

*Medicinska edukacija/
Medical education*

ZNAČAJ ENZIMA CITOCHROMA P450 U
REAKCIJAMA BIOTRANSFORMACIJE
LEKOVA

THE IMPORTANCE OF ENZYME
CYTOCHROME P450 IN DRUG
METABOLISM

Correspondence to:

Branislava Rusić

Dipl. farm. med. biohemičar

Odeljenje za toksikološku hemiju,

Centar za kontrolu trovanja,

Vojno medicinska akademija,

Crnotravska 17

e-mail: branislavarusic@gmail.com

tel. 064-24 28 903

Branislava Rusić¹, Kristina Denić¹, Snežana Đorđević¹

¹Odeljenje za toksikološku hemiju, Centar za kontrolu trovanja,
Vojno medicinska akademija, Beograd

Sažetak

Ključne reči

citohrom P450, indukcija i inhibicija enzima, lek-lek interakcija

Key words

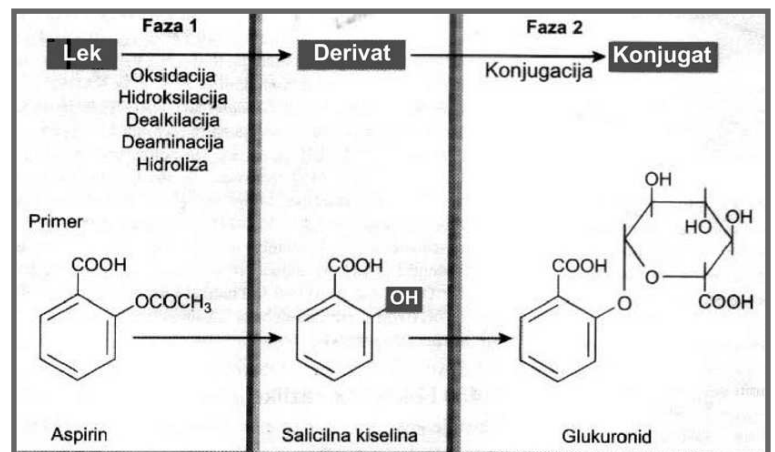
cytochrome P450, enzyme induction or inhibition, drug-drug interaction

U reakcijama biotransformacije lekova najveću ulogu imaju enzimi citohrom P450 sistema. Ovaj sistem monooksigenaza sadrži preko 50 enzima, od kojih najveći značaj u humanom metabolizmu lekova imaju CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 i CYP3A5. Navedeni enzimi učestvuju u metaboličkoj transformaciji više od 90% lekova. Pojedine izoforme CYP enzima (CYP1A2, 2C9, 2C19 i 2D6) pokazuju karakteristike *genetičkog polimorfizma* što utiče na varijacije u odgovoru bolesnika na primenjeni lek. Cilj ovog rada je da ukaže na klinički značajne interakcije lekova koje nastaju kao posledica indukcije i/ili inhibicije CYP enzima uključenih u metabolizam primenjenih lekova. Sticanje saznanja o supstratnoj specifičnosti enzima, indukujućeg ili inhibitronog efekta supstrata na enzim od velikog je značaja za prepoznavanje klinički značajnih interakcija lekova. Pored lek-lek interakcija, ne treba zanemariti ni interakcije između biljnih proizvoda (preparati na bazi kantariona i sok grejfrut) i lekova.

UVOD

Metabolizam lekova uključuje dve vrste biohemijskih reakcija poznate kao reakcije prve i druge faze. Reakcije prve faze metabolizma su kataboličke i podrazumevaju reakcije oksidacije, redukcije i/ili hidrolize. Tom prilikom dolazi do enzimске konverzije jednog hemijskog oblika leka u drugi koji je često reaktivniji u odnosu na polazni lek. Takođe, produkti ovakve transformacije mogu imati veći toksični ili karcinogeni efekat u odnosu na polazna jedinjenja. Reakcije druge faze su sintetičke (anaboličke) te uključuju reakcije konjugacije čime se podstiče stvaranje neaktivnih proizvoda koji se eliminišu iz organizma. Obe faze metabolizma obično smanjuju liposolubilnost leka i stimulišu renalnu eliminaciju⁽¹⁾.

Naime, u reakcijama prve faze, u molekul se često uvode relativno reaktivne grupe, kao što je hidroksilna grupa koja će kasnije, u drugoj fazi, biti mesto napada konjugacionih sistema kao što je glukuronska kiselina, a sve u cilju stvaranja polarnog jedinjenja koje se eliminiše iz organizma urinom⁽¹⁾. Šematski prikaz metabolizma leka (Aspirin) prikazan je na slici 1.



Slika 1. Metabolizam leka (Aspirin) u dve faze

Reakcije obe faze metaboličke transformacije odvijaju se uglavnom u jetri, mada se pojedini lekovi metabolišu i u drugim tkivima (plazma, pluća, creva). Hepatični metabolizam posredovan je brojnim enzimima među kojima je najvažniji citohrom P450 sistem (CYP) (2).

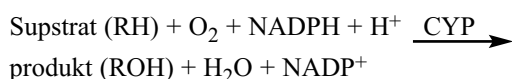
Citohrom P450 (CYP 450) predstavlja enzimski sistem monoooksigenaza koji broji više od 50 enzima. Naziv „citohrom P450“ dobijaju po lokalizaciji enzima na citozolnoj strani membrane mitohondrija ili glatkog endoplazmatičnog retikuluma (cito) i hromofori koja u prisustvu ugljen monoksida daje ružičasto jedinjenje (pink-P) koje apsorbuje svetlost na talasnoj dužini od 450nm. Citohrom P450 enzimi su hemoproteini koji čine veliku „superfamiliju“ srodnih ali različitih enzima. Međusobno se razlikuju u sekvencama aminokiselina, regulaciji indukujućim i inhibirajućim agensima i specifičnosti reakcija koje katalizuju. CYP 450 enzimi su lokalizovani u plućima, bubrezima, placenti, tankom crevu, ali su predominantno zastupljeni u jetri^(2,3). Enzimi ovog velikog enzimskog sistema su na osnovu homologije između aminokiselinskih sekvenci podeljeni u određene familije i subfamilije. Enzimi citohrom P450 koji pripadaju istoj porodici imaju sličan sled aminokiselina u $\geq 40\%$, subfamilije enzima uključuju proteine sa sličnošću sleda aminokiselina $>50\%$, dok enzimi sa sličnošću sleda većom od 98% predstavljaju pojedinačne enzime. U nazivu enzima nalazi se definisan niz arapskih brojeva i slovo. Prvi broj u nazivu označava familiju (npr. CYP1), slovo podfamiliju (npr. CYP1A), a drugi broj označava pojedinačni enzim (CYP1A2)⁽¹⁾.

CYP enzimi su odgovorni za sintezu i metabolizam velikog broja endogenih molekula. Imaju vitalnu ulogu u sintezi i metabolizmu produkata arahidonske kiseline (prostaciklina i tromboksana A₂), holesterola i drugih steroidnih jedinjenja (estrogen, testosteron, vitamin D). Takođe, učestvuju u procesu metaboličke transformacije velikog broja egzogenih molekula, uključujući i lekove (I faza metabolizma)^(1,2). Primeri lekova i enzima citohroma P450 koji učestvuju u njihovom metabolizmu dati su u tabeli 1.

Tabela 1. Primeri lekova i enzima CYP450 koji ih metabolišu

Izoenzim P450	Lek
CYP1A1	teofilin
CYP1A2	kofein, paracetamol, takrin, teofilin
CYP2A6	metoksifluran
CYP2C8	taksol
CYP2C9	ibuprofen, fenitoin, tolbutamid
CYP2C19	omeprazol
CYP2D6	klozapin, kodein, debrisoquin, metoprolol
CYP2E1	alkohol, enfluran, halotan
CYP3A4/5	ciklosporin, losartan, nifedipin, terfenadin

Oksidacija lekova monoooksigenaznim sistemom je složen ciklus koji uključuje brojne činioce (NADPH-P450 reduktaza, citohrom b₅, Fe³⁺, kiseonik). To znači da se jedan atom kiseonika koristi za stvaranje hidroksilne grupe u molekulu leka, dok se drugi atom kiseonika prevodi u molekul vode:



P450 koji sadrži feri jon (Fe³⁺) stupa u interakciju sa molekulom leka primajući elektron od NADPH-P450 reduktaze koja redukuje gvožđe do fero jona (Fe²⁺), udružuje se sa molekulom kiseonika, protonom i drugim elektronom (ili iz NADPH-P450 reduktaze ili iz citohroma b₅) formirajući kompleks. Ovaj kompleks se zatim udružuje sa drugim protonom dajući vodu i kompleks feri-oksena. Feri-oksen potom preuzima atom vodonika iz leka uz izdvajanje para kratkoživećih slobodnih radikala, a zatim i oksidovani lek iz kompleksa čime se enzim P450 regeneriše⁽²⁾.

