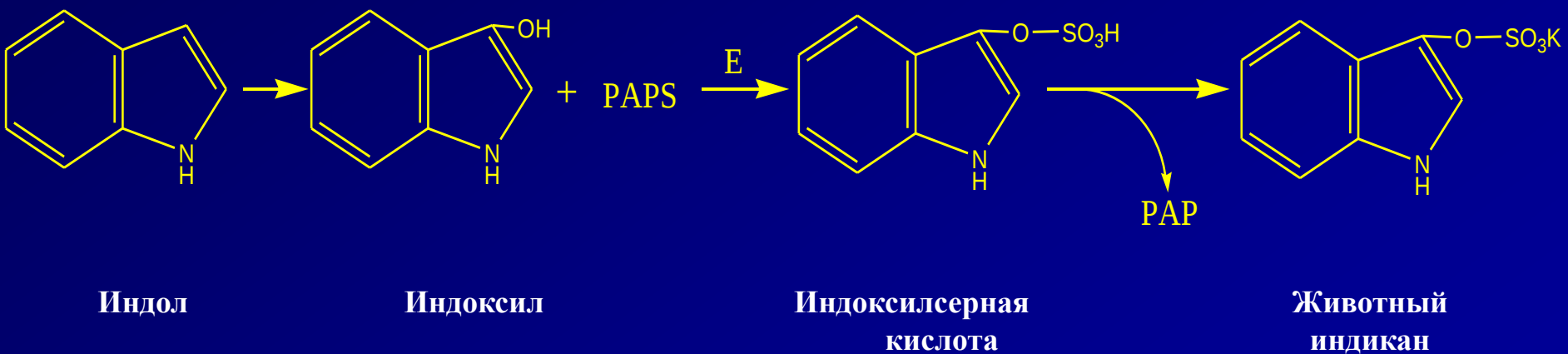


PAPS ΦΑΦC

Tryptophan catabolic degradation by bacteria.

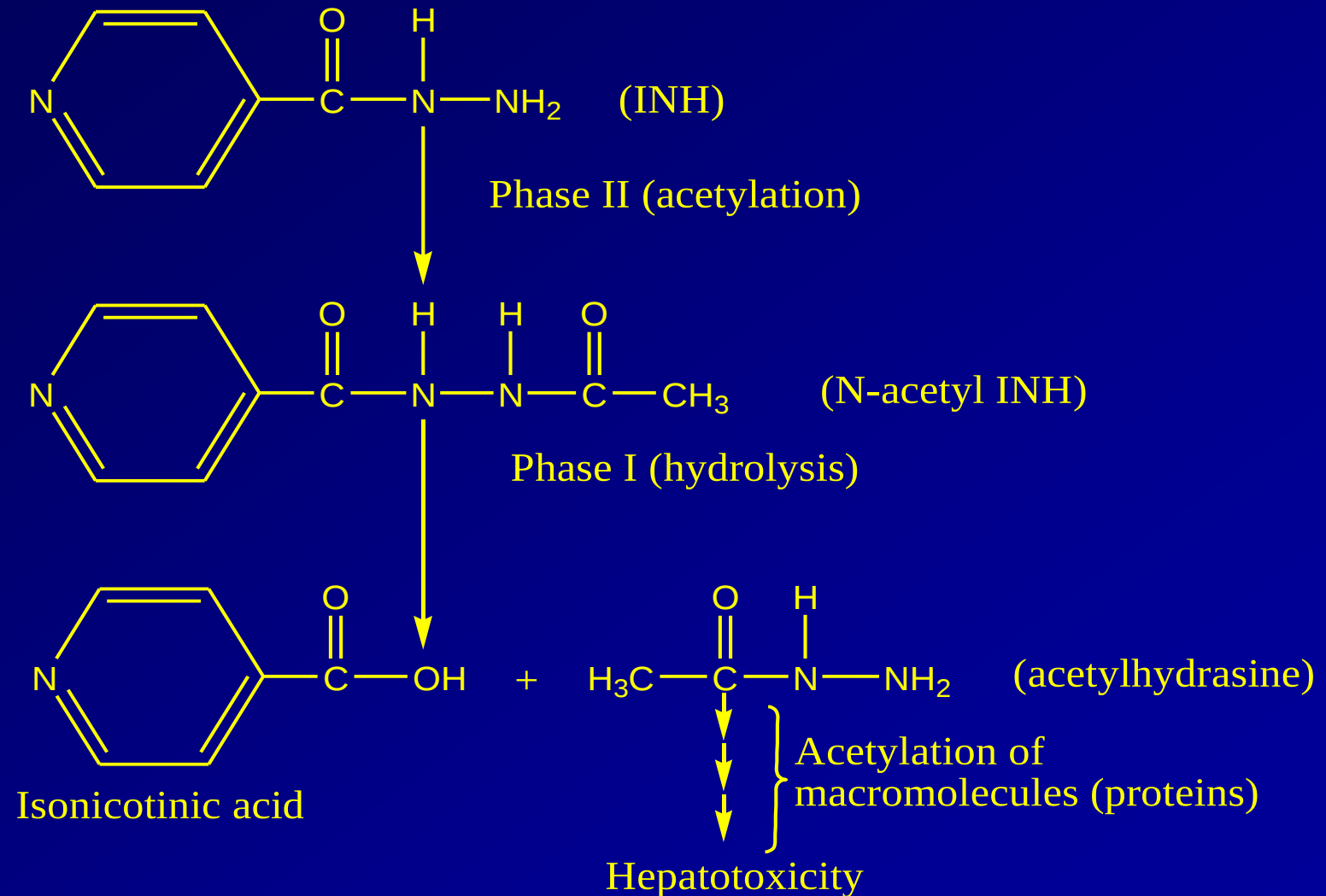


Участие сульфотрансферазы в обезвреживании индола.



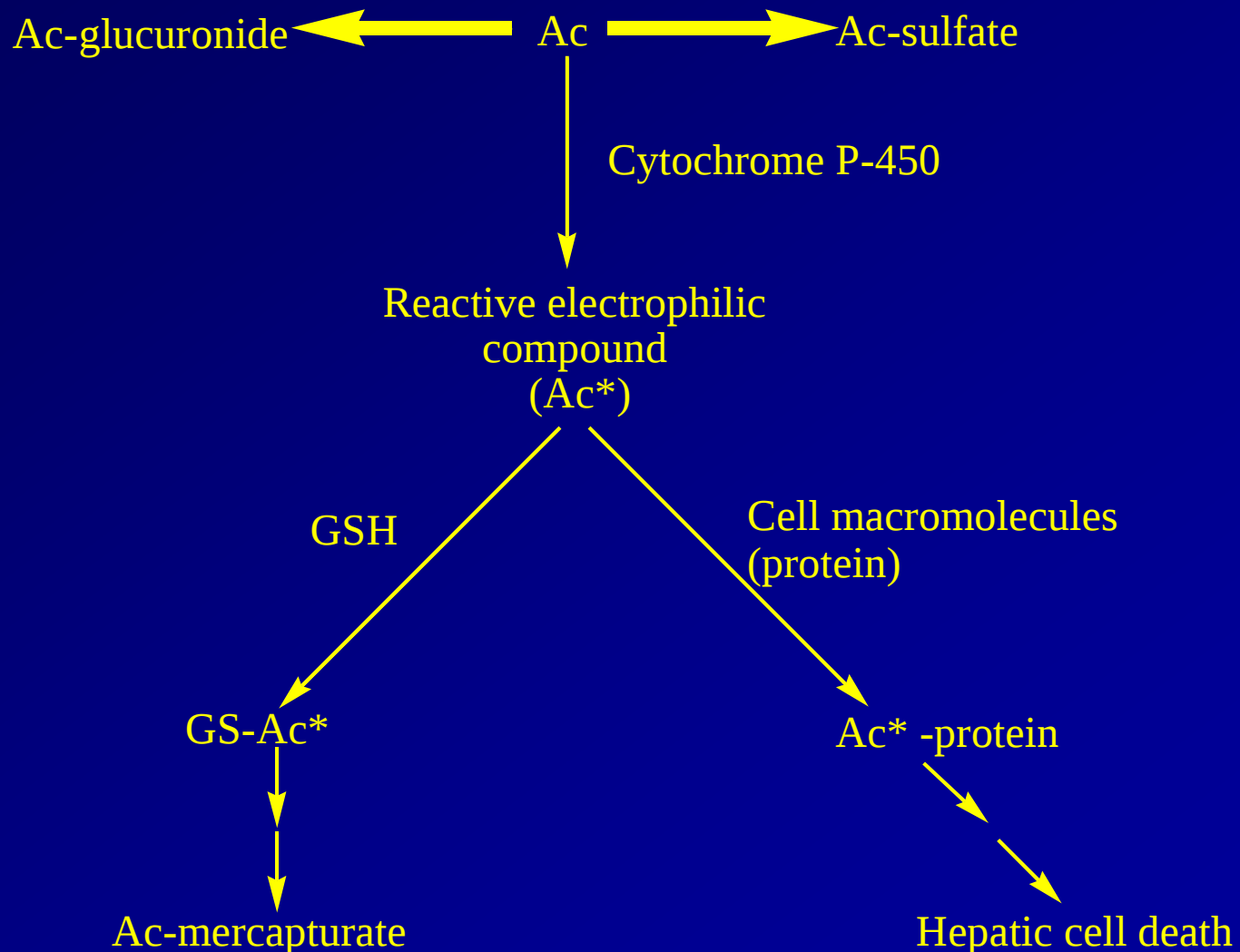
E – сульфотрансфераза

Phase II-mediated activation of isoniazid (INH) to a hepatotoxic metabolite.

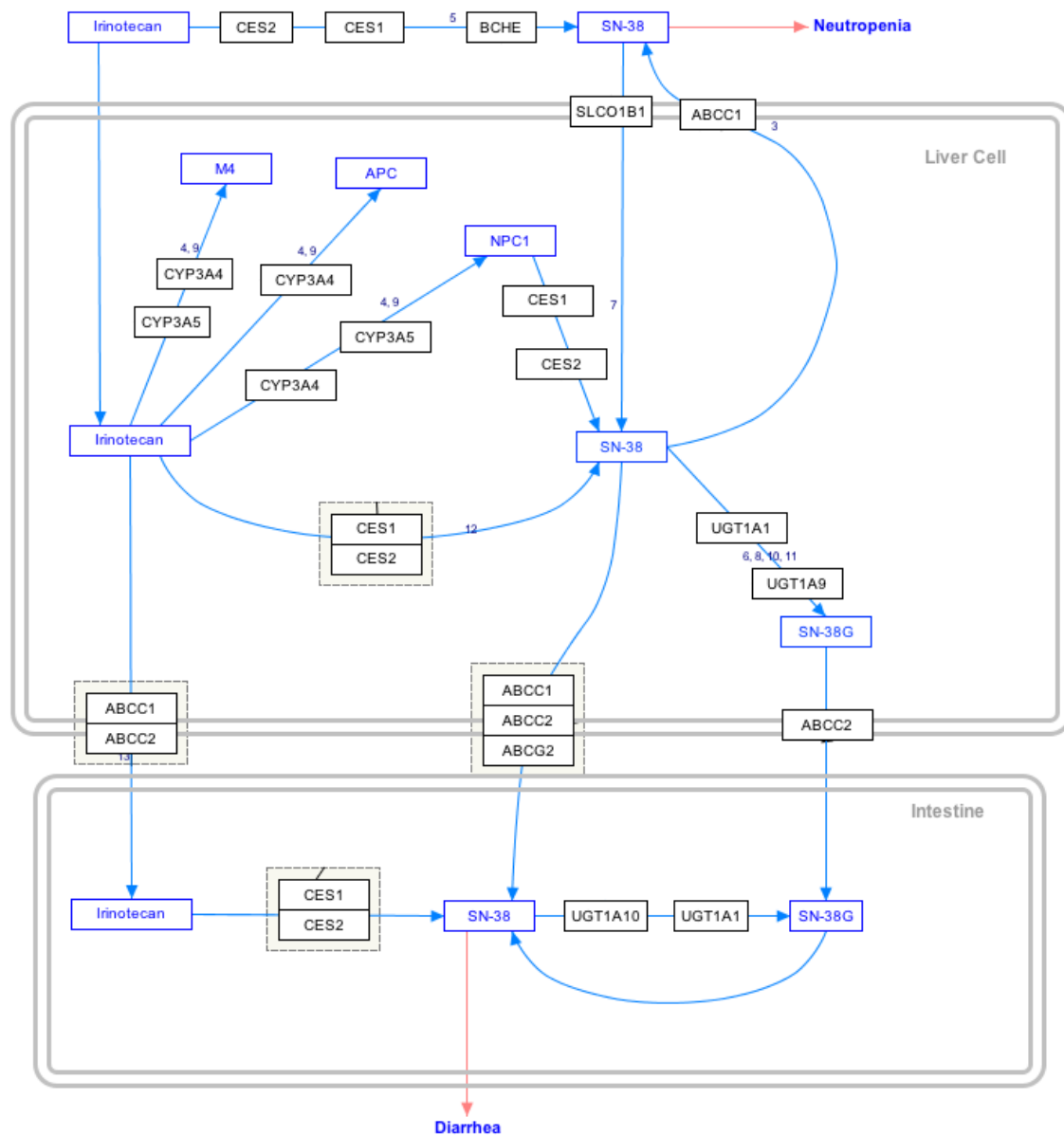




Metabolism of acetaminophen (Ac) to hepatotoxic metabolites.
(GSH = glutathione; GS = glutathione moiety; Ac* = reactive intermediate.)

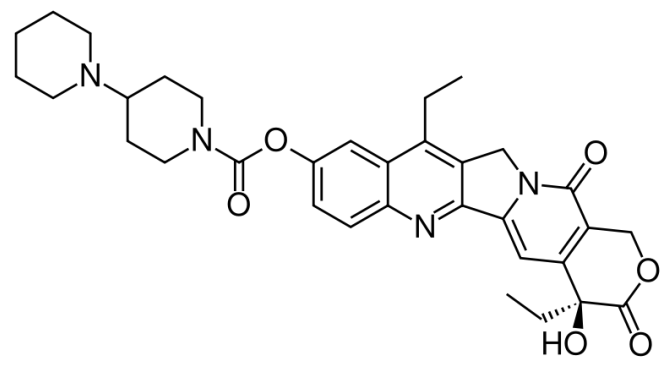


Model human liver cell showing blood, bile and intestinal compartments, indicating tissue involvement of genes in the irinotecan pathway.



Иринотекан

— цитотоксический препарат из группы камптотецинов. Является ингибитором топоизомеразы I



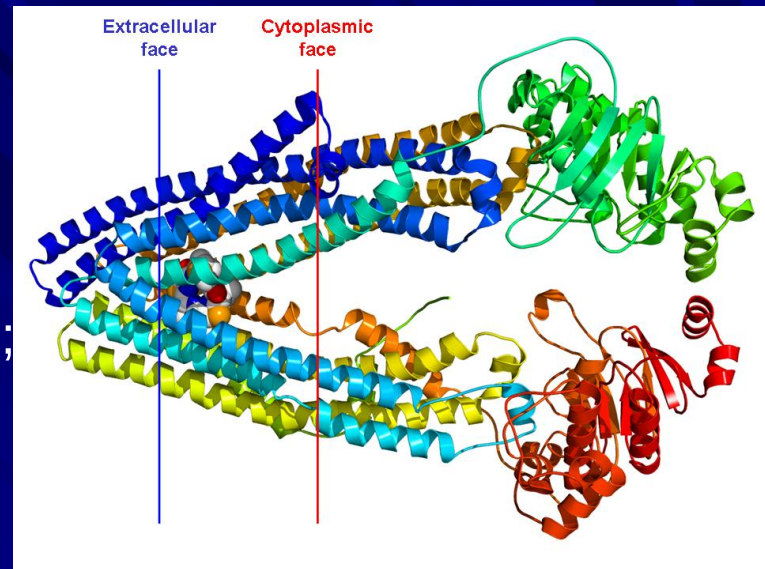
Вторая линия химиотерапии при:
раке яичников;
мелкоклеточном раке
легкого.

Phase I and II - Summary:

- Продукты всегда более гидрофильны
- Обычно продукты метаболизма легко экскретируются в мочу
- Обычно существует несколько независимых путей метаболизма
- Phase I and Phase II метаболизм are a сопряжен с другими эндогенными системами метаболизма

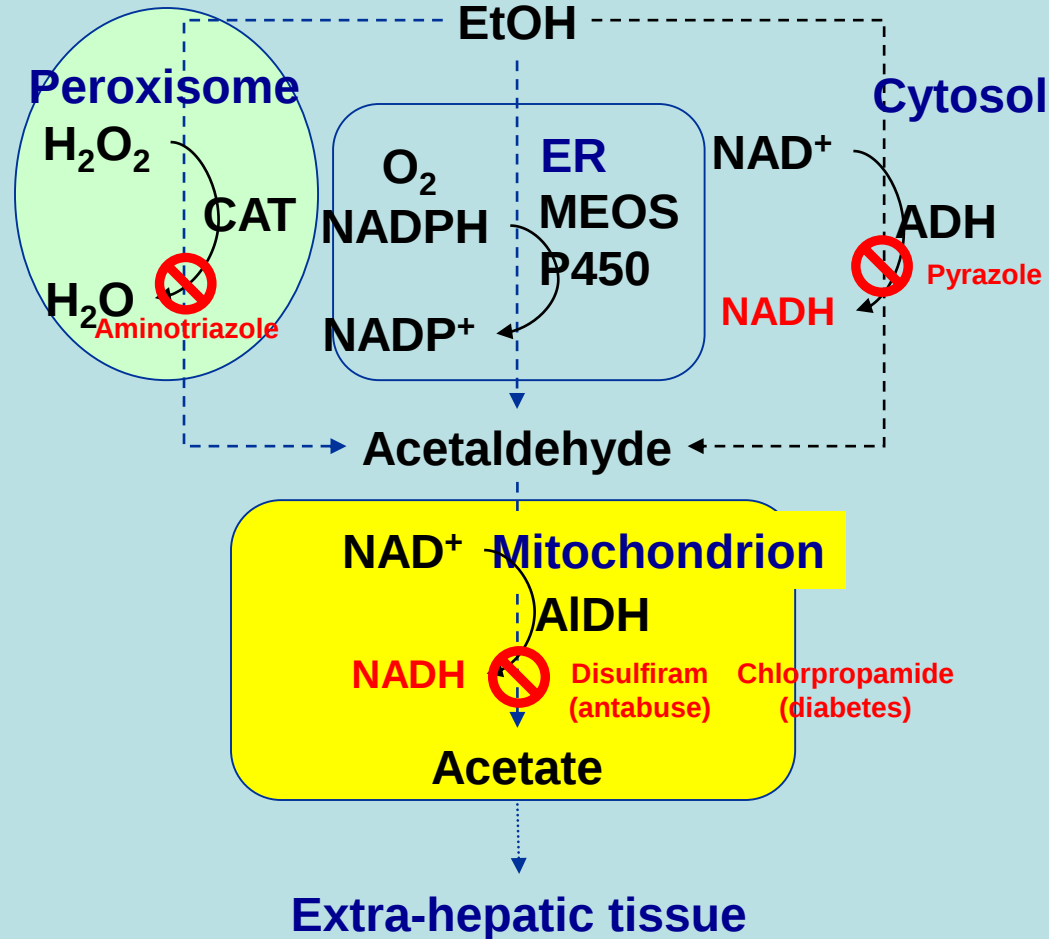
P-гликопротеин

или белок множественной лекарственной устойчивости 1, (MDR1; CD243) — мембранный белок, гликопротеин из семейства ABC-переносчиков. Обеспечивает перенос многих веществ, таких как липиды, стероиды, пептиды, билирубин и др., через мембрану клетки. Продукт гена *ABCB1* (англ. *ATP-binding cassette sub-family B member 1*).

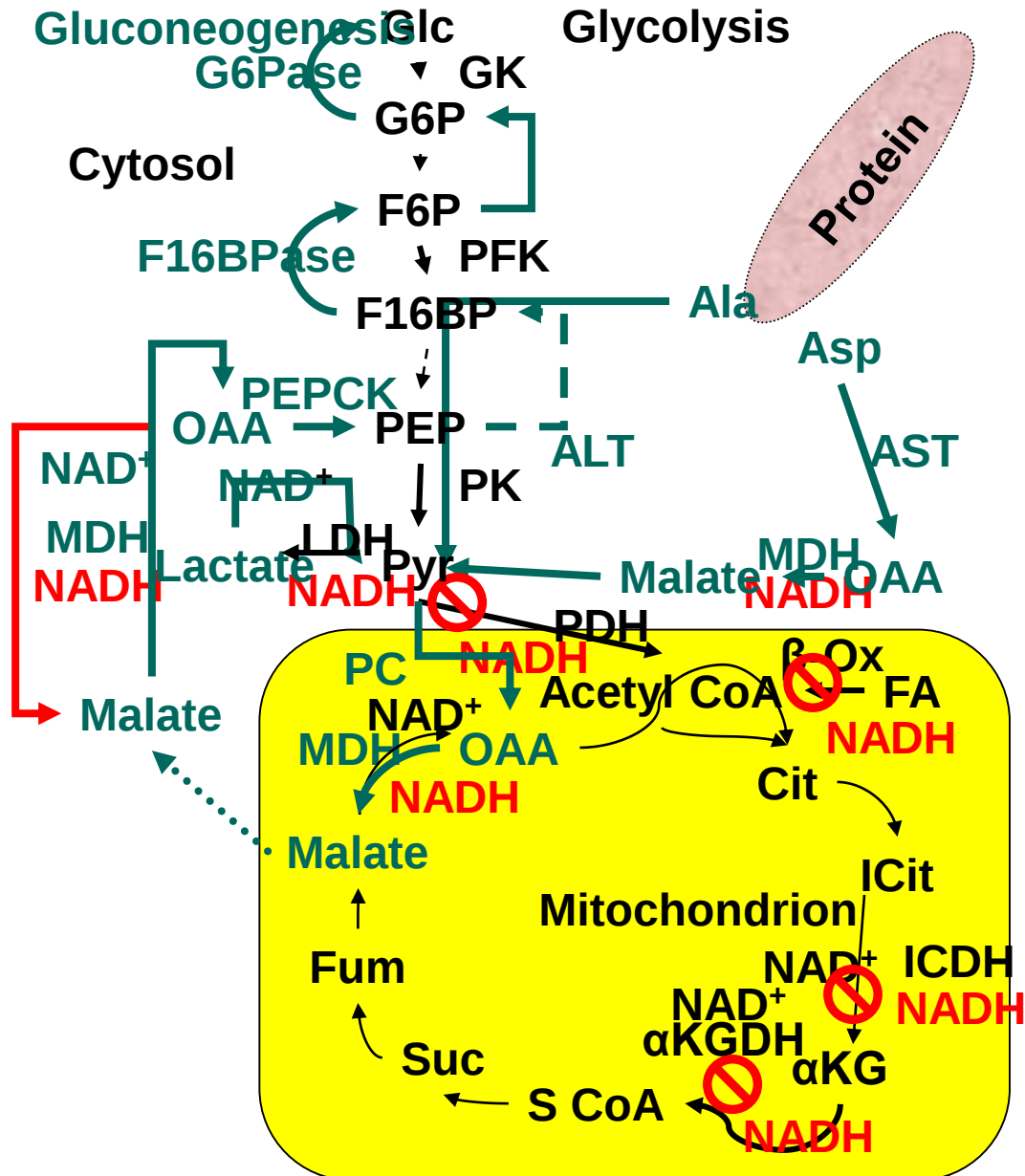


Установлено, что важнейшей причиной множественной лекарственной устойчивости является пониженное накопление цитостатиков в клетке, обусловленное активным выведением веществ в межклеточную среду. Этот транспорт осуществляется P-гликопротеином, белком плазматической мембраны, за счет энергии гидролиза АТФ. У человека ген MDR1 (от multidrug resistance 1) локализован в VII хромосоме. Ген, предположительно, сформирован в эволюции как результат внутренней дупликации примордиальной нуклеотидной последовательности.

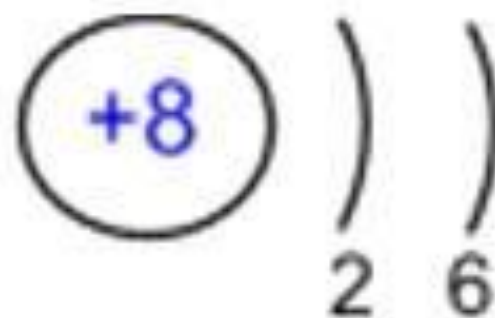
Метаболизм ЭТИЛОВОГО АЛКОГОЛЯ



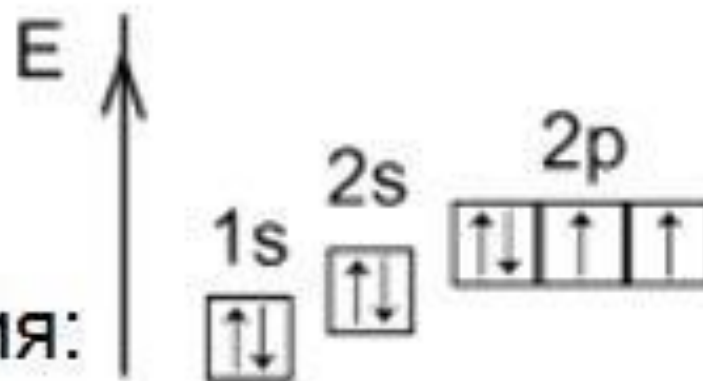
Pathway Perturbations



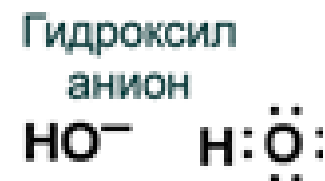
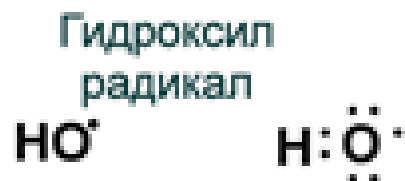
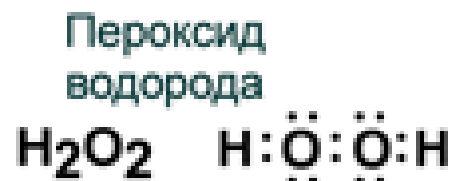
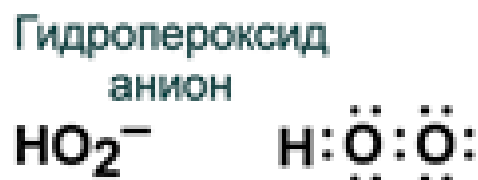
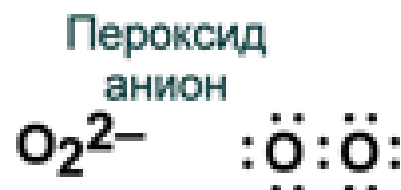
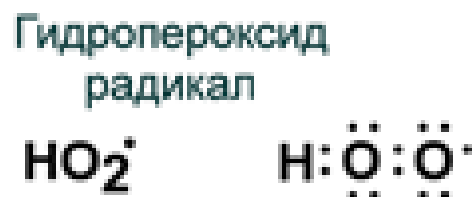
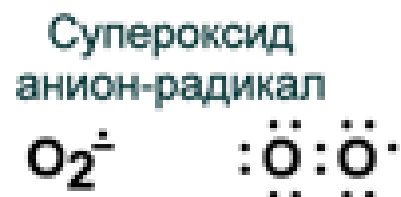
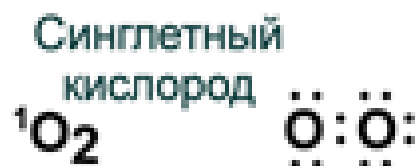
Активные формы кислорода и их утилизация



Характерная
степень окисления:
-2,



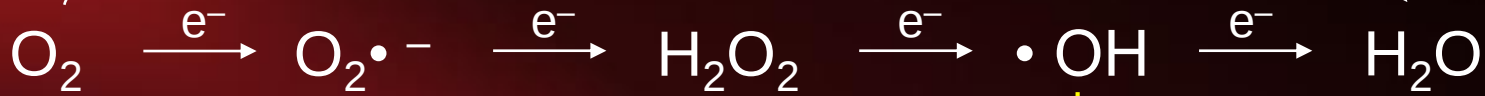
Активные формы кислорода



Главные мишени АФК - клеточные мембраны, митохондрии, цитоскелет, ДНК

- Повреждение одной системы приводит к повреждению других
- Активные формы кислорода крайне вредны для клетки их продукция возрастает в реперфузионный период
- Потери АТФ происходят в следствии нарушения синтеза и ненормальной работы мембранных насосов
- Свободный кальций в цитозоле активирует катаболические пути

4 e⁻ reduction to water



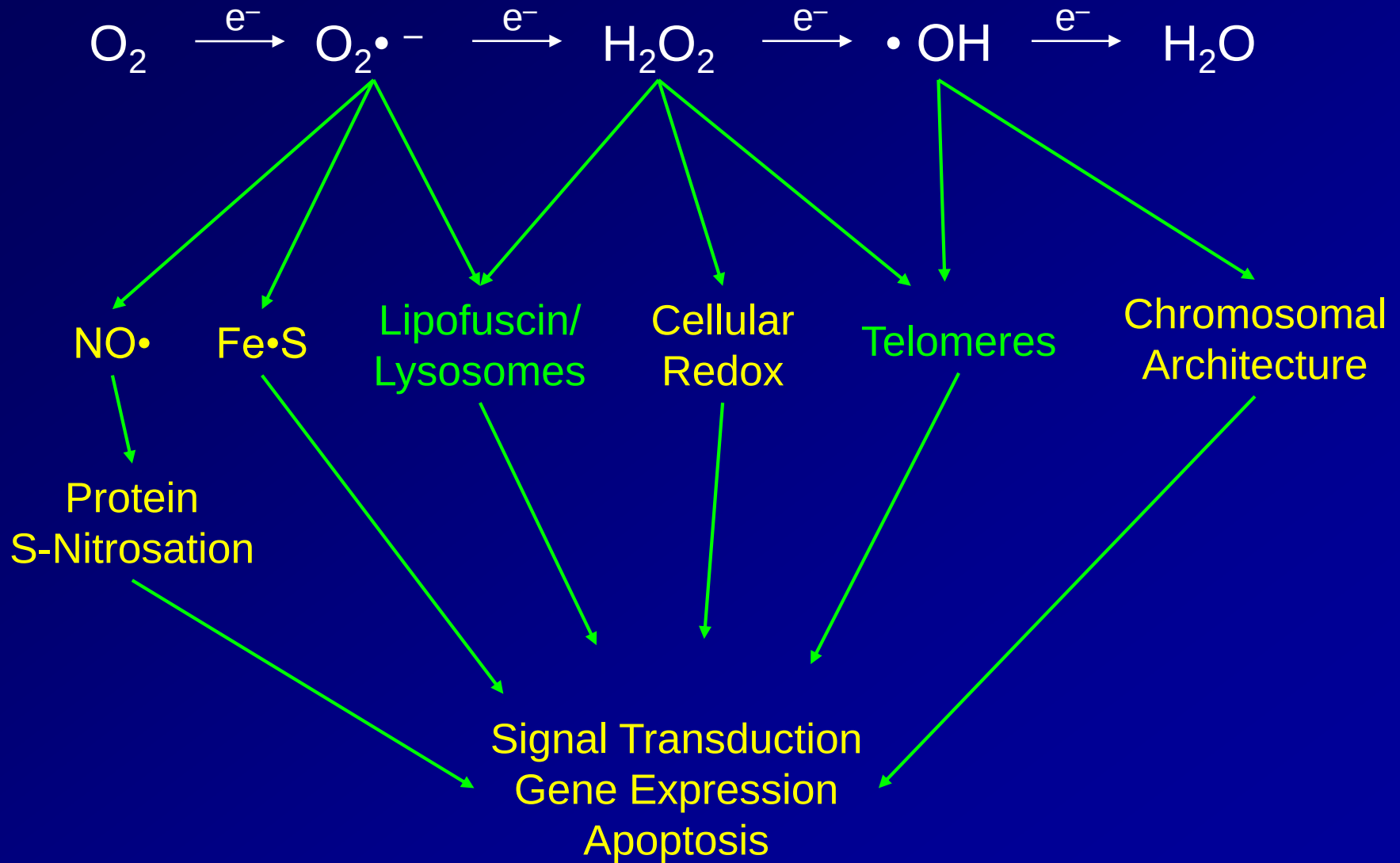
Unreactive at STP, but a *great* electron acceptor
Biological activation via radicals, transition metals
Generally, radical intermediates are enzyme-bound

Reacts with virtually any molecule at diffusion-limited rates
The molecule that makes ionizing radiation toxic

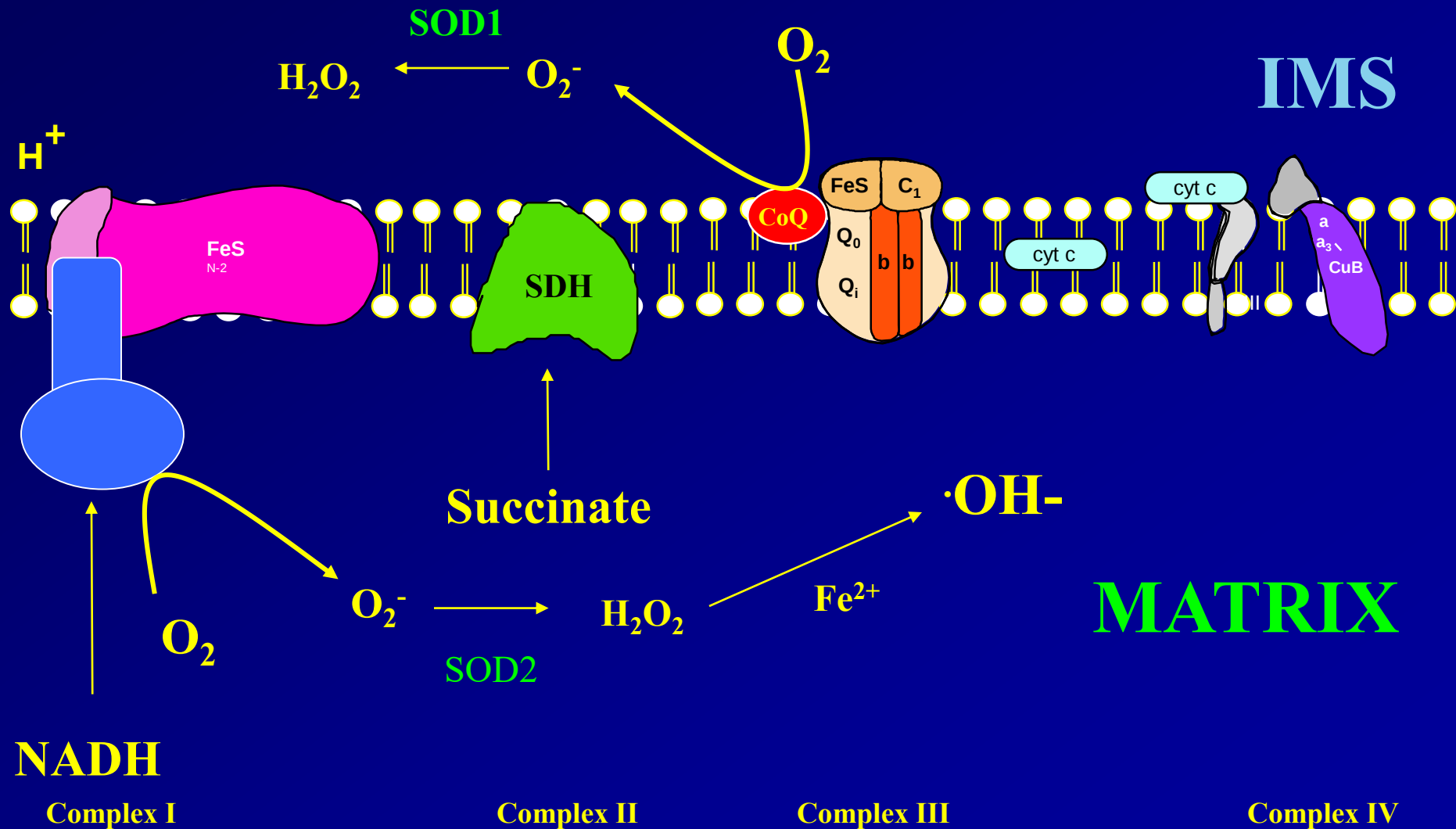
Actually a chemical *reductant*
Not so terribly reactive with most biomolecules
Mitochondrial superoxide the major source of active oxygen
Maintained at very low concentration
Superoxide dismutases

Not so terribly reactive with most biomolecules
Maintained at very low concentration
Catalases, peroxidases, GSH, etc...

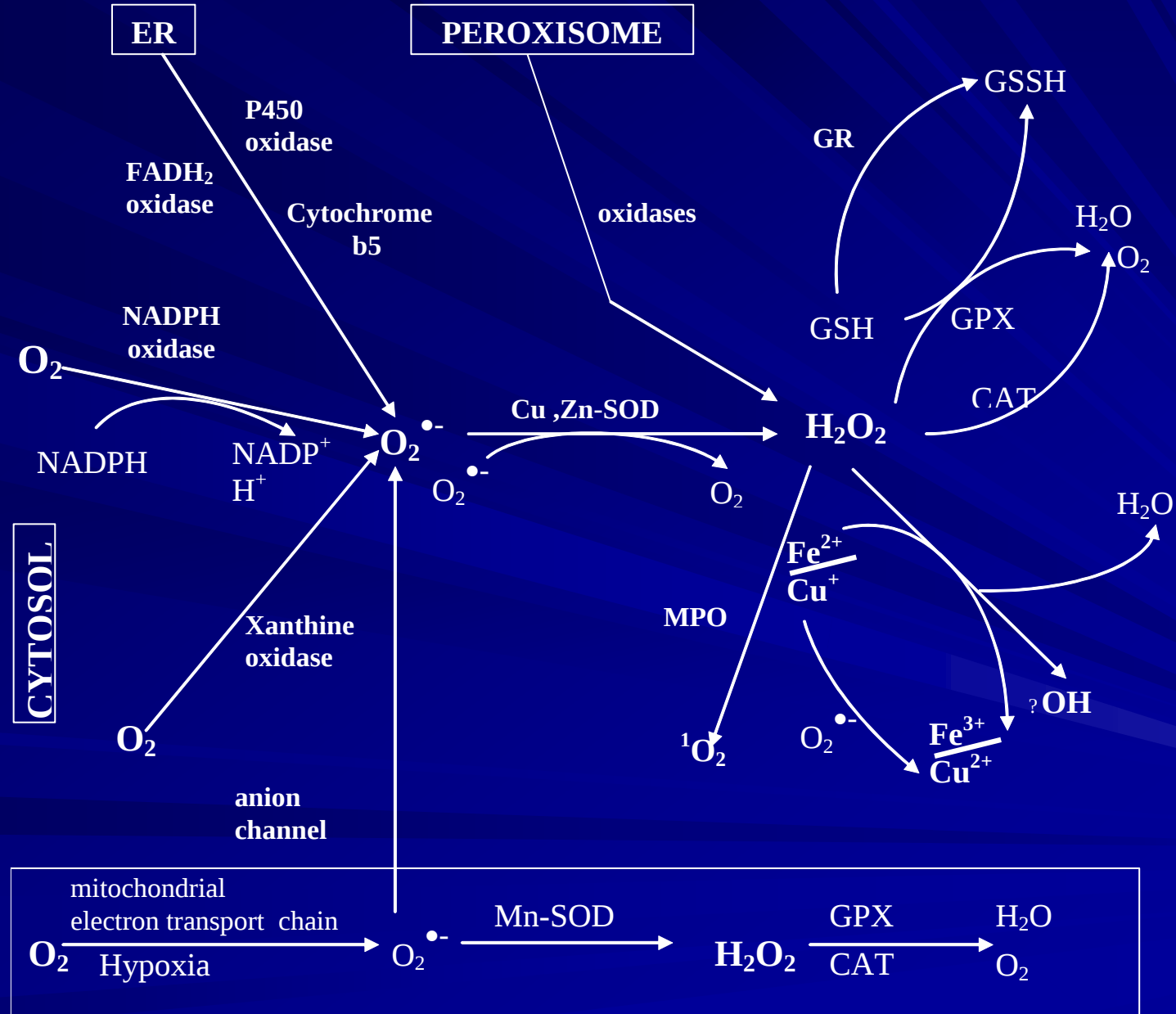
Amplification Mechanisms?



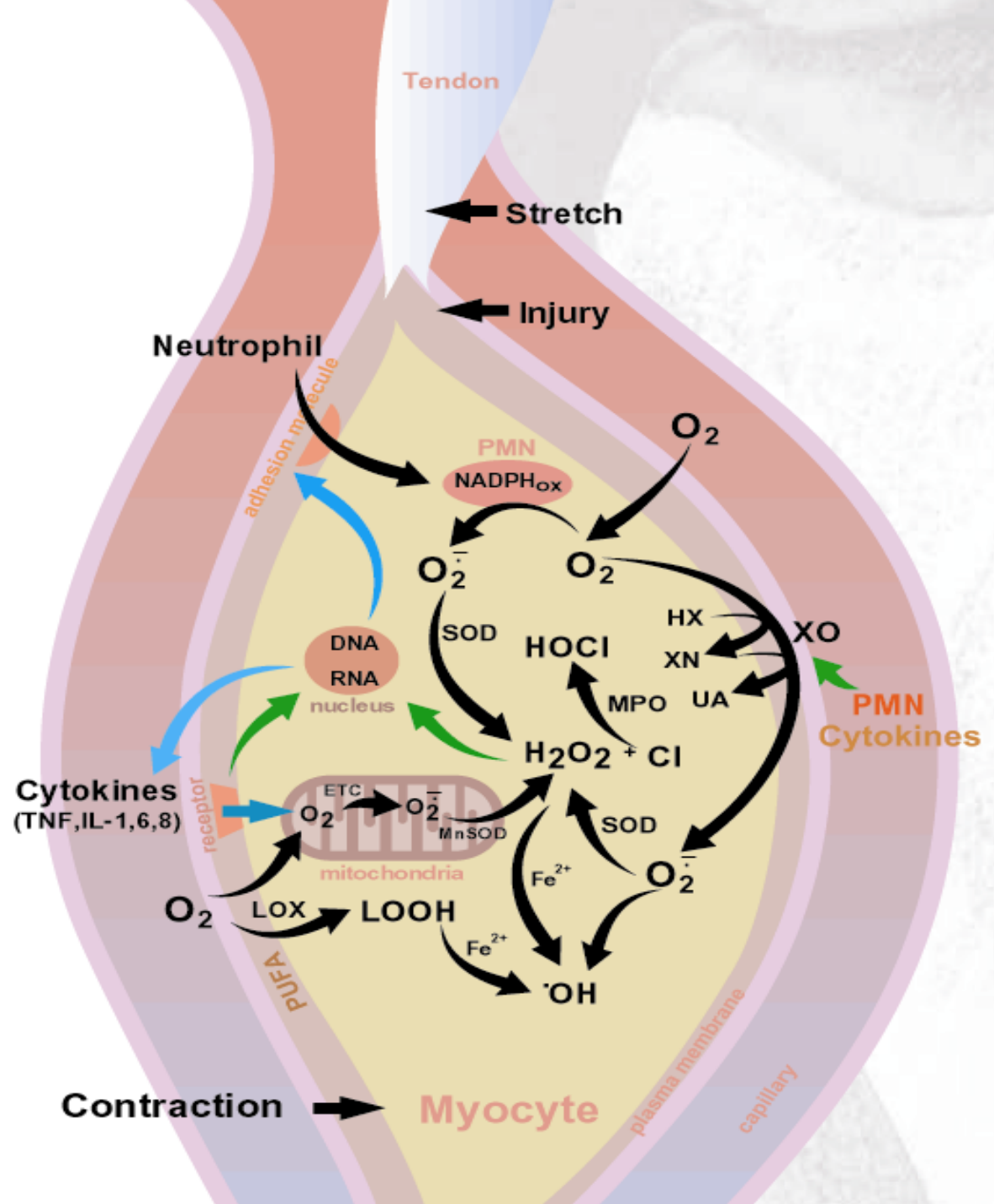
Reactive Oxygen species and the Respiratory Chain



Generation of reactive oxygen species and the defense mechanisms against damage by active oxygen



- **Mitochondrial respiratory Chain**
increased oxygen consumption produces more $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 .
- **Xanthine oxidase**
Insufficient blood flow (hypoxia) leads to degradation of ATP to hypoxanthine producing $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 .
- **Neutrophil (PMN)**
Respiratory burst by NADPH oxidase
IL-1, IL-6 and $TNF-\alpha$ increases adhesion molecules and PMN infiltration
- **Lipoxygenase/cyclooxygenase**
Activated by cytokines, hormones and toxins





The Mechanistic Canyon (circa 1995)

Neurodegeneration

Vascular Tone

Cardiac Output

Sensory Acuity

Skin Thickness

Bone Density

Endocrine Function

Immune Function

Cancer

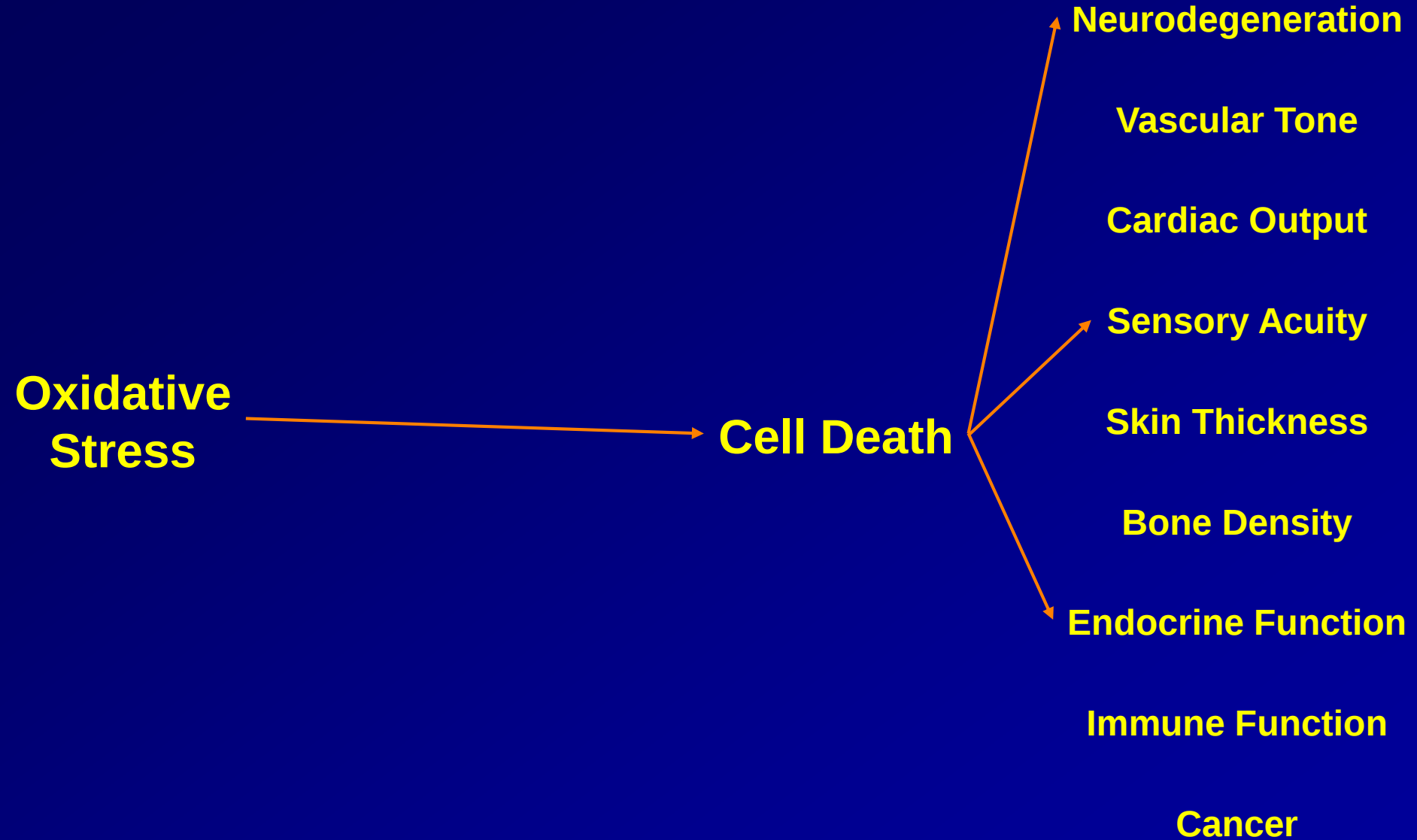
Oxidative
Stress

DNA
Damage

Oncogenesis

Cancer

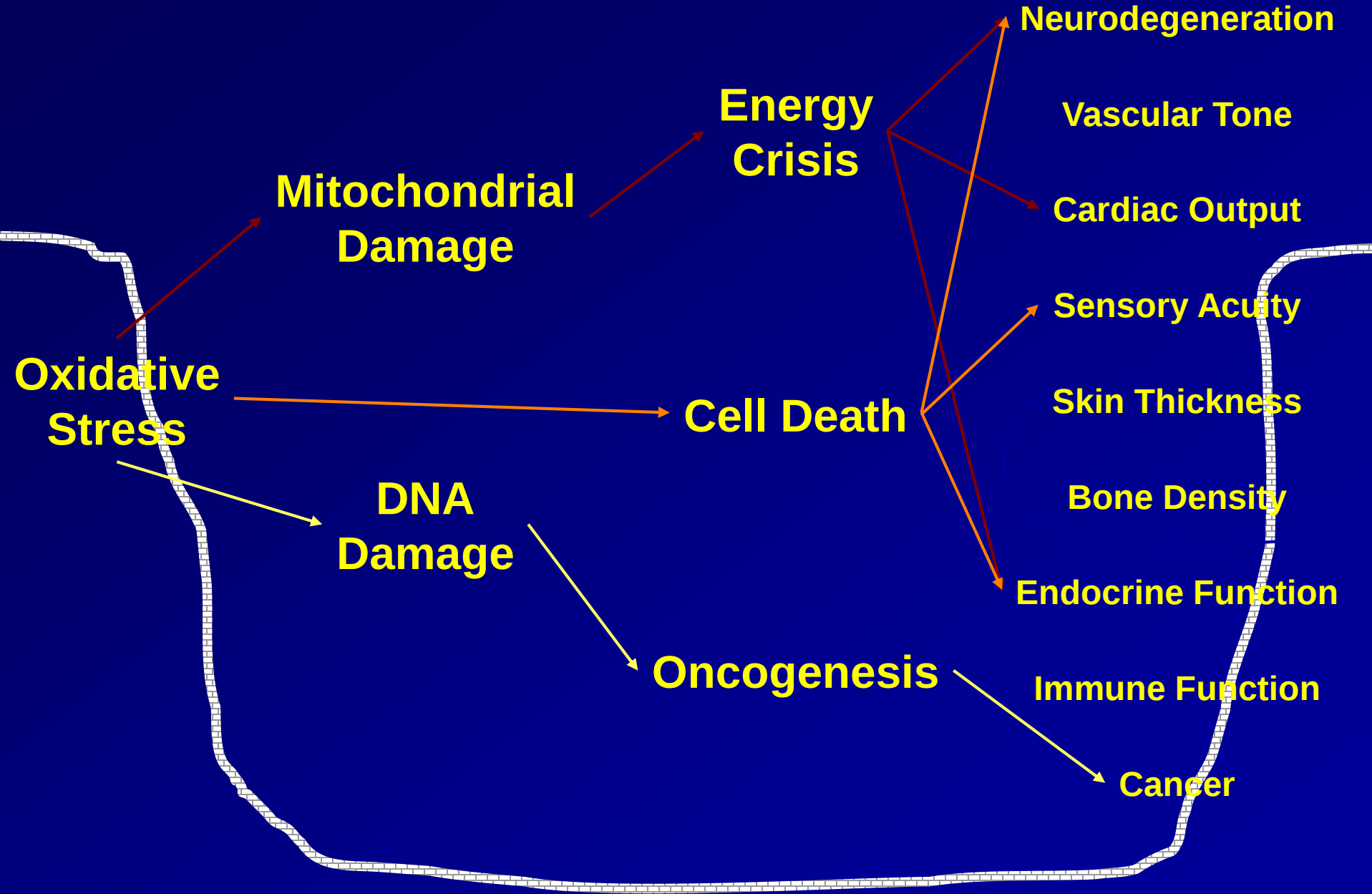
The Mechanistic Canyon (circa 1995)



The Mechanistic Canyon (circa 1995)

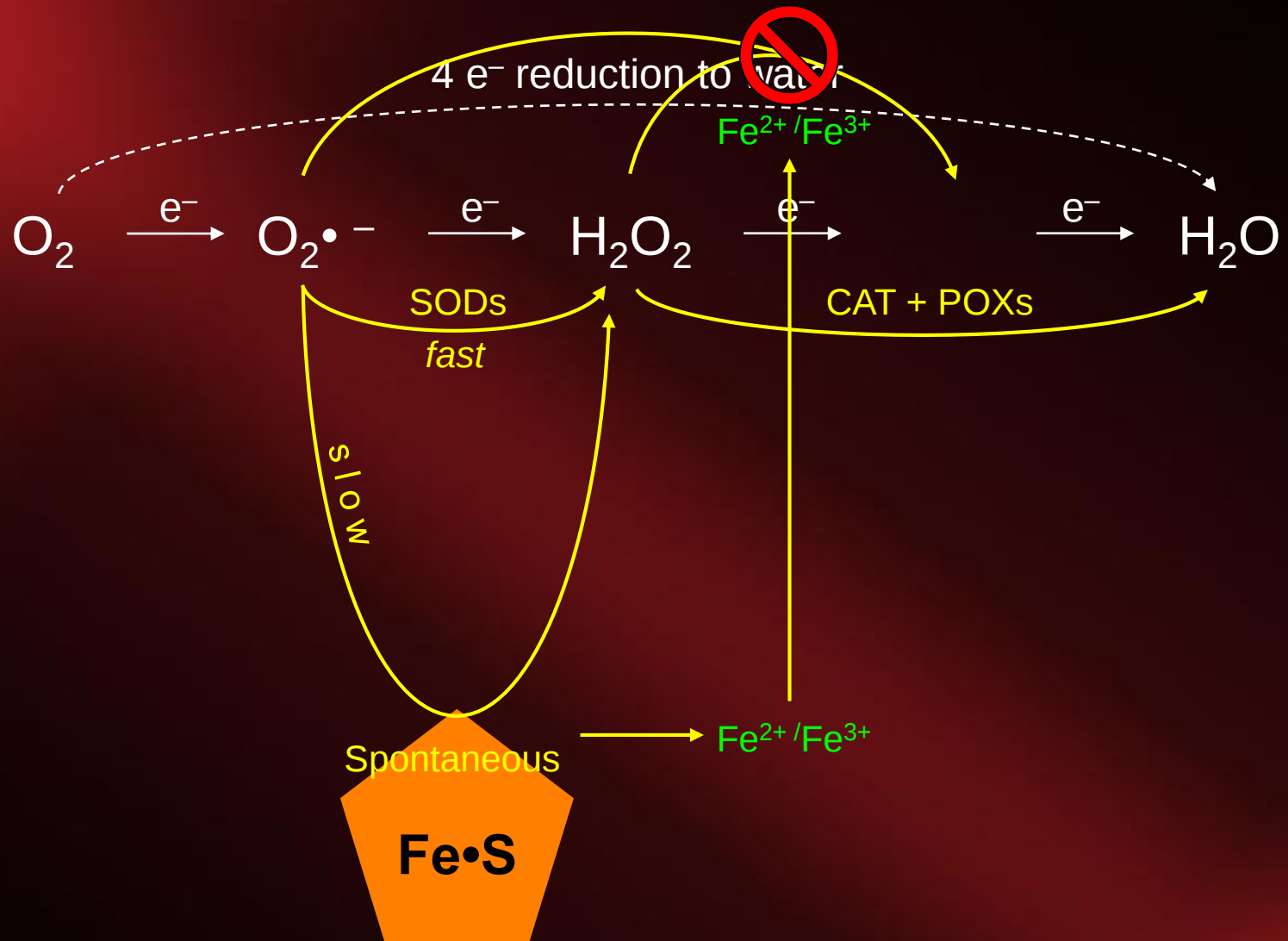


The Mechanistic Canyon (circa 1995)

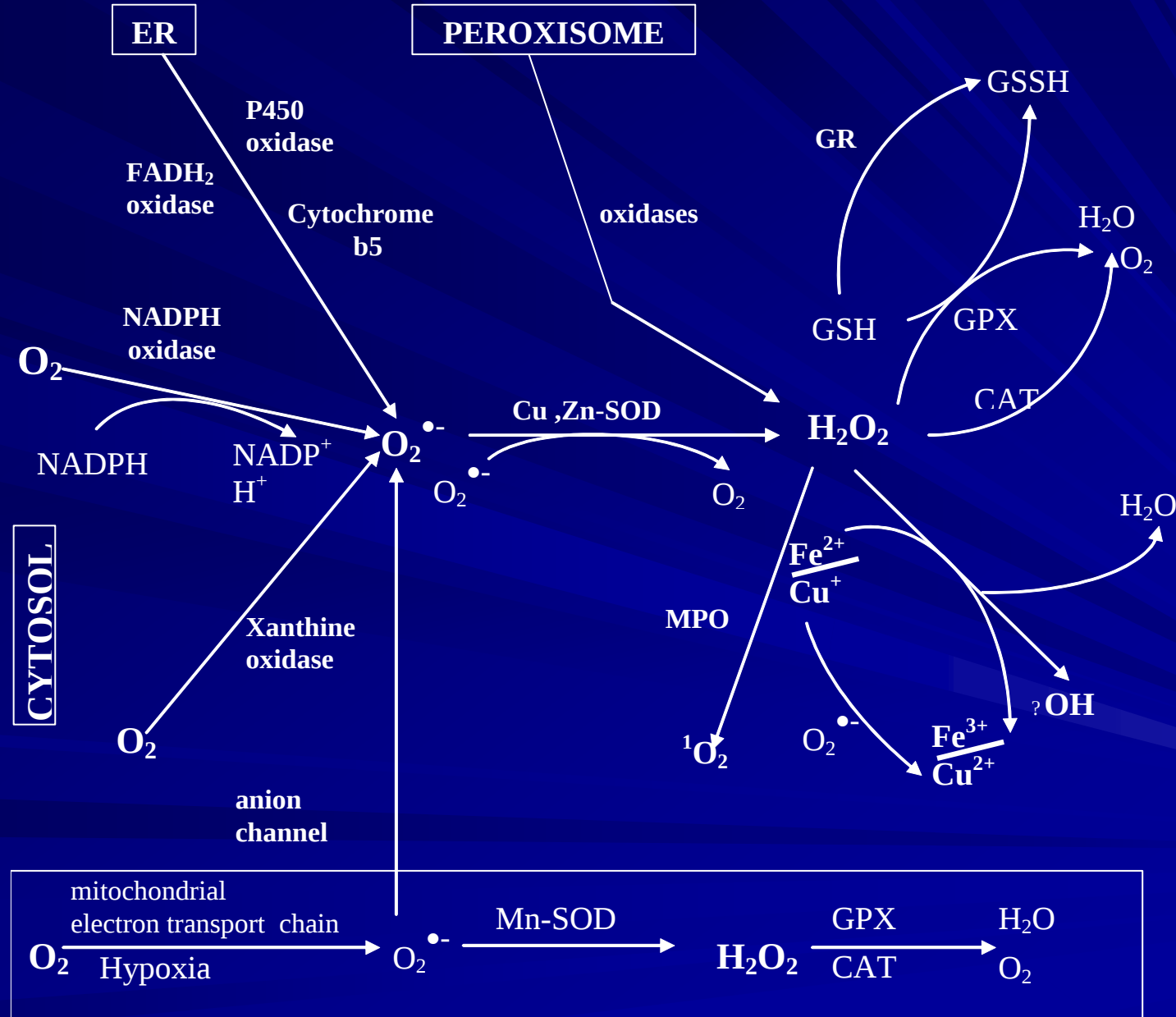


Перехватчики свободных радикалов

- Vitamin E
- Glutathione peroxidase
- Superoxide dismutase
- Catalase



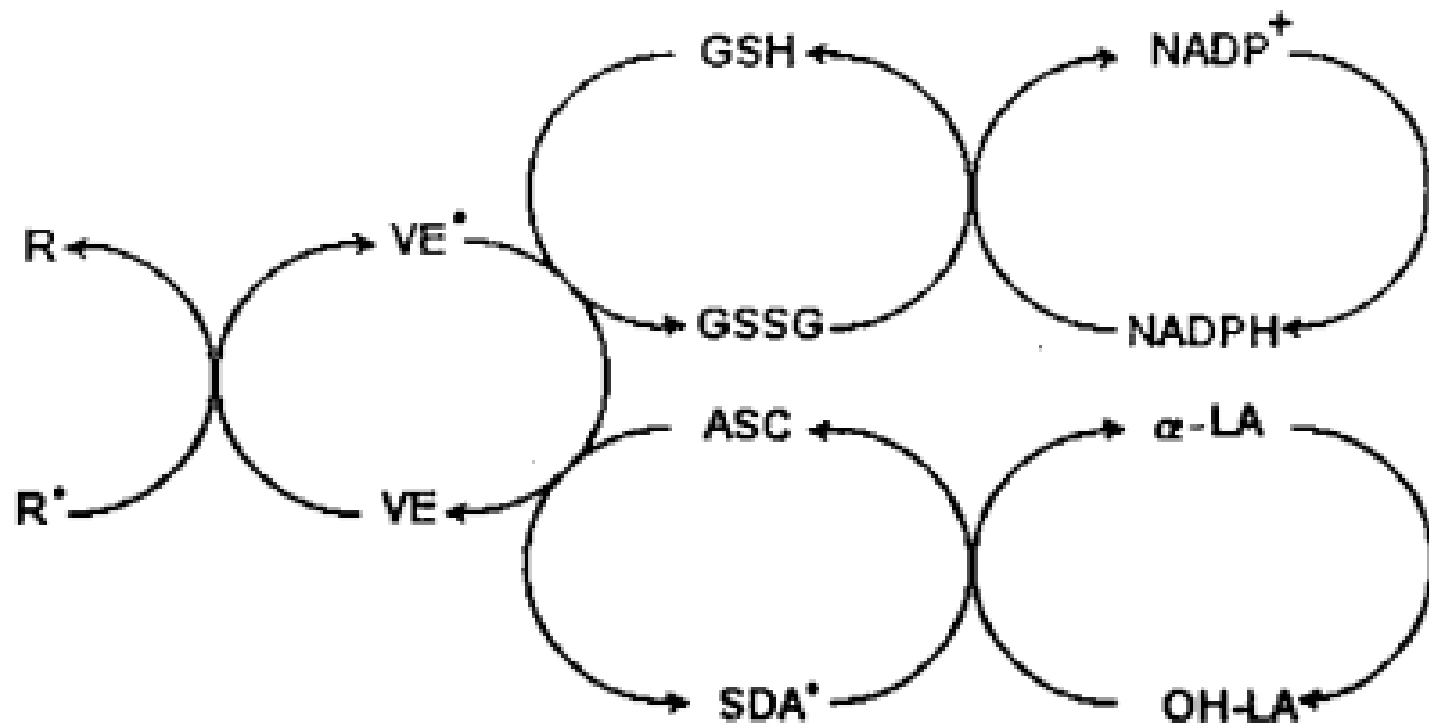
Generation of reactive oxygen species and the defense mechanisms against damage by active oxygen



ROS	Enzyme	Chemical Reaction
H_2O_2	Catalase	$2\text{H}_2\text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Superoxide Dismutase	$\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ = \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
HOCl	?	$2\text{HOCl} = \text{O}_2 + \text{Cl}^-$
$\text{ONOO}^{\cdot-}$	?	?
$\text{HO}^{\cdot}$	None recognized (Vitamin E)	$\text{HO}^{\cdot} + \text{R} = \text{R-OH}$

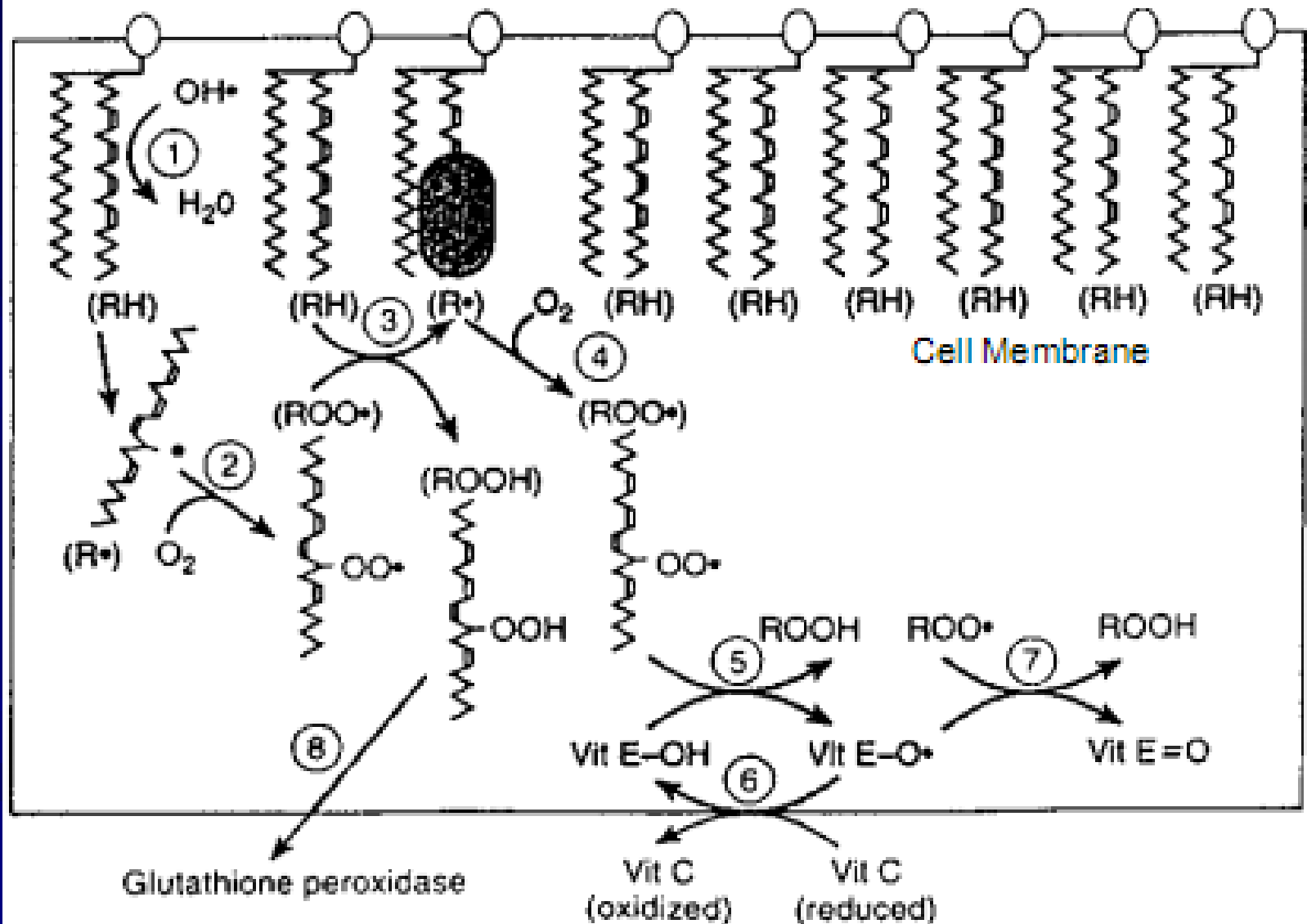
Reactive species	Antioxidant
Single oxygen $^1\text{O}_2$	vitamin A, vitamin E
Superoxide radical $\text{O}_2^{\cdot-}$	superoxide dismutase, vitamin C
Hydrogen peroxide H_2O_2	catalase, glutathione peroxidase
Peroxyl radical $\text{ROO}^{\cdot}$	vitamin C, vitamin E
Lipid peroxyl radical $\text{LOO}^{\cdot}$	vitamin E
Hydroxyl radical $\text{OH}^{\cdot}$	vitamin C

EXERCISE, FREE RADICALS, AND ANTIOXIDANTS



Synergistic function of antioxidant vitamins and thiols. R, free radicals; VE, vitamin E; VE•, vitamin E radical; ASC, ascorbate, SDA•, semidehydroascorbate; α-LA, α-lipoic acid; OH-LA, dihydrolipoate.

FREE RADICALS, LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANTS



Восстановление альфа токоферола в липопротеинах

