

# **M**ETABOLISMO

## **Biotrasformazione**

modifiche chimiche che il farmaco  
subisce all'interno dell'organismo

I farmaci introdotti in un organismo vanno incontro ad una serie di processi di trasformazioni chimiche, tali da modificarne le caratteristiche molecolari con ripercussioni sull'efficacia.

Tali processi di trasformazione sono particolarmente importanti per l'escrezione dei farmaci dall'organismo.

I principi attivi devono essere resi meno diffusibili attraverso le membrane cellulari e quindi devono essere trasformati in molecole con maggior carica elettrica, meno liposolubili, con minor affinità per le proteine plasmatiche e tissutali.



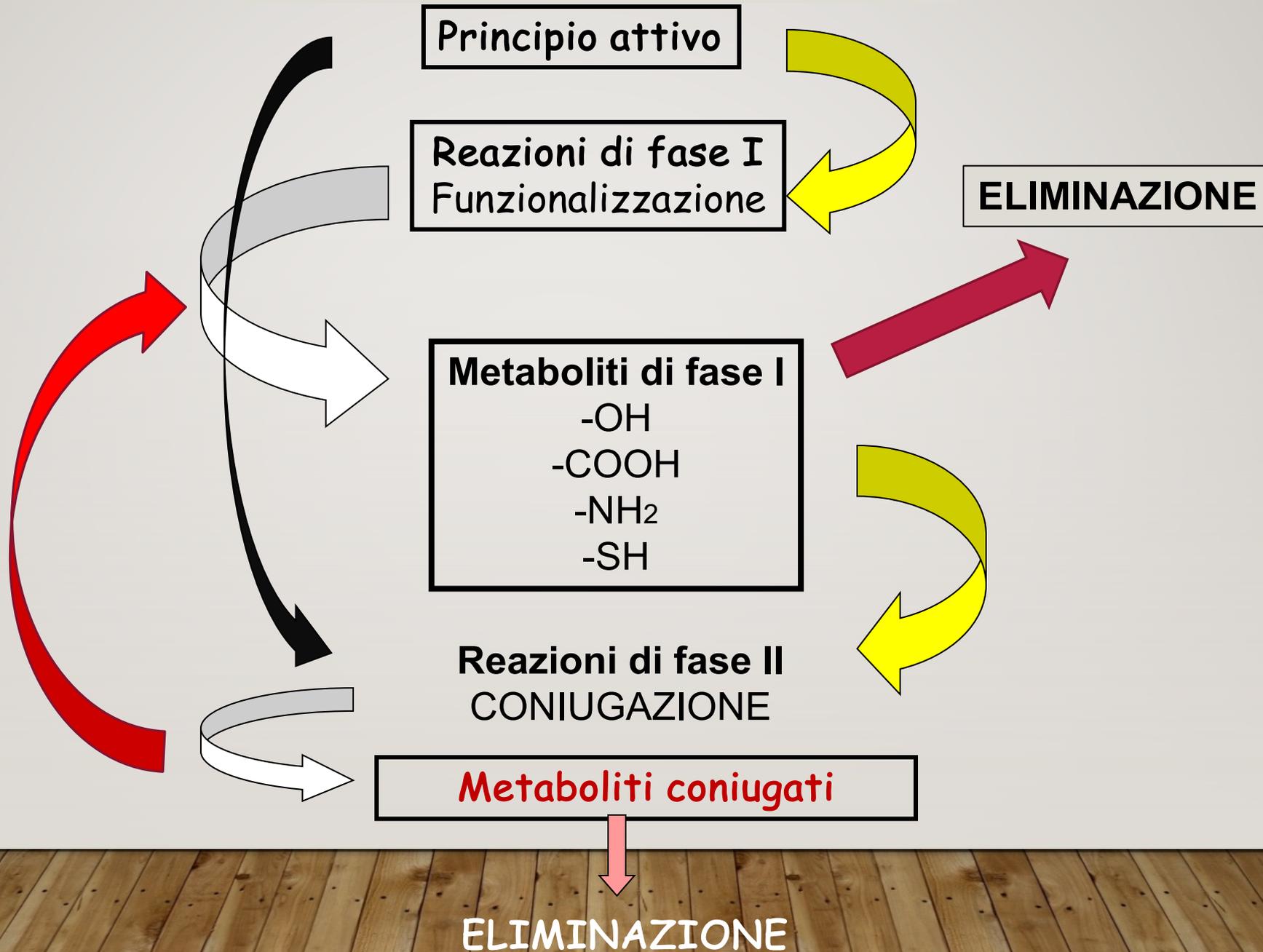
# Il metabolismo

- **Per metabolismo dei farmaci, intendiamo le trasformazioni (chimiche) a cui vanno incontro i farmaci, una volta assorbiti, ad opera di enzimi appartenenti al genoma dell'organismo.**
- **La degradazione (o metabolismo pre-sistemico) è una trasformazione chimica del farmaco operata e da enzimi non appartenenti al corredo genico dell'organismo oppure da agenti chimico-fisici.**

## Perché i farmaci vengono metabolizzati?

- Il metabolismo fa sì che i prodotti del metabolismo (metaboliti) siano idrosolubili (eliminabili con l'urina).
- Gli enzimi metabolizzanti sono in genere poco specifici, metabolizzano cioè molti substrati diversi (ma con un dominio strutturale comune).
- Tutti gli enzimi deputati al metabolismo di composti ad azione farmacologica sono coinvolti anche nella sintesi o metabolismo di composti endogeni.
- L'organo più ricco di enzimi metabolizzanti è il fegato, seguono i polmoni, i reni, il sangue. Tutti i tessuti hanno capacità metabolica.
- Alcuni tessuti hanno un'elevata concentrazione di enzimi metabolizzanti (mucosa nasale, cristallino), ma il loro contributo al metabolismo sistemico è pressoché nullo dato il loro piccolo volume.

# Principali reazioni metaboliche

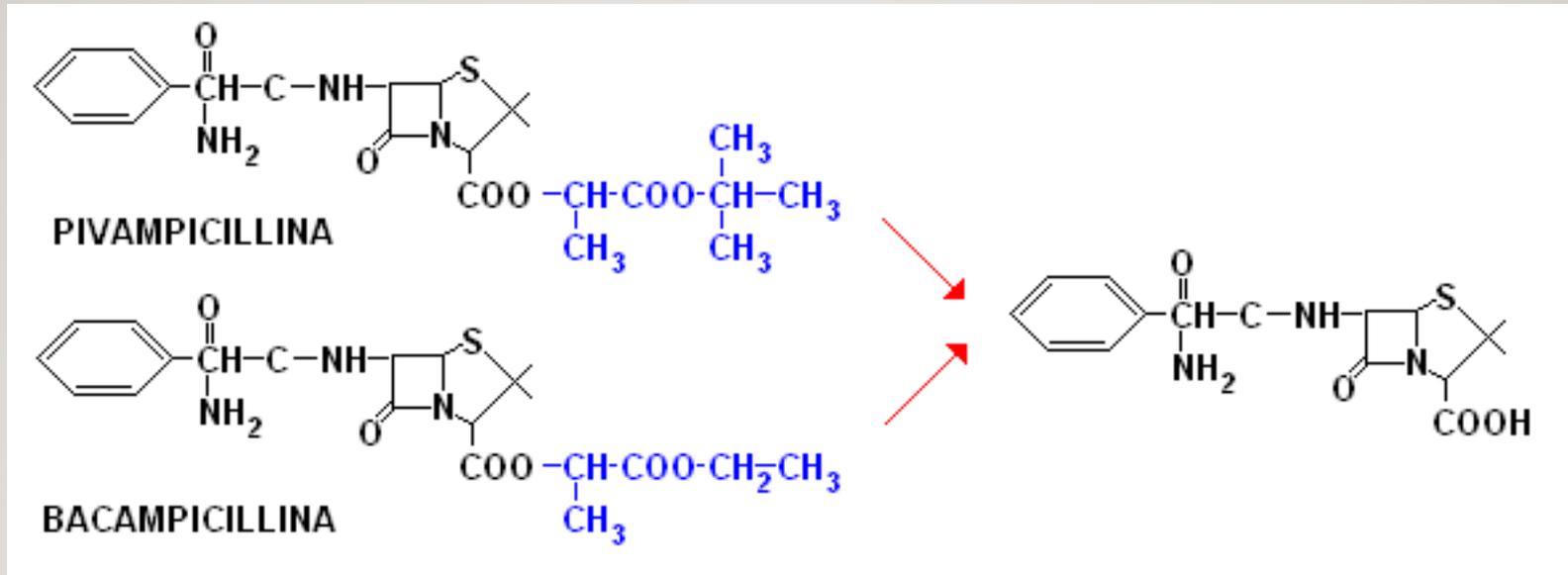


# Reazioni di fase I o di funzionalizzazione

Sono le reazioni ad es. di **idrolisi, riduzione, ossidazione ecc.**

- Portano in genere all'introduzione o smascheramento di un gruppo nucleofilo (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -COOH).
- Ciò causa solo un aumento dell'idrofilia. Il gruppo funzionale nucleofilo fornisce anche un punto di attacco per le reazioni di fase II.
- Le reazioni di fase I determinano in genere perdita o riduzione dell'efficacia (modificazione della struttura). In altri casi l'efficacia aumenta (**pro-farmaci**), oppure si possono produrre metaboliti tossici.

# PRO-FARMACO



L'ampicillina è un antibiotico attivo per via orale (stabilite in ambiente gastrico), è caratterizzato però da una percentuale di assorbimento limitata: all'incirca solo 1/3.

L'esterificazione della funzione carbossilica della molecola porta alla sintesi di profarmaci di minore polarità e maggiore lipofilia di conseguenza maggiore assorbimento.

L'idrolisi ad opera delle esterasi ematiche porta alla liberazione dell'Ampicillina.

# ENZIMI DI FASE I

I **citocromi P450 (CYP 450)** sono una superfamiglia di enzimi che contengono tutti una molecola di **eme** legata in maniera non covalente alla catena polipeptidica.

I **CYP** utilizzano l'ossigeno molecolare ( $O_2$ ) più idrogenioni ( $H^+$ ) derivati dal **cofattore NADPH** per determinare l'ossidazione dei substrati. La reazione catalizzata dal citocromo può generare però un eccesso di intermedi di ossigeno attivato ( $O_2^-$ ), che possono essere potenzialmente dannosi e in genere vengono inattivati dall'enzima superossido dismutasi e trasformati in acqua.

Le forme ridotte degli enzimi P450 combinate con CO formano un pigmento di colore rosa ( “Pink” da cui “P”); questo composto ha picchi di assorbimento a 450 nm (da 447 a 452 nm).

# ENZIMI DI FASE I

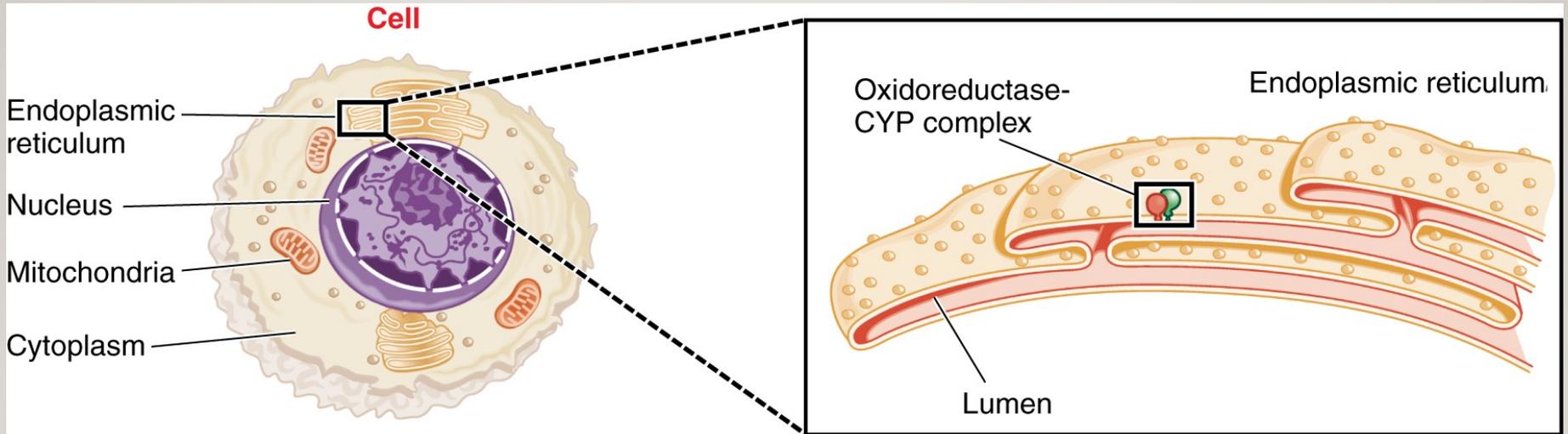
- **Citocromo P450 (CYP 450).** E' la famiglia di enzimi più importante di fase I perché metabolizzano un gran numero di xenobiotici ed è il principale responsabile dell'inattivazione di molti farmaci e tossici.
- Sono coinvolti anche nella biosintesi o degradazione di molti composti endogeni (ormoni steroidei, vitamine liposolubili, acidi grassi ecc.)
- Sono presenti in tutti i tessuti. I livelli più alti si ritrovano nel fegato, a livello del reticolo endoplasmatico (frazione microsomiale)

# LOCALIZZAZIONE INTRACELLULARE DEGLI ENZIMI

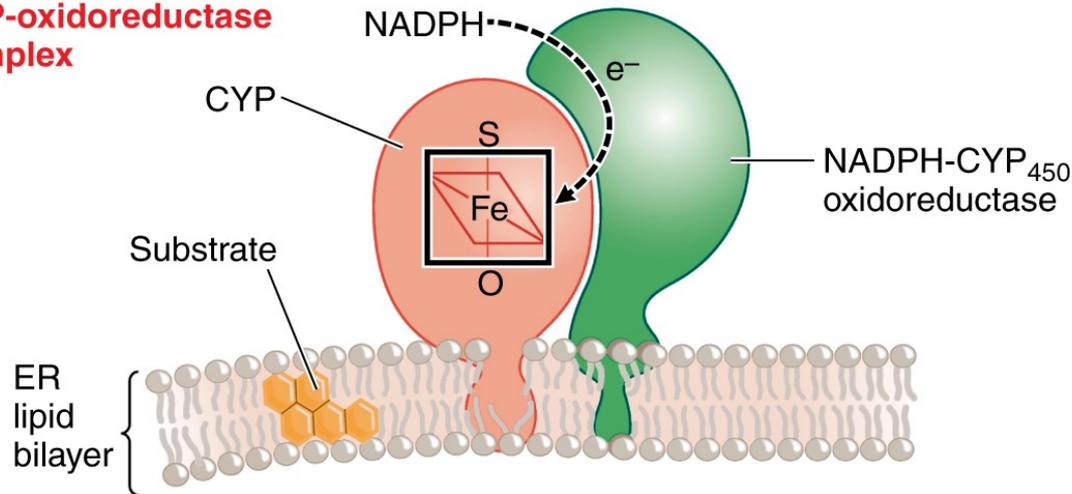
---

- Un determinato enzima ha in genere un'unica localizzazione intracellulare.
- Nel fegato gli enzimi sono localizzati principalmente nel reticolo endoplasmatico (enzimi **microsomiali**) e nel citosol. Un numero minore di enzimi è localizzato nei mitocondri, nei lisosomi, nel nucleo.

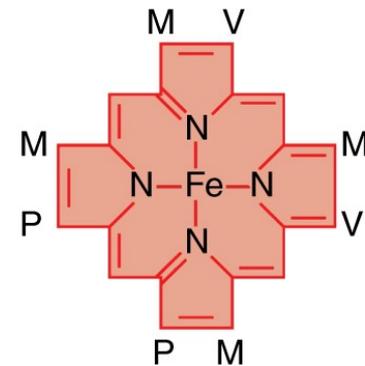
# Posizione dei citocromi nella cellula

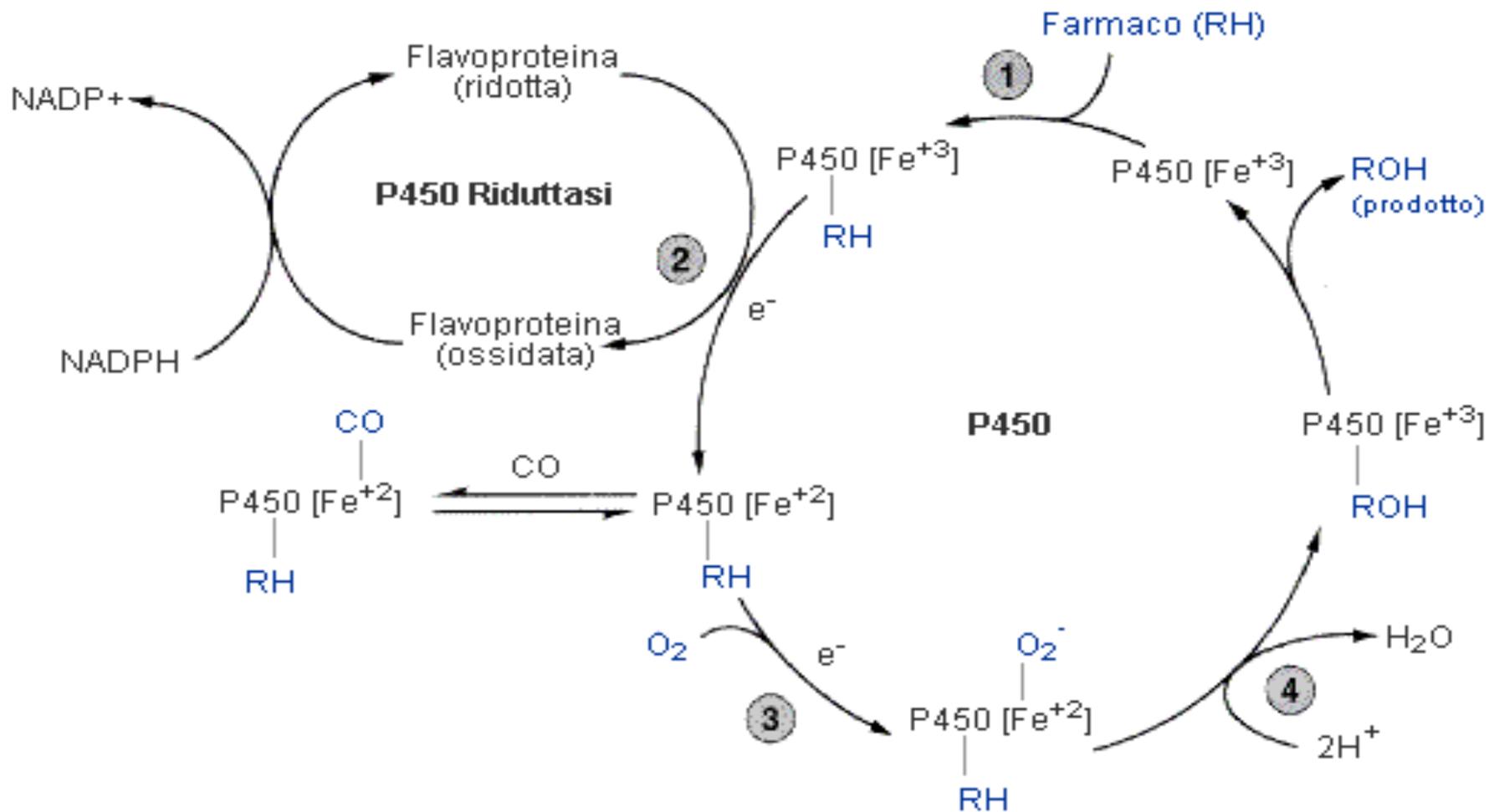


## CYP-oxidoreductase complex



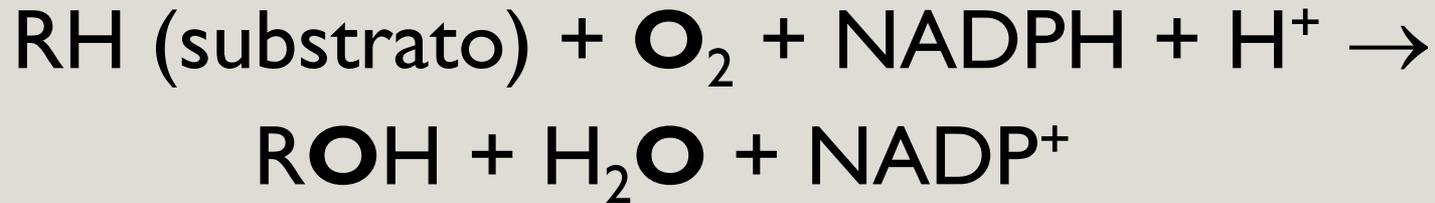
## Iron-protoporphyrin IX (Heme)





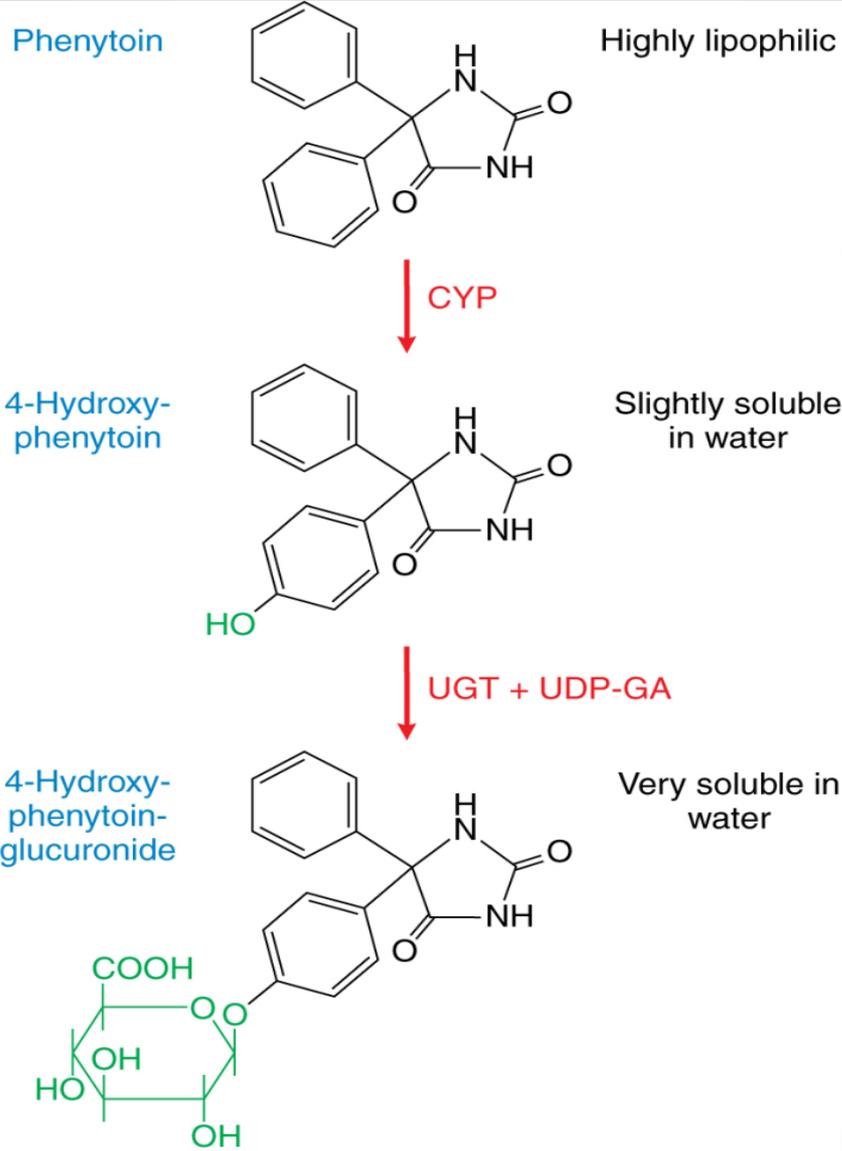
- CYP450 lega direttamente il substrato e O<sub>2</sub>.
- I 2 elettroni provenienti da NADPH arrivano al complesso CYP450-substrato tramite una flavoproteina, la NADPH-citocromo P450 riduttasi.

- Reazione generale:



- E' una reazione di monoossigenazione in cui un atomo di ossigeno è incorporato nel substrato; l'altro atomo di O è ridotto ad H<sub>2</sub>O, con l'apporto degli equivalenti riducenti (elettroni) provenienti da NADPH.

# ESEMPIO METABOLISMO: FENITOINA (FARMACO ANTIEPILETTICO)



Alcuni esempi di reazione catalizzate dalla famiglia del CYP450:

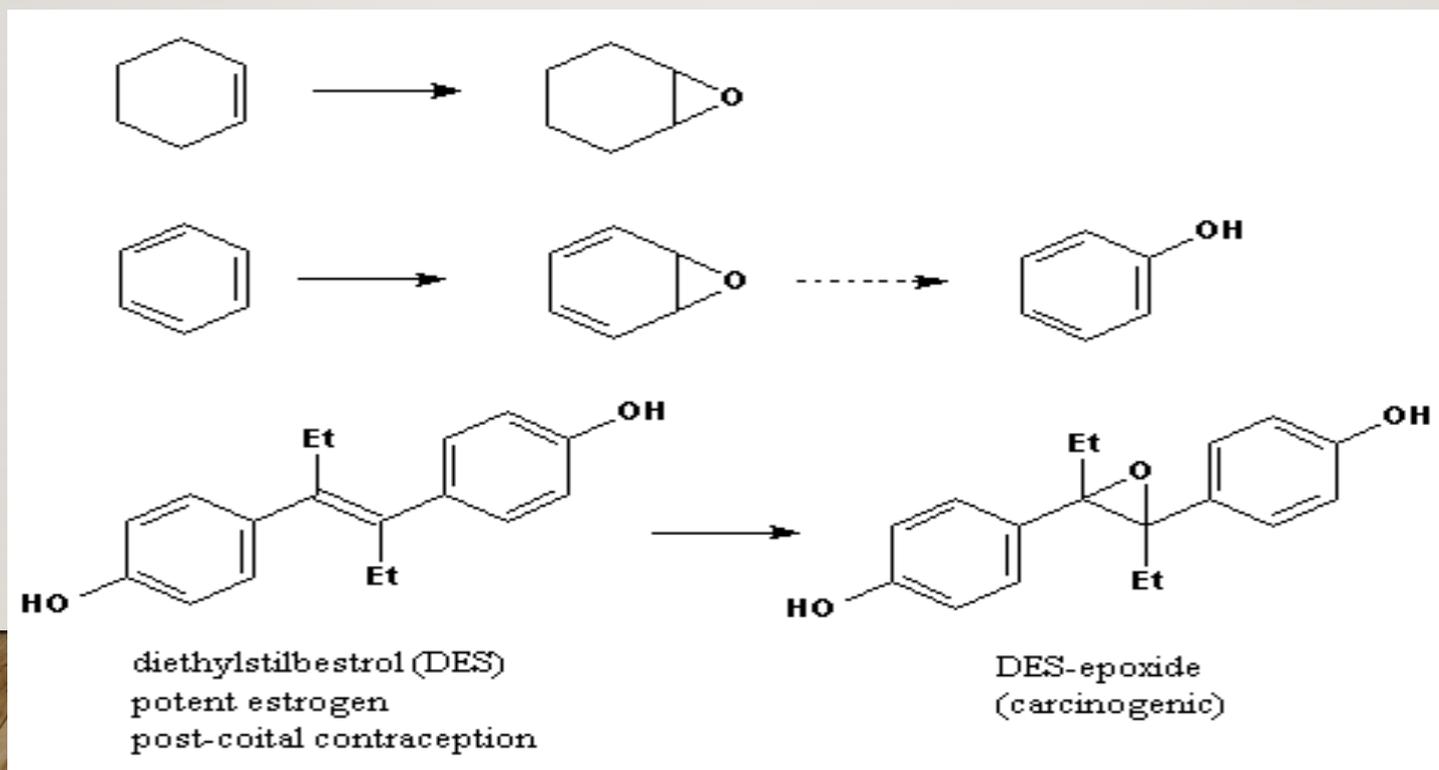
Idrossilazione alifatica e aromatica

De-alchilazione di un eteroatomo

Ossigenazione di un eteroatomo

Trasferimento di un gruppo ossidativo. Riduzione

## Epossidazione catalizzata da CYP450



Sono descritte 74 famiglie. 14 sono presenti nei mammiferi, 3 sono coinvolte nel metabolismo di xenobiotici (farmaci) (CYP1, CYP2, CYP3)

## **CYP450 NOMENCLATURE**

Based upon Nelson et al. *DNA & Cell Biology* 12:1-51, 1993.

### **CYP3A4**

**CYP** – abbreviation for cytochrome P450

**3** – designates family ( $\geq 40\%$  sequence identity)

**A** – designates sub-family ( $\geq 55\%$  sequence identity)

**4** – designates specific gene/enzyme

**CYP** – designates mRNA or protein

**CYP** – designates gene

**CYP1A1** – gene that codes for cytochrome P450 1A1

**CYP1A1** – mRNA or protein product of **CYP1A1** gene

# **CONSEGUENZE** delle differenze qualitative e quantitative nelle varie specie per tipologia di farmaco

- I **cattivi metabolizzatori** eliminano il farmaco più lentamente e corrono quindi il rischio di sviluppare effetti avversi con dosi 'ordinarie' di farmaco.
- I **buoni metabolizzatori** a dosi ordinarie possono determinare concentrazioni plasmatiche subterapeutiche e quindi un effetto clinico inadeguato.

# REAZIONI DI FASE II

Le reazioni di coniugazione (fase II), oltre ad aumentare l'idrofilia, prevengono l'ossidazione di diversi composti (fenoli, idrochinoni ecc.) ad elettrofili (es. CYP450 e altri enzimi) o radicali liberi (es. perossidasi).

-OH  
-COOH  
-NH<sub>2</sub>  
-SH

## Reazioni di coniugazione di fase II

- glucuronidazione
- solfatazione
- acetilazione
- metilazione
- coniugazione con glutatione (formazione di acidi mercapturici)
- coniugazione con aminoacidi (glicina, taurina, acido glutammico)

L'acetilazione e la metilazione portano ad una diminuzione dell'idrofilia ma possono proteggere dalla formazione di metaboliti reattivi

# Coniugazione con glutatione

- Un ampio spettro di substrati da' reazioni di coniugazione con il glutatione, con meccanismi diversi:
- Elettrofili (carboni fenilici e allilici):
- GS<sup>-</sup> può anche addizionarsi a composti insaturi (alcheni, chetoni)
- La coniugazione con GSH può detossificare molti composti elettrofili formati in fase I (epossidi, chinoni, aflatossine ecc.)
- La metabolizzazione di I fase del paracetamolo può comportare la sintesi di metaboliti reattivi nel cane (necrosi epatica). Bloccati dal GSH
- GS<sup>-</sup> può anche dare reazioni di sostituzione con eteroatomi (O, N, S); es., nitroglicerina

# INDUZIONE ENZIMATICA

- Numerosi agenti (farmaci, xenobiotici di sintesi e naturali, alimenti) possono indurre l'aumento della sintesi degli enzimi metabolizzanti, sia di fase I che di fase II.
- Gli induttori possono essere suddivisi in classi, in dipendenza del *pattern* di induzione.
- Alcune classi inducono un aumento della sintesi di numerosi enzimi metabolici. Altre classi sono induttori più selettivi; in genere, comunque, un induttore stimola la sintesi di più di un enzima metabolizzante.

- Induttori 'ad ampio spettro' come il **fenobarbital** determinano un'ipertrofia epatica e proliferazione del reticolo endoplasmatico ⇒ aumento generalizzato della sintesi proteica nel fegato (regione centro-lobulare) ⇒ aumento di numerosi enzimi metabolizzanti.
- **Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)**: inducono l'aumento della sintesi di alcuni isozimi CYP450 (soprattutto CYP1A1), con elevata capacità catalitica verso gli induttori, e, in misura minore, di altri enzimi (epossido idrolasi, UDP-glucuronosiltransferasi, glutatione-S-transferasi).
- Altri induttori importanti sono: pesticidi alogenati (DDT, esaclorobenzene ecc.); policlorobifenili (PCB) e polibromobifenili (PBB); diossine clorurate (in particolare TCDD); steroidi.

# Effetti dell'induzione enzimatica

Farmaci: aumento della velocità di inattivazione dell'induttore stesso (autoinduzione) e/o di altri farmaci, somministrati contemporaneamente  $\Rightarrow$  diminuzione delle concentrazioni plasmatiche medie  $\Rightarrow$  diminuzione dell'efficacia  $\Rightarrow$  rischio di insuccesso terapeutico (es. autoinduzione degli antiepilettici; rifampicina-anticoncezionali; rifampicina-ciclosporina; ecc.)

- **Tossici** che agiscono con **meccanismo specifico**, mediato dall'interazione con recettori  $\Rightarrow$  diminuzione della tossicità (es. riduzione della tossicità degli inibitori organofosforici dell'AChE).
- Composti attivati a **metaboliti tossici** (che agiscono con meccanismo non specifico)  $\Rightarrow$  l'induzione può aumentare o diminuire la tossicità, in dipendenza dell'**effetto complessivo** dell'induttore sull'attività degli enzimi attivatori e degli enzimi detossificanti.

# INIBIZIONE ENZIMATICA

- ◎ Gli inibitori enzimatici agiscono diminuendo la trasformazione metabolica di altri xenobiotici da parte dell'enzima inibito, senza modificare la sintesi proteica\*.
- ◎ Gli inibitori sono in genere più selettivi degli induttori poiché inibiscono solo un enzima (o un isoenzima) o isoenzimi strettamente correlati.

\* gli inibitori della sintesi proteica (in generale) possono essere considerati inibitori enzimatici

## **Conseguenze dell'inibizione enzimatica**

Farmaci: diminuzione dell'eliminazione metabolica  
⇒ aumento della concentrazione plasmatica del  
farmaco 'inibito' ⇒ possibile raggiungimento di livelli  
tossici (es. ketoconazolo-terfenadina).

## ALTRI FATTORI CHE INFLUENZANO LA CAPACITÀ METABOLICA INDIVIDUALE

- ◉ Specie 
  - ◉ Razza
  - ◉ Età: la capacità metabolica (in generale) è bassa alla nascita, aumenta fino ad un massimo nell'età adulta per poi decrescere in vecchiaia.
  - ◉ Fattori patologici. Malattie epatiche (cirrosi, epatopatia alcolica, epatiti, epatomi): due effetti contrastanti: 1) diminuzione della capacità metabolizzante, soprattutto del metabolismo ossidativo (anche per alterazioni del flusso ematico); 2) ipoalbuminemia (l'albumina viene prodotta nel fegato) ⇒ aumento della quota di farmaco non legata ⇒ aumento della velocità del metabolismo. L'effetto globale dipende dall'entità del legame all'albumina e dal coefficiente di estrazione epatico ⇒ effetto poco prevedibile.
- 

# CAPACITÀ METABOLICHE IN FUNZIONE DELLA SPECIE

Grammi di fegato/kg p.c.

⊙	Topo	66
⊙	Ratto	40
⊙	Coniglio	34
⊙	Gatto	27
⊙	Quaglia	25
⊙	Cane	23
⊙	Ovino	22
⊙	Suino	15
⊙	Bovino	12
⊙	Trota	10

# Proteine in mg/g di fegato

⊙ Ratto	223
⊙ Cane	212
⊙ Gatto	209
⊙ Quaglia	205
⊙ Topo	200
⊙ Coniglio	185
⊙ Trota	174
⊙ Ovino	128
⊙ Suino	113
⊙ Bovino	98

## Citocromo P-450 nmoli/mg di proteina

- **Topo**            **801**
- **Coniglio**       **565**
- **Ratto**           **528**
- **Gatto**           **449**
- **Cane**            **184**
- **Ovino**           **165**
- **Trota**           **103**
- **Quaglia**         **84**
- **Bovino**         **72**
- **Suino**           **58**

## Citocromo P-450 $\mu\text{moli/kg p.c.}$

- **Topo**            **10.537**
- **Ratto**           **4.757**
- **Coniglio**       **3.606**
- **Gatto**            **2.533**
- **Cane**             **905**
- **Ovino**            **477**
- **Quaglia**         **444**
- **Trota**            **192**
- **Suino**            **101**
- **Bovino**          **88**

**Velocità (teorica ) di biotrasformazione (catalizzata da MFO citocromo P-450 dipendenti) di un farmaco in sede epatica.**

- **Topo**            **120**
- **Ratto**            **54.05**
- **Coniglio**        **40.98**
- **Gatto**            **29.4**
- **Cane**            **10.3**
- **Ovino**            **5.42**
- **Quaglia**          **5.04**
- **Trota**            **2.18**
- **Suino**            **1.14**
- **Bovino**          **1**



- Dieta.
- Presenza di induttori (es. IPA da combustione, Brassicacee ecc.) o inibitori (es. flavonoidi del succo di pompelmo).
- *Stati carenziali di minerali presenti negli enzimi (Fe, Cu, Zn) o che ne regolano l'attività (Ca, Mg).*
- *Stati carenziali di vitamine (C, E, gruppo B): diminuzione di cofattori enzimatici; alterazione dello status energetico e redox delle cellule.*