Kao proizvodi oksidativnih reakcija koje su najčešće katalizovane enzimima citohrom P450, najvećim delom nastaju netoksični alkoholi i fenoli. Pored oksidacionih, enzimi citohroma P450 katalizuju i redukcione procese pri čemu moraju biti zadovoljeni određeni uslovi. To podrazumeva anaerobne tj. hipoksične uslove, odgovarajući redoks potencijal lek-supstrata kao i prisustvo odgovarajućeg donora elektrona (NADPH, NADH)⁽¹⁾.

Od ukupnog broja CYP 450 enzima, njih šest CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 i CYP3A5 odgovorno je za metabolizam više od 90% lekova, pri čemu najveći značaj imaju CYP3A4 i CYP2D6 enzimi. Od toga, u 35% reakcija učestvuje sam CYP3A4. (sarić) Navedeni enzimi se međusobno razlikuju po supstratnoj specifičnosti, mada postoji veliki broj lekova u čiju je metaboličku transformaciju uključeno više od jednog CYP enzima. Takođe, bitno je istaći da enzimi mogu biti indukovani ili inhibirani od strane supstrata u čiji su metabolizam uključeni. Imajući ovo u vidu, poznavanje supstratne specifičnosti, indukujućeg ili inhibitronog efekta supstrata na enzim od velikog je značaja za prepoznavanje klinički značajnih interakcija lekova^(2,3).

Pojedine izoforme CYP enzima (CYP1A2, 2C9, 2C19 i 2D6) pokazuju karakteristike *genetičkog polimorfizma*. Učestalost polimorfizma značajno se razlikuje između različitih etničkih grupa. Tako je na primer polimorfizam enzima CYP2D6 zastupljen u 7% bele rase, dok se kod crne rase može javiti u 2-7% populacije. Polimorfizam CYP2C19 je karakterističan za azijsku populaciju sa učestalošću 1:5 osoba. Posledica genetskog polimorfizma su varijacije u odgovoru bolesnika na primenjeni lek za koji se zna da se metaboliše nekim od navedenih enzima⁽³⁾.

Sinteza svakog CYP enzima kodirana je aktivnošću odgovarajućeg gena. Osobe koje su homozigoti (od oba roditelja nasleđuju dominantne alele) nemaju narušenu enzimsku aktivnost i predstavljaju normalne metabolizere. Suprotno njima heterozigoti (imaju jedan dominantni i jedan recesivni alel) imaju redukovanu aktivnost određenog enzima, dok kod osoba sa oba recesivna alela u potpunosti izostaje enzimska aktivnost i takve osobe predstavljaju tzv. slabe (poor) metabolizere. Kao posledica genetičkog polimorfizma enzimsku aktivnost može biti i povećana. To se dešava kada osoba od oba roditelja nasledi multiple varijante dominantnih alela. Takve osobe se nazivaju ultra brzim metabolizerima⁽³⁾.

Kod osoba koje su slabi metabolizeri mogu se javiti neželjeni efekti leka čak i pri terapijskim dozama. Tako usled uticaja genskog polimorfizma na enzim CYP2D6 metabolizam beta blokatora, antidepresiva i opioda može

biti smanjen, a poluvreme eliminacije produženo što povećava mogućnost za razvoj toksičnih efekata. Takođe, genetička varijacija enzima CYP2C19 dovodi do farmakokinetičkih i farmakodinamičkih promena lekova koji su supstrati za ovaj enzim (fenitoin, fenobarbiton, omeprazol)⁽¹⁻³⁾.

Cilj ovog rada je da se ukaže na klinički značajne interakcije lekova koje nastaju kao posledica indukcije i/ili inhibicije CYP enzima uključenih u metabolizam primenjenih lekova.

S obzirom na činjenicu da je danas česta upotreba više lekova istovremeno, a samim tim i mogućnost interakcija među njima, od velikog je značaja poznavanje osobina enzimskog sistema uključenih u biotransformaciju lekova.

Postoje lekovi koji mogu prouzrokovati kvantitativne i kvalitativne promene u metabolizmu drugih lekova usled uticaja na enzime uključene u njihovu metaboličku transformaciju. Enzimi mogu biti *indukovani* ili *inhibirani* što za posledicu ima povećanje odnosno smanjenje inteziteta metabolizma leka.

Lekovi mogu da interaguju sa enzimima CYP450 sistema na više načina. Lek može biti metabolisan od strane samo jednog (metoprolol-CYP2D6) ili više CYP enzima (varfarin-CYP1A2, 2D6 i 3A4). Takođe, primenjeni lek može indukovati ili inhibirati ne samo enzim koji ga metaboliše, već i enzime uključene u metabolizam drugih lekova⁽¹⁾.

Stimulacija enzimske aktivnosti (indukcija) javlja se kao posledica izlaganja enzima uticaju leka induktora.

Induktore enzima citohroma P450 karakterišu sledeće osobine⁽¹⁾:

- istovremeno mogu biti i induktori i supstrati indukovanih enzima
- liposolubilni su
- ostvaruju kumulativni efekat nakon učestale primene
- početak i dužina trajanja indukcije koja zavisi od t_{1/2} eliminacije induktora i životnog veka samo enzima.

Kod lekova sa kratkim poluvremenom eliminacije, početak induktivnog efekta ispoljava se ubrzo nakon aplikacije leka (rifampin - 24h). Sa druge strane, lekovi sa dugim poluvremenom eliminacije ispoljavaju induktivni efekat znatno kasnije od primene leka (fenobarbiton - 7 dana). Shodno tome, poluvreme eliminacije leka utiče na dužinu trajanja same indukcije nakon prestanka izlaganja leku-induktoru (barbiturati 5-7 dana, karbamazepin do 20 dana)^(2,3).

Postoje tri različita mehanizma indukcije enzima.

Enzimaska aktivnost može biti stimulirana usled povećanja brzine sinteze enzima (proteina) odnosno povećane transkripcije gena odgovornog za sintezu enzima. Ovakav način indukcije nastaje usled vezivanja induktora za specifične citozolne ili nuklearne receptore (Ah i PXR receptori). Navedeni mehanizam indukcije je spor proces i javlja se usled duže ekspozicije enzima induktoru. Induktori koji deluju ovim mehanizmom su policiklični aromatični ugljovodoni prisutni u duvanskom dimu, kofein, omeprazol (CYP1 i CYP2), rifampicin i barbiturati (CYP3A, 2B6, 2C9)⁽¹⁾.

Drugi mehanizam indukcije predstavlja stabilizaciju iRNK i/ili enzima vezivanjem induktora za aktivno mesto enzima. Na ovaj način deluje etanol stimilišući CYP2E1 i 3A4⁽¹⁾.

Treći mehanizam indukcije ostvaruje se sporijom razgradnjom enzima u prisustvu induktora. Ovaj proces se odvija brzo. Etanol (CYP2E1) i eritromicin (CYP3A) ostvaruju induktivni efekat ovim mehanizmom⁽¹⁾.

Osim induktivnog, etanol može ispoljiti i inhibitorni efekat na pomenute enzime. Ispoljavanje induktivnog ili inhibitornog efekta je dozno zavisno. Visoka koncentracija etanola dovodi do inhibicije enzima, dok će pri niskim koncentracijama biti izražen njegov induktivni efekat. Ovo je posebno značajno kod alkoholisanih osoba kod kojih je zbog inicijalno velikih koncentracija etanola u krvi prisutna inhibicija. Kako se koncentracija etanola u krvi smanjuje po prestanku unošenja alkohola, inhibicija prestaje, a niske koncentracije etanola stabilizuju enzim i indukuju njegov katalitički efekat. Tek nakon 24-48h i potpune eliminacijom etanola, indukcija enzima CYP2E1 prestaje usled razgradnje enzima. Kako etanol ispoljava i inhibitorne i induktivne efekte na CYP2E1 i 3A4 enzime i da su česte istovremene zloupotrebe alkohola i lekova koji se metabolišu putem ovih enzima (paracetamol, izoniazid), međusobne interakcije mogu prouzrokovati neželjene i toksične efekte primenjenih lekova⁽¹⁻⁵⁾.

U Odeljenju za toksikološku hemiju Centra za kontrolu trovanja, od ukupnog broja analiziranih uzoraka akutno otrovanih u 2012. godini (5911) 11,81% čine uzorci bolesnika koji su istovremeno koristili alkohol i lekove iz grupe benzodiazepina⁽⁶⁾. U značajnom procentu tih uzoraka detektovane su visoke koncentracije etanola. Pokazano je da kod akutnog uzimanja alkohola metabolizam benzodiazepina usporen sto rezultuje povećanjem koncentracije ovih lekova u serumu za 30%. U tom slučaju, neželjeni efekti benzodiazepina mogu postati izraženiji⁽⁷⁾.

Lekovi iz grupe antiepileptika (karbamazepin, okskarbamazepin i fenobarbiton) pokazuju izraziti induktivni efekat na CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 i 3A4. Kako se ovi lekovi međusobno kombinuju u terapiji epilepsije, a indukuju enzime uključene u sopstveni metabolizam, vrlo često dovode do smanjenja efektivne koncentracije leka. Klinički su značajne interakcije karbamazepina i drugih grupa lekova kao što su oralni kontraceptivi, oralni antikoagulansi, beta blokatori, antidepresivi i drugi. Ovo je važno sa aspekta uticaja karbamazepina na lekove sa malom terapijskom širinom kao što su varfarin i ciklosporin. U slučaju varfarina usled indukcije enzima koji ga metabolišu može doći do značajnog smanjenja njegove koncentracije u krvi te hiperkoaguabilnosti i tromboze⁽⁴⁾.

Lekovi koji su sposobni da inhibiraju enzime citohrom P450 sistema nazivaju se *inhibitorima*. Usled inhibicije enzima dolazi do smanjenja biotransformacije leka što može rezultovati produženim delovanjem leka ali i brojnim neželjenim efektima⁽¹⁾.

Mehanizmi inhibicije enzima P450 lekovima mogu se ostvariti:

- stvaranjem reverzibilnih kompleksa nekovalentnim vezivanjem inhibitora za enzim
- stvaranjem stabilnih kompleksa sa metaboličkim intermedijerom
- ireverzibilnim vezivanjem na hem ili protein enzima (suicidni inhibitori)

Najčešći mehanizam inhibicije kod interakcije lek-lek odvija se stvaranjem reverzibilnih kompleksa nekovalentnim vezivanjem inhibitora za enzim. Ovaj efekat je doznno zavisano što znači da pri visokim koncentracijama leka dolazi do inhibicije enzima. Ovakav tip inhibicije je reverzibilnog karaktera i prestaje nakon eliminacije inhibitora. Može se odvijati kao: kompetitivna, nekompetitivna, inhibicija izazvana produktom reakcije i inhibicija koordinativnim vezivanjem inhibitora za gvožđe u hemu.

Klinički značajne interakcije lekova koje se često sreću u praksi su brojne. Neke od njih su poželjne kao što je slučaj kod primene ketokonazola sa ciklosporinom. Ketokonazol kao inhibitor enzima CYP3A4, uključenog u metabolizam ciklosporina, povećava efektivnu koncentraciju ciklosporina u krvi a time i dužinu trajanja farmakološkog efekta. Ova interakcija je iskorišćena kod bolesnika kod kojih postoji indikacija za primenu ciklosporina (transplantacija) da bi se primenila manja doza imunosupresiva. Suprotno tome, primena preparata na bazi kantariona (induktor CYP3A4) sa ciklosporinom dovodi do stimulacije biotransformacije ciklosporina, smanjenja njegove efektivne koncentracije što za posledicu može imati odbacivanje grafta (4).

Istovremena per os primena ritonavira i sakvinavira je još jedna klinički značajna lek-lek interakcija. Upotreba ritonavira kao inhibitora CYP3A4, dovodi do povećanja koncentracije sakvinara u krvi za 33%. Veća bioraspoloživost sakvinara postiže se i usled konzumiranja soka od grejpfurta mada ovaj efekat nije klinički dovoljno pouzdan kako bi imao primenu u praksi. Čaj kantariona smanjuje za 57% koncentraciju indinavira koji je supstrat za CYP3A4. Na taj način smanjena je efikasnost primenjenog leka. Kao što se može primetiti, postoji značajan uticaj biljnih preparata na efekat primenjenih lekova. Zato je važno biti obazriv kod ovakvih kombinacija kako bi se izbegli potencijalno toksični ili smanjeni efekti lekova(4).

Upotreba mikonazol oralnog gela kod bolesnika na terapiji varfarinom može prouzrokovati povećanje protrombinskog vremena (INR-a) usled inhibicije enzima (CYP3A4) koji metaboliše varfarin. Kao neželjeni efekat javlja se krvarenje. Zabeležene su i interakcije varfarina i kardiovaskularnih lekova, koje imaju isti ishod kao i napred navedeni primer interakcije(4).

Lekovi koji pripadaju grupi selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina (SSRI-fluoksetin, paroksetin, fluvoksamin) inhibiraju aktivnost enzima CYP2D6. Ukoliko bolesnik na terapiji nekim od lekova iz ove grupe uzima i preparat koji sadrži kodein, usled inhibicije enzima CYP2D6, kodein se neće konvertovati u morfin. To za posledicu ima izostanak analgetičkog efekta. Takođe, istovremena upotreba SSRI i tricikličnih antidepresiva koji se metabolišu preko CYP2D6 dovodi do razvoja serotoninergičkog sindroma(4).

ZAKLJUČAK

Kao što se može zapaziti, postoji veliki broj lekova i pomoćnih lekovitih supstanci koje se koriste svakodnevno u terapijske svrhe kao mono i/ili polimedikamentozna terapija. Uneti u organizam lekovi i pomoćna lekovita sredstva podležu brojnim biohemijskim reakcijama i međusobnim interakcijama. Zbog dominantnog efekta lekova na metaboličke enzime, naročito CYP450 sistema, neophodno je poznavati osobine enzima, lekova i njihovih metabolita. Na taj način mogu se izbeći potencijalno neželjeni i toksični efekti sa jedne, i favorizovati poželjne farmakološke efekte sa druge strane. Takođe, sve je šira upotreba biljnih preparata koji zbog nedovoljne informisanosti bolesnika o interakcijama mogu ugroziti efekat primenjene terapije lekovima. Imajući sve ovo u vidu, lekari i farmaceuti moraju biti dodatno obazrivi prilikom prepisivanja i izdavanja lekova i preparata koji mogu međusobno interagovati.

Abstract

Cytochrome P450 are the most important enzymes in drugs metabolism. This monooxygenase system has more than 50 enzymes and the most significant of them involved in human drug metabolism are CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 i CYP3A5. They are responsible for metabolism of more than 90% of drugs. Some of the isoforms (CYP1A2, 2C9, 2C19 i 2D6) exhibit genetic polymorphisms which may influence a patients response to used drug. The aim of this review is to show the clinical significant drug interactions that occur as result of induction or inhibition CYP enzymes in metabolism. Knowledge about substrate specificity of enzymes, induction and inhibition characteristics of substrate is very important to recognize the clinical significant drug interactions. Except drug-drug interaction, interactions between herbal products and drugs like St. John's wort and grapefruit juice should not be ignored.

LITERATURA

1. Rendić S, Medić-Šarić M. Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika, 2013. Medicinska naklada, Zagreb
2. Rang H. P, Dale M. M, Ritter J. M, P.K. Moore, Farmakologija, 2005, Data status, Beograd

3. Lynch T, Price A, The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions and adverse effect. Am. Fam. Physician, 2007; 76(3):391-6
4. Martin J, Cytochrome P450 drug interactions: are they clinically relevant, Aust. Prescr, 2001; 24(1):10-12
5. Bibi Z, Role of cytochrome P450 and drug interactions, Nutr. Metab. 2008; 5(27):1-10

6. Rusić B, Denić K, Đorević S et al. Toksikološko-hemijske analize u Centru za kontrolu trovanaj u periodu od 2010. do 2012. godine. MD-Medical data, 2013; 5(3):261-264
7. Kilibarda V. Akutna trovanja benzodiazepinima 2011, Zadužbina Andrejević, Beograd