

Chương 3

SINH CHUYỂN HOÁ CÁC CHẤT ĐỘC

Sinh chuyển hoá các chất độc là quá trình chuyển hoá các chất ngoại sinh (chất lạ) nhờ xúc tác enzym của cơ thể. Một số họ enzym trao đổi chất, thường với dãy rộng đặc trưng cơ chất, tham gia vào sự trao đổi chất của chất ngoại sinh và gồm các monooxygenaza xitocrom P-450 (CYP), monooxygenaza chứa flavin (FMO), ancol và andehit dehydrogenaza, amin oxidaza, xicloxygenaza, reductaza, hydrolaza và những enzym liên hợp khác như glucuronidaza, glutathiontransferaza (bảng 3.1)

Bảng 3.1. Các con đường chung của sinh chuyển hoá chất ngoại sinh và vị trí dưới tế bào chủ yếu của chúng.

Phản ứng	Enzim	Vị trí
Giai đoạn I		
Oxi hoá	Xitocrom P-450 (bào sắc tố P-450)	Vi thể (microsom)
	Flavin-mooxygenaza	Vi thể
	Ancol dehydrogenaza	Phần bào tan (cytosol)
	Andehit dehydrogenaza	Ti thể (mitochondria), phần bào tan
	Andehit oxidaza	Phần bào tan
	Monoamin oxidaza	Ti thể
	Điamin oxidaza	Phần bào tan
	Prostaglandin H synthaza	Vi thể
Khử hoá	Khử nitro và azo	Hệ thực vật nhỏ (microflora), vi thể, phần bào tan
	Khử disulfua	Phần bào tan
	Khử cacbonyl	Phần bào tan, máu, vi thể
	Khử sunfoxit	Phần bào tan
	Khử quinon	Vi thể
	Khử dehalogen hoá	Vi thể
Thuỷ phân	Esteraza	Vi thể, phần bào tan, tiêu thể (lysosom), máu
	Peptidaza	Máu, tiêu thể
	Epoxit hydrolaza	Vi thể, phần bào tan
Giai đoạn II		
	Liên hợp glucuronit	Vi thể
	Liên hợp sunfat	Phần bào tan
	Liên hợp glutathion	Phần bào tan, vi thể
	Liên hợp axit amin	Ti thể, vi thể
	Metyl hoá	Phần bào tan, vi thể, máu
	Axyl hoá	Ti thể, phần bào tan

Hầu hết các chất ngoại sinh xuất hiện ở gan, một cơ quan được giành cho sự tổng hợp nhiều protein chức năng quan trọng và nhờ vậy có khả năng điều hoà sự chuyển hoá hoá học các chất ngoại sinh. Các chất ngoại sinh đi vào cơ thể thường là ưa dầu, khiến chúng có khả năng liên kết vào màng lipid và được vận chuyển bởi lipoprotein vào máu đến các mô. Sau khi đi vào gan cũng như các mô khác các chất có thể chịu một hoặc hai giai đoạn trao đổi chất. Ở giai đoạn I, nhóm phản ứng phân cực ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ hoặc $-\text{COOH}$) được đưa vào phân tử làm cho nó trở thành cơ chất thích hợp cho các enzym giai đoạn II. Các enzym điển hình trong sự trao đổi chất giai đoạn I bao gồm CYP, FMO và các hydrolaza. Ở giai đoạn II, sau khi đưa nhóm phân cực vào, các enzym liên hợp điển hình đưa thêm vào nhiều nhóm thế công kênh, như các đường, sunfat hoặc các axit amin tạo ra tính tan trong nước tăng lên đáng kể của chất ngoại sinh làm cho nó được dễ dàng bài tiết.

Quá trình sinh chuyển hoá hai giai đoạn (hoặc một giai đoạn đối với các chất ngoại sinh chứa sẵn nhóm phân cực) nêu trên nói chung được xem là quá trình khử độc, mặc dù vậy có những trường hợp các chất trung gian hoạt động có thể được hình thành ở giai đoạn I và II) và chúng độc hơn nhiều so với các chất mẹ.

3.1. CÁC PHẢN ỨNG GIAI ĐOẠN I

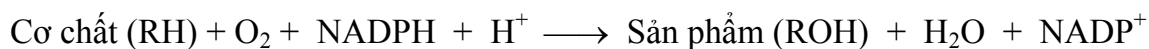
3.1.1. Oxi hoá

Monooxygenaza xitocrom P-450 phụ thuộc (CYP)

CYP có nồng độ cao nhất trong lưới nội chất gan (các vi thể), nhưng thực tế có trong tất cả các mô. Các vi thể tách từ lưới nội chất (đồng thể hoá và bằng quay li tâm) gồm hai loại nhám và nhẵn. Loại vi thể nhám có màng bên ngoài gắn với các ribosom. Loại vi thể nhẵn có tất cả các hợp tử của hệ monooxygenaza P-450 phụ thuộc, hoạt tính đặc trưng của các loại nhẵn đối với chất ngoại sinh thường cao hơn. Các enzym P-450 vi thể và ti thể đóng vai trò quan trọng trong sinh tổng hợp hoặc dị hoá các hormon steroid, axit mật, các vitamin tan trong dầu, các axit béo và eicosanoit và chúng cũng đóng vai trò chìa khoá trong sự khử độc các chất ngoại sinh.

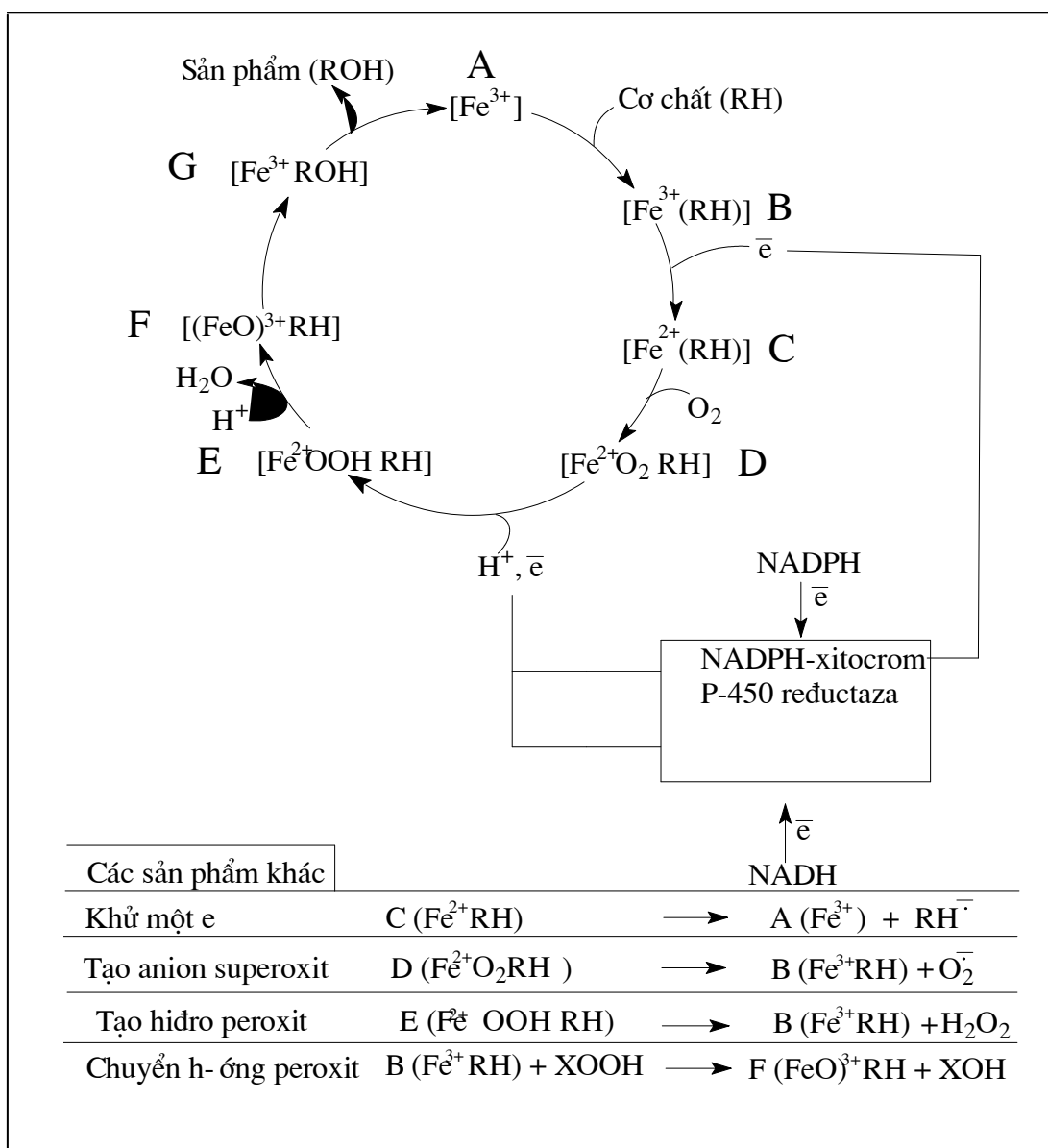
Tất cả các enzym P-450, xitocrom liên kết cacbon monoxit của vi thể, hiện được biết trên 2000 enzym riêng được phân bố rộng khắp trong động vật, thực vật và vi sinh vật. Chúng là các protein chứa hem. Sắt hem trong xitocrom P-450 thường là trạng thái sắt (III) (Fe^{3+}). Khi bị khử đến trạng thái sắt (II) (Fe^{2+}), xitocrom P-450 có thể liên kết các phối tử như O_2 , CO. Phức giữa xitocrom P-450 sắt (II) và CO hấp thụ ánh sáng cực đại ở 450 nm, và tên gọi của nó xuất phát từ đây. Cực đại hấp thụ của phức khác nhau nhẹ giữa các enzym P-450 khác nhau và nằm trong giới hạn từ 447 đến 452 nm. Tất cả các protein máu khác liên kết CO hấp thụ ánh sáng cực đại ở ~ 420 nm.

Phản ứng cơ bản được xúc tác bởi xitocrom P-450 là sự monooxi hoá trong đó một nguyên tử oxi của phân tử oxi được sát nhập vào cơ chất RH, và nguyên tử oxi kia bị khử tới nước với các đương lượng khử từ NADPH (chính từ đây người ta nói xitocrom P-450 phụ thuộc), và phản ứng toàn bộ có thể viết như sau:



Mặc dù xitocrom P-450 có chức năng như là một monooxygenaza, nhưng các sản phẩm không bị giới hạn đến ancol hoặc phenol do các phản ứng chuyển vị. Trong quá trình xúc tác xitocrom P-450 liên kết trực tiếp với cơ chất và phân tử oxi mà không tương tác trực tiếp với NADPH hoặc NADH. Trong chu trình xúc tác của xitocrom P-450, các đương lượng khử (các electron) được vận chuyển từ NAD(P)H phụ thuộc vào sự định vị dưới tế bào của xitocrom P-450. Trong lưới nội chất (ví thể) các electron được truyền từ NADPH đến xitocrom P-450 qua enzym flavoprotein được gọi là NADPH – xitocrom P-450 reductaza. Reductaza này là flavoprotein có phân tử khối khoảng 80.000 Đanton chứa 2 mol mỗi flavinmononucleotit (FMN) và flavinađenin đinucleotit (FAD) trên mol enzym, và các electron truyền qua FMN và FAD. Trong ti thể, các electron được truyền từ NAD(P)H đến xitocrom qua hai protein: protein chứa lưu huỳnh - sắt gọi là feredoxin và flavoprotein chứa FMN gọi là feredoxin reductaza (các protein này còn gọi là adrenodoxin và adrenodoxin reductaza). Các cấu tử khác cần cho sự hoạt hoá trong sự cấu trúc lại hệ thống là photpholipit và photphatidylcholin. Chúng không tham gia trực tiếp vào sự vận chuyển electron mà xuất hiện để tham gia vào sự ghép cặp của reductaza với xitocrom P-450 và trong sự liên kết của cơ chất vào xitocrom P-450. Có một số trường hợp loại trừ không theo quy luật chung là xitocrom P-450 đòi hỏi enzym thứ hai (ví dụ, flavoprotein) cho sự hoạt động xúc tác.

Cơ chế hoạt động của xitocrom P-450 chưa được thiết lập rõ ràng, tuy nhiên các giai đoạn chung đã được thừa nhận chỉ ra ở hình 3.1. Giai đoạn khởi đầu gồm sự liên kết của cơ chất vào xitocrom P-450, sắt hem bị khử từ sắt III (Fe^{3+}) đến trạng thái sắt (II) (Fe^{2+}) bởi cộng một electron từ NADPH-xitocrom P-450 reductaza để tạo ra phức cơ chất – xitocrom khử [$\text{Fe}^{2+}(\text{RH})$]. Tiếp theo phức này tương tác với oxi phân tử tạo ra phức bậc ba (ba thành phần) [$\text{Fe}^{2+}\text{O}_2\text{RH}$]. Phức ba thành phần này được chuyển hoá thành phức [$\text{Fe}^{2+}\text{OOH RH}$] bởi cộng proton (H^+) và electron thứ hai từ NADPH – xitocrom P-450 reductaza hoặc NADH xitocrom b₅ reductaza. Sự đưa proton thứ hai vào phá vỡ phức [$\text{Fe}^{2+}\text{OOH RH}$] để tạo ra nước và phức [$(\text{FeO})^{3+} \text{RH}$], phức này chuyển oxi của nó cho cơ chất để tạo ra sản phẩm và quay trở lại xitocrom P-450 oxi hoá trạng thái ban đầu của nó.



Hình 3.1. Chu trình xúc tác của xitocrom P-450

Các phản ứng khác: Nếu chu trình bị gián đoạn (không ghép cặp) tiếp theo sự đưa electron thứ nhất vào, oxy được giải phóng như anion superoxit (O_2^-). Nếu chu trình bị gián đoạn sau khi đưa electron thứ hai vào, oxy được giải phóng như hidro peroxit (H_2O_2). Phần tử oxi hoá sau cùng $[\text{FeO}]^{3+}\text{RH}$ có thể được sinh ra trực tiếp bởi sự chuyển nguyên tử oxi từ hidro peroxit và hidroperoxit khác nào đó, quá trình được biết như là sự chuyển hướng peroxit. Vì nguyên nhân này các phản ứng xitocrom P450 nào đó có thể được trợ giúp bởi các hidroperoxit trong sự vắng mặt của NADPH-xitocrom P-450 reductaza và NADPH.

Xitocrom b_5 có thể truyền electron thứ hai từ NADH đến xitocrom P-450. Mặc dù điều này chỉ có thể hi vọng là làm tăng tốc xúc tác của xitocrom P-450, xitocrom b_5 cũng có thể làm tăng ái lực liên kết của xitocrom P-450 với cơ chất.

Các họ bào sắc tố P 450 có khả năng trao đổi chất ngoại sinh

Mặc dù động vật có vú được biết có 18 họ CYP, chỉ có ba họ tham gia vào sự trao đổi chất ngoại sinh. Ba họ này (các họ 1 – 3) được xem xét nhiều hơn gần đây bắt nguồn từ các họ CYP “thủy tổ”. Các họ còn lại có ít chức năng hỗn hợp trong khả năng trao đổi chất của chúng và thường chỉ đáp ứng cho các giai đoạn trao đổi chất riêng. Ví dụ, các thành viên của họ CYP4 đáp ứng riêng cho sự hiđroxyl hoá cuối mạch của axit béo mạch dài. Các họ còn lại khác của động vật tham gia vào sự sinh tổng hợp các hormon steroid. Trong thực tế một số tên gọi của họ này xuất phát từ các vị trí khác nhau trong nhân steroid mà ở đây xảy ra sự trao đổi chất, ví dụ, CYP 7 tạo chất trung gian hiđroxyl hoá của cholesterol ở vị trí 7α , trong khi đó CYP 17 và 21 lại xúc tác cho sự hiđroxyl hoá ở các vị trí 17α và 21 tương ứng của progesteron. CYP 19 đáp ứng cho sự thơm hoá androgen thành estrogen bằng giai đoạn đầu hiđroxyl hoá ở vị trí 19. rất nhiều CYP đáp ứng cho sự sinh hormon steroid được tìm thấy ở vỏ thượng thận lại tham gia vào sự trao đổi chất ngoại sinh trong các mô như gan, thận, phổi và khướu giác.

Họ CYP1 ở người có ba thành viên được biết là CYP1A1, CYP1A2 và CYP1B1. CYP1A1 và CYP1A2 được tìm thấy trong hầu hết các loài động vật vì hai dạng tương đồng cao này được bảo tồn cao giữa các loài, mặc dù cả hai CYP này có thể có những chức năng nội sinh quan trọng. CYP2E1 chỉ là một CYP khác duy trì sự chỉ định gen tương tự giữa các loài.

CYP1A1 và CYP1A2 có sự phân biệt nhưng các đặc tính cơ chất trùng lặp. CYP1A1 thích hợp với các hiđrocacbon thơm đa vòng trung hoà (PAH), CYP1A2 thích hợp với các amin và amit thơm và dị vòng. Vì ưu thế của họ này đối với các phân tử có cấu trúc phẳng cao, các thành viên của họ CYP1 có liên hệ chặt chẽ với sự hoạt hoá trao đổi gồm benzo[a]piren, dimetylbenzantraxen, aflatoxin B_1 , β -naphtylamin, 4-aminobiphenyl, 2-axetylaminofluoren và benziđin. Nhiều PAH phẳng gây ra sự trao đổi chất riêng của chúng nhờ sự sao chép cảm ứng của thụ thể aryl hiđrocacbon (thụ thể Ah). Mặc dù sự biểu hiện của CYP1A1 và CYP1A2 thường được cảm ứng phổi trí, có sự khác nhau rõ ràng về quy tắc, không chỉ ở tính đặc trưng cơ chất mà còn ở những biểu hiện sinh học của chúng. Chẳng hạn, CYP1A1 không thể hiện nhanh ở trong gan người trừ khi bị cảm ứng, trong khi đó CYP1A2 lại biểu lộ tính nội sinh trong gan. Tuy nhiên, CYP1A1 ở trong mô ngoài gan, như phổi lại có khả năng liên kết giữa sự hoạt hoá được

điều hoà bởi CYP của benzo[a]piren và các hoá chất liên quan khác có trong khói thuốc là với sự ung thư phổi ở người.

Họ CYP 2 gồm 10 họ phụ, năm trong số đó có mặt ở trong gan động vật có vú. Một số dạng iso quan trọng hơn cả được tìm thấy ở người của họ này là các CYP 2A6, - 2B6, - 2C8, - 2C9, - 2C19, - 2D6 và - 2E1. Enzim CYP 2A6 biểu hiện chủ yếu trong mô gan, chiếm từ 1-10% tổng số hàm lượng của CYP. CYP 2A6 đáp ứng cho sự 7-hydroxyl hoá các hợp chất cumarin thực vật và sự hoạt của nó thường thuộc kiểu phenobarbital bằng kiểm soát con đường trao đổi chất riêng này. Các thuốc khác được trao đổi chất nhờ CYP 2A6 gồm nicotin, 2-axetylaminofluoren, metoxifluran, halothan, axit vanproic và disunfiran. Các chất tiền ung thư như đã biết được hoạt hoá nhờ CYP2A6 bao gồm aflatoxin B₁, 1,3-butadien, 2,6-điclobenzonitrin và vô số các nitrosamin. Vì CYP 2A6 đảm nhiệm tới 80% sự trao đổi chất của nicotin ở người, nhiều nghiên cứu nhằm vào việc xác định những cá thể có hiện tượng đa hình CYP2A6 có làm giảm sự rủi ro ung thư phổi không.

Tương tự như CYP2A6, dạng iso CYP2B6 của người gần đây cũng đã giành được sự thừa nhận rộng lớn đối với vai trò của nó trong sự trao đổi chất của nhiều thuốc y tế. Một số cơ chất được của CYP2B6 là xiclophotphamit, nevirapin, S-mephobarbital, artemisinin, bupropion, propofol, ifosfamid, ketamin, seleginin, methadon. CYP2B6 cũng được miêu tả có vai trò trong sự trao đổi chất các cơ photpho clopirifot và trong sự phân huỷ thuốc trừ sâu sử dụng rộng rãi dietyl toluamit (DEET). CYP2A6 được tìm thấy một tỉ lệ nhỏ trong gan (< 25 %).

Trái với CYP2A6 và CYP2B6, các thành viên của họ CYP2C có một tỉ lệ phần trăm khá lớn của các CYP trong gan người (khoảng 20%) và đảm nhận sự trao đổi chất của một số thuốc. Tất cả bốn thành viên của họ phụ này ở người biểu hiện các tính đa dạng di truyền khác nhau. Nhiều trong số chúng có tầm quan trọng y tế trong những cá thể chịu tác động. Các tính đa hình di truyền trong CYP2C19 chỉ ra rằng một trong những ảnh hưởng đa hình đầu tiên đã được miêu tả đối với sự trao đổi chất của mephenytoin. Dạng này làm giảm đáng kể sự trao đổi chất của mephenytoin, đưa đến sự phân loại chúng là những tác nhân trao đổi chất tồi. Những thuốc khác chịu sự tác động của các đồng chất dị tương CYP2C19 bao gồm thuốc chống viêm loét (chống mụn nhọt) omeprazol, những chất ức chế bơm proton khác, bacbiturat, một số thuốc giảm đau như imipramin và thuốc chống sốt rét proguanil. Những thành viên khác của họ CYP2C ở người bao gồm CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18. Các cơ chất bị trao đổi chất độc quyền bởi CYP2C8 là retinol, axit retinoic, taxol, axit arachidonic. CYP2C9, một CYP2C chủ yếu trong gan người trao đổi chất một số thuốc bao gồm tác nhân gây bệnh đái tháo

đường tolbutamit, phenytoin chống co giật cơ bắp, warfarin chống đông tụ và nhiều thuốc viêm như ibuprofen, diclofenac và những thuốc khác. Cả CYP2C9 và CYP2C8 đảm nhận sự trao đổi chất của các thuốc chống ung thư paclitaxel.

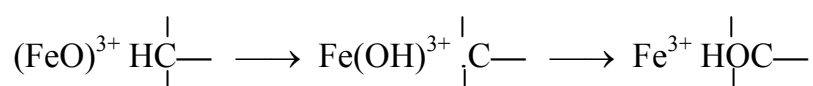
CYP2E1 là một trong số các thành viên của họ phụ CYP2E có ở trong hầu hết các động vật trừ thỏ. Các cơ chất đối với họ này là những chất có phân tử khối nhỏ gồm etanol, CCl₄, benzen, axetaminophen. Trái với nhiều họ CYP gây cảm ứng khác. CYP2E1 được điều hoà nhờ sự tổ hợp các mức sao chép tăng và tỉn hiệu tăng, và sự ổn định (bền) của protein.

Họ CYP3, không còn nghi ngờ nào nữa, có một tỉ lệ lớn trong gan người. CYP3A4 là CYP giàu có nhất trong gan người (~30%) và được biết trao đổi chất đối với nhiều thuốc quan trọng bao gồm xiclosporin A, nifedipin, rapamycin, etinyl estradiol, quinidin, digitoxin, lidocain, eritromycin, midazolam, lovastatin, tamoxifen. Những sự oxi hoá quan trọng khác của họ này bao gồm rất nhiều hormon steroid, các chất kháng sinh macrolit, các ancaloit, benzodiazepin, dihidropiridin, warfarin, các dẫn xuất dihidrodiol của hidrocarbon thơm đa vòng, aflatoxin B₁. Rất nhiều hoá chất có khả năng gây cảm ứng họ này bao gồm phenobarbital, rifampixim, dexametason.

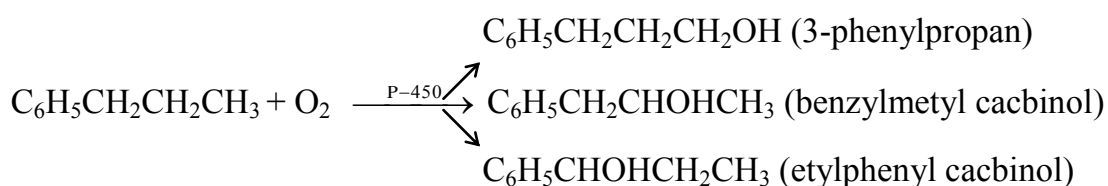
Các phản ứng của bào sắc tố P-450

Bào sắc tố P-450 xúc tác cho một số loại phản ứng oxi hoá sau:

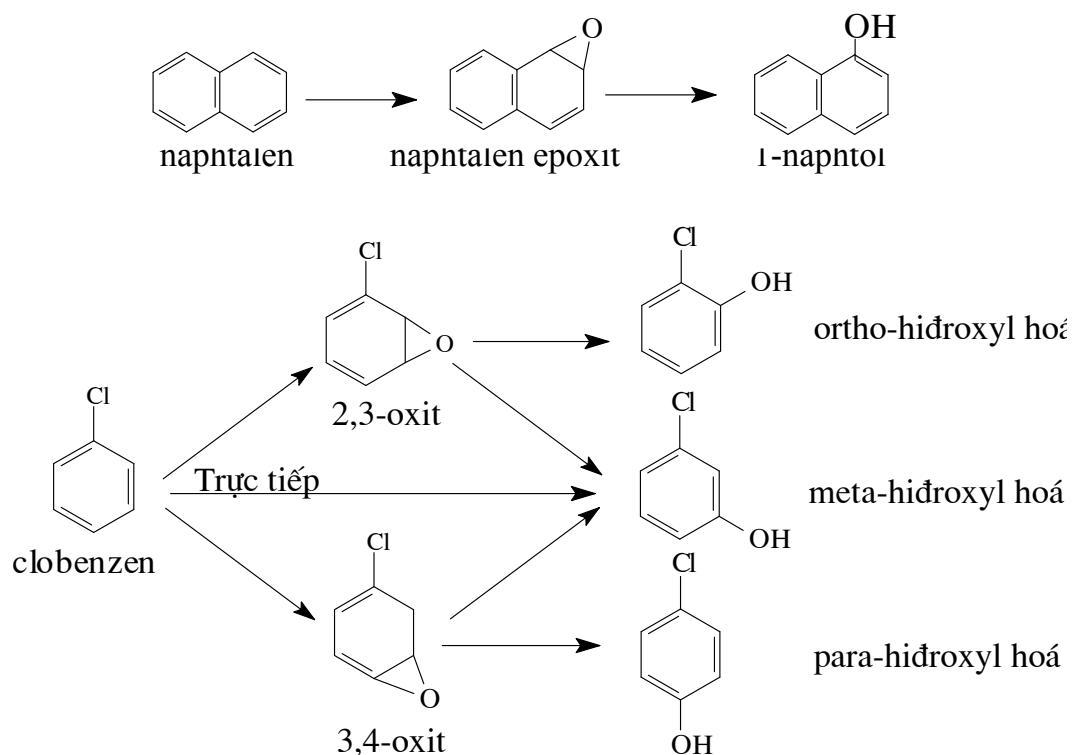
Hydroxyl hoá cacbon béo hoặc thơm: Hidroxyl hoá béo. Sự hidroxiyl hoá béo bao gồm sự lắp oxi vào liên kết C—H giống như trong trường hợp hidroxiyl hoá thơm bằng lắp trực tiếp oxi, sự bẻ gãy liên kết C—H bằng sự tách hidro là giai đoạn quyết định tốc độ phản ứng



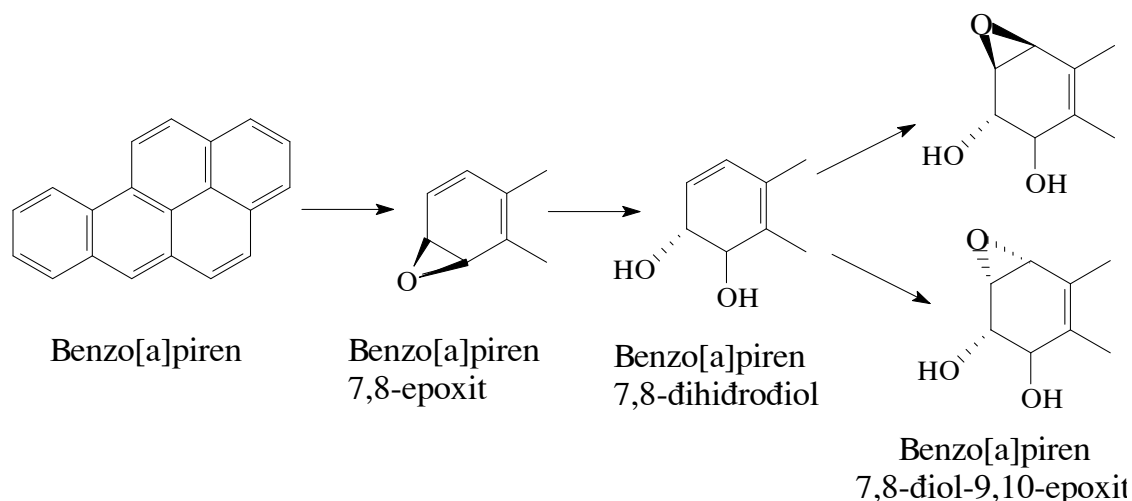
Các phân tử dây béo đơn giản như n-butan, n-pentan, n-hexan, cũng như vòng béo như xiclohexan được biết bị oxi hoá đến các ancol. Tương tự các mạch nhánh ankyl của hợp chất thơm bị oxi hoá đến ancol nhưng sự oxi hoá xảy ra dễ dàng hơn, thường ở nhiều hơn một vị trí. Ví dụ: mạch nhánh n-propyl của n-propylbenzen có thể bị oxi hoá ở một trong số ba cacbon



Hidroxiyl hoá thơm. sự hidroxiyl hoá thơm có thể trực tiếp hoặc qua chất trung gian oxiran (nghĩa là aren oxit), chất này đồng phân hoá thành phenol tương ứng. Ví dụ:

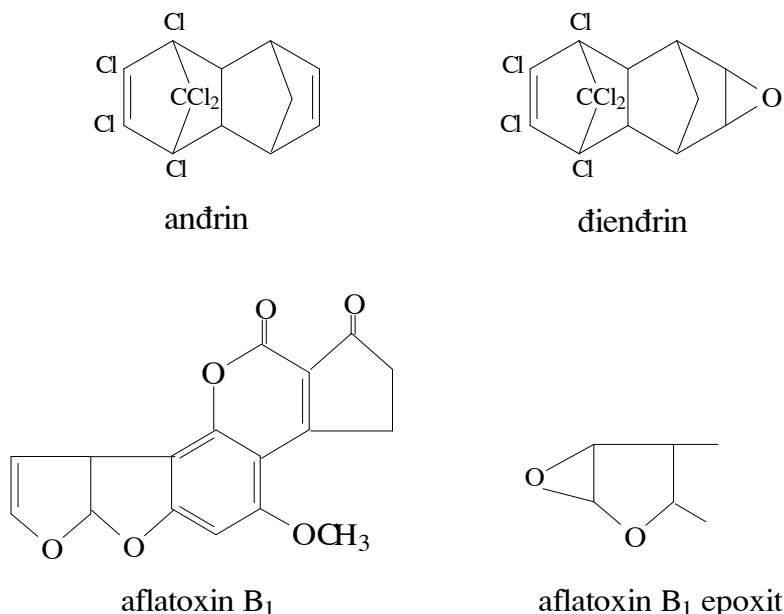


Các phản ứng epoxi hoá và hiđroxyl hoá này cũng quan trọng trong sự trao đổi chất của các chất ngoại sinh khác có chứa nhân thơm như thuốc trừ sâu cacbaryl và chất gây ung thư benzo[a]piren. Sự hình thành epoxit diol trong trường hợp của benzo[a]piren được khẳng định là chất gây ung thư sau cùng:



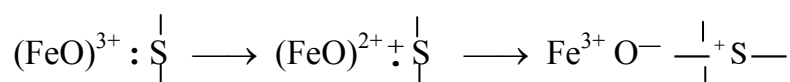
Epoxi hoá béo: rất nhiều chất ngoại sinh có chứa nối đôi cacbon — cacbon (các anken, vòng béo chưa no,...) cũng bị trao đổi chất thành các chất trung gian epoxit tương tự như sự oxi hoá các hợp chất thơm. Các epoxit béo có thể bị đồng phân hoá thành en-ol tương ứng. Trong trường hợp của andrin sản phẩm là diendrin, một epoxit đặc biệt bền và là dư lượng chủ yếu được tìm thấy trong các động vật phơi nhiễm andrin. Sự hình thành

epoxit trong trường hợp của aflatoxin được khẳng định là giai đoạn sau cùng của sự hình thành các phần tử gây ung thư chủ yếu



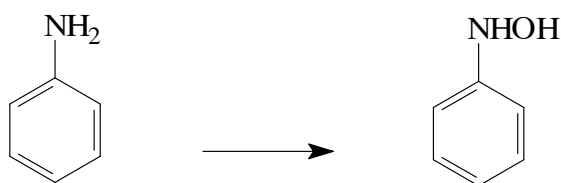
Oxi hoá các dị tố (S, N, P) và N-hiđroxyl hoá: S-oxi hoá.

Các chất ngoại sinh chứa lưu huỳnh (các thioete, các thuốc bao gồm clopromazin, ximetidin, lansoprazol, omeprazol) bị oxi hoá bởi monooxygenaza vi thể cho sunfoxit (SO), một số trong số này bị oxi hoá tiếp cho sunfon (SO₂). Phản ứng này rất chung cho các thuốc trừ sâu của một số loại hoá chất khác nhau bao gồm cacbamat, cơ photpho, cơ clo. Cơ photpho (phorat, đemeton) bị oxi hoá đến sunfoxit; cacbamat methiocarb bị oxi hoá đến sunfoxit và sunfon; hiđrocacbon clo hoá endosulfan bị oxi hoá đến endosulfan sunfat. Tham gia vào sự oxi hoá lưu huỳnh là cả hai enzym vi thể CYP và FMO, enzym sau giữ vai trò chủ yếu. Giai đoạn đầu trong sự oxi hoá dị tố bởi xitocrom P-450 bao gồm sự bứt electron từ các dị tố (S, N, I) bởi phức [(FeO)³⁺ RH], RH ở đây là các dị tố, như sau:

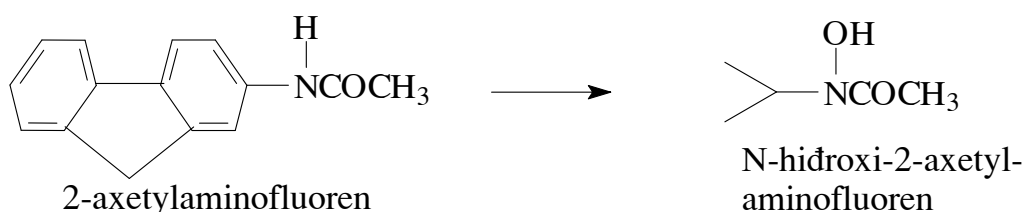


N-oxi hoá. Các chất ngoại sinh chứa nitơ như clopromazin, doxylamin, oflaxaxin, morphin, nicotin, metronidazol, piridin, stricnin, trimetylamin, trimipramin,... bị oxi hoá bởi các enzym vi thể thành các N-oxit bền. Trong khi S-oxi hoá có thể được xúc tác bởi cả hai xitocrom P-450 và FMO, sự N-oxi hoá thích hợp hơn cả bởi riêng một trong các enzym này. Nói chung FMO xúc tác sự N-oxi hoá các chất ngoại sinh chứa các nguyên tử nitơ thiếu hụt (nghèo) electron như clopromazin, trong khi đó xitocrom P-450 xúc tác sự N-oxi hoá các chất ngoại sinh chứa các nguyên tử nitơ giàu electron như piridin.

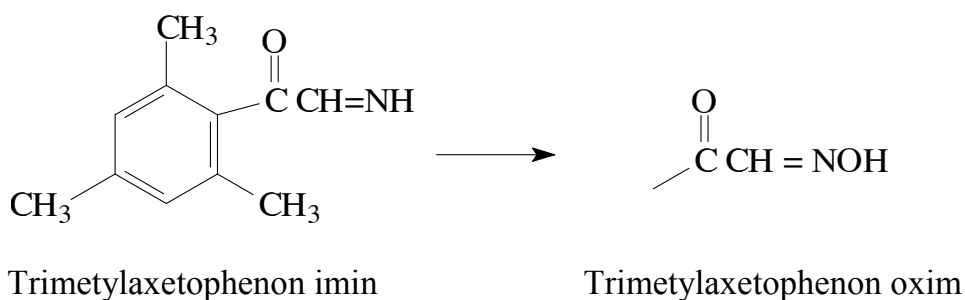
N-oxi hoá xảy ra theo nhiều đường bao gồm sự tạo thành hidroxilamin, oxim và N-oxit, mặc dù sự tạo thành N-oxit phụ thuộc chủ yếu vào enzym FMO. Phản ứng tạo hidroxilamin xảy ra với các amin như anilin và các dẫn xuất thế của nó



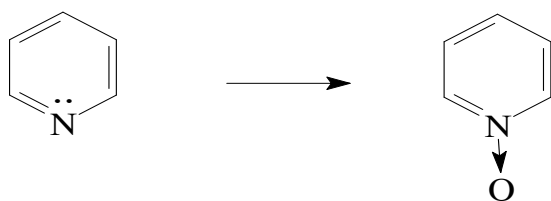
Trong trường hợp của 2-axetylaminofluoren sản phẩm là chất gây ung thư mạnh.



Sự hình thành oxim có thể xảy ra bởi sự N-hidroxilamin hoá các imin và amin bậc nhất. Imin được giả thiết là chất trung gian trong sự hình thành oxim từ amin bậc nhất.



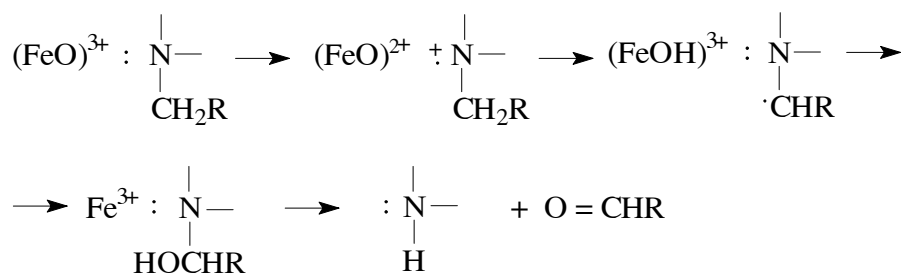
Sự oxi hoá đến cùng tạo N-oxit:



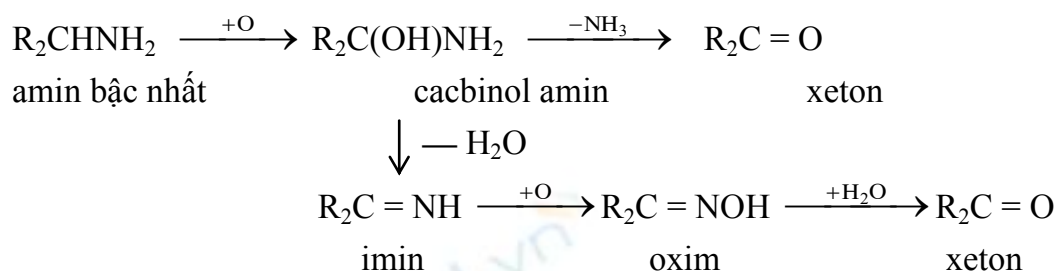
Piridin

piridin-N-oxit

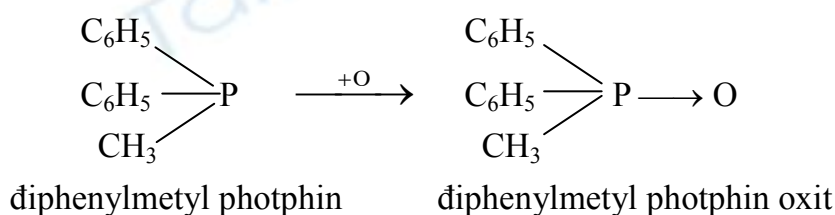
Deamin oxi hoá. Deamin oxi hoá ở giai đoạn khởi đầu cũng là sự bứt electron từ dị tố, nhưng xảy ra nhanh tiếp sau sự tách proton từ nguyên tử cacbon α (nguyên tử cacbon gần với dị tố). Sự liên kết lại oxi dẫn tới sự hidroxyl hoá cacbon α và sau đó chuyển vị thành andehit hoặc xeton tương ứng với sự bẻ gãy liên kết cacbon α với dị tố theo sơ đồ sau:



Ví dụ:



P-oxi hoá. Các phản ứng P-oxi hoá còn được biết ít bao gồm sự chuyển các photphin thể ba thành photphin oxit. Ví dụ:

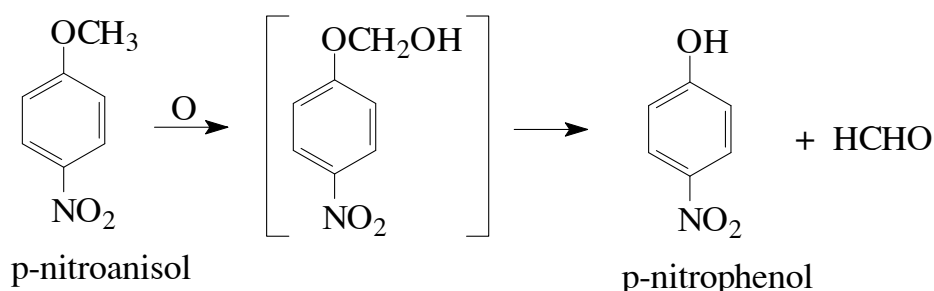


Mặc dù phản ứng này được miêu tả như là sự monooxi hoá CYP - phụ thuộc điển hình, nó cũng được xúc tác bởi FMO.

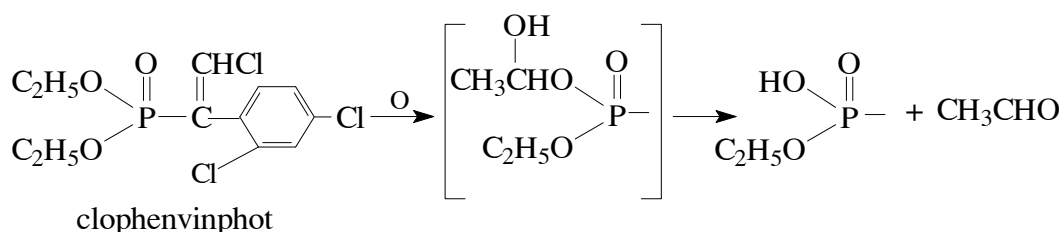
N-hiđroxyl hoá. Mặc dù các giai đoạn khởi đầu trong sự oxi hoá dị tố và đėankyl hoá dị tố giống nhau (sự bứt một electron từ dị tố để tạo ra cation gốc), bản chất của cation gốc quyết định chất ngoại sinh chịu sự oxi hoá hoặc sự đėankyl hoá. Cation gốc lưu huỳnh đủ bền để sự liên kết lại oxi với bản thân dị tố xảy ra như trong sự S-oxi hoá. Tuy nhiên, cation gốc nitơ lại chịu sự đėeproton hoá nhanh ở cacbon α gây ra bề gãy liên kết cacbon α - dị tố như trong sự N-đėankyl hoá (đėamin oxi hoá). Do vậy, nói chung xitocrom P-450 xúc tác cho sự N-đėankyl hoá, không phải cho sự N-oxi hoá của amin. Sự N-oxi hoá bởi xitocrom P-450 chỉ có thể xảy ra nếu cation gốc nitơ được bền hoá bởi nhóm cho electron ở cạnh (làm giàu electron nitơ) hoặc nếu các proton α vắng mặt (ví dụ như amin thơm). Trong trường hợp các amin thơm bậc nhất và bậc hai, sự N-oxi hoá bởi xitocrom P-450 thường tạo ra hiđroxilamin. Sự N-hiđroxyl hoá amin thơm với sự liên hợp sunfat tiếp theo là cơ chế theo đó các amin thơm gây khối u, như 2-axetylaminofluoren, được chuyển hoá thành chất trung gian hoạt động electrophin để liên kết cộng hoá trị vào ADN.

Trái với xitocrom P-450, enzym oxi hoá các chất ngoại sinh chứa nitơ theo cơ chế gốc bao gồm sự oxi hoá một electron khởi đầu của dị tố, monooxygenaza chứa flavin (FMO) oxi hoá các chất ngoại sinh chứa nitơ theo cơ chế dị li bao gồm sự oxi hoá hai electron bởi 4a-hidroperoxit của FAD (xem hình 3.2). Sự khác nhau về cơ chế này giải thích vì sao sự N-oxi hoá chất ngoại sinh bởi xitocrom P-450 nói chung gây ra sự N-đeankyl hoá, trong khi đó sự N-oxi hoá bởi FMO lại sinh ra N-oxit. Ngược lại với xitocrom P-450, FMO không xúc tác cho các phản ứng đeankyl hoá dị tố.

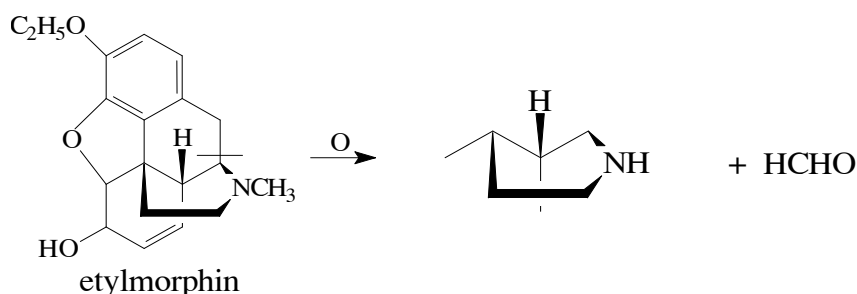
Đeankyl hoá các dị tố (O, N, S, Si): O-đeankyl. Sự đeankyl hoá ở O- có thể lấy ví dụ là sự demetyl hoá của p-nitroanisol cho sản phẩm p-nitrophenol và fomandehit. Phản ứng xảy ra qua sự hình thành chất trung gian metylol không bền



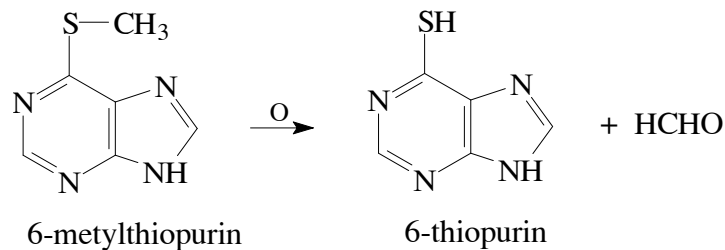
Sự O-đeankyl hoá của các trieste cơ photpho khác với O-đeankyl hoá của p-nitroanisol ở chỗ sự đeankyl hoá của một este hơn là một ete



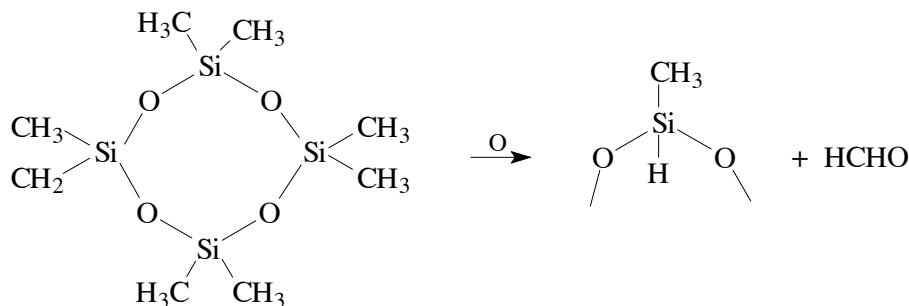
N-đeankyl hoá. N-đeankyl hoá là phản ứng chung trong sự trao đổi chất của thuốc, thuốc trừ sâu và những chất ngoại sinh khác



S-đeankyl hoá. S-đeankyl hoá xảy ra đối với nhiều thioete như metylmercaptan, 6-metylthiopurin

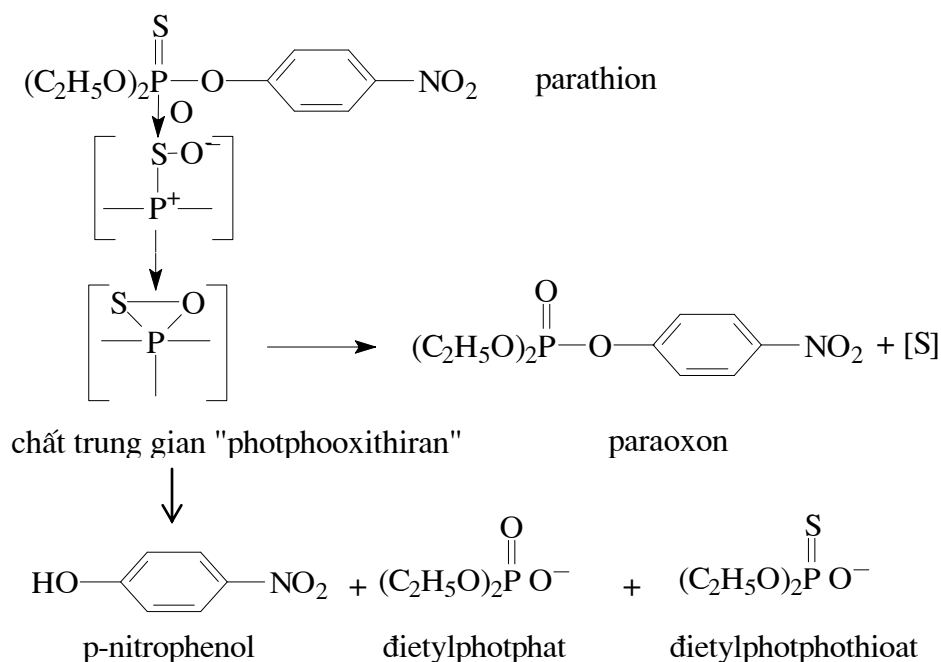


Si-đeankyl hoá. Xitocrom P-450 như được biết xúc tác cho sự demetyl hoá của octametylxiclotetrasiloxan



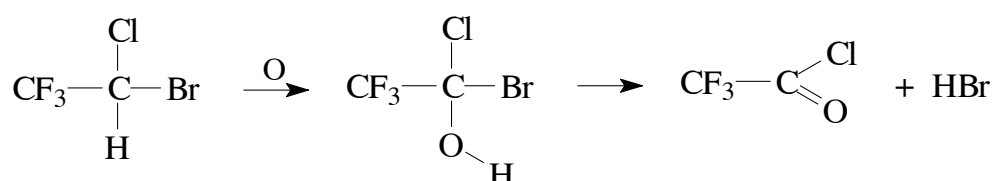
Sự chuyển nhóm oxi hoá. Xitocrom P-450 xúc tác hai loại phản ứng chuyển nhóm oxi hoá: loại lưu huỳnh oxi hoá và loại halogen oxi hoá. Trong cả hai trường hợp nguyên tử dị tố (N, S hoặc halogen) được thay thế bằng oxi.

Loại lưu huỳnh và phân giải este. Các photphothionat $(\text{R}^1\text{O})_2\text{P}(\text{S})(\text{OR}^2)$ và photphodithionat $(\text{R}^1\text{O})_2\text{P}(\text{S})(\text{SR}^2)$ hoạt tính trừ sâu của chúng và độc tính đối với người là phản ứng oxi hoá chuyển nhóm $\text{P}=\text{S}$ thành $\text{P}=\text{O}$. Đây là sự monooxi hoá điển hình của CYP- phụ thuộc, đòi hỏi có NADPH và O_2 và bị ức chế bởi CO.

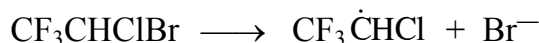
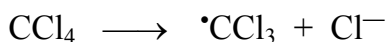


Sự loại trừ huỳnh oxi hoá của parathion bao gồm sự tạo ra sản phẩm trung gian và chuyển vị thành paraoxon hoặc phân huỷ thành p-nitrophenol, diethylphosphat và diethylphosphothioat, các sản phẩm này tương tự như các sản phẩm thủy phân của parathion. Ngoài sự làm dễ dàng thủy phân các este axit photphoric xitocrom P-450 còn xúc tác cho sự phân giải các este của axit cacboxylic (thủy phân thành axit và oxi hoá sản phẩm ancol thành andehit hoặc đêaxyl hoá).

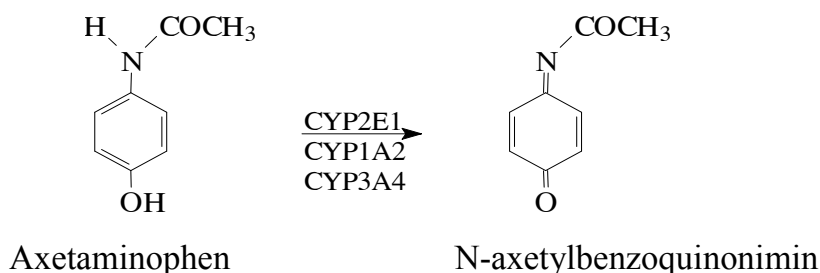
Loại halogen oxi hoá. Xitocrom P-450 xúc tác cho cả phản ứng loại halogen oxi hoá và khử hoá. Trong quá trình loại halogen oxi hoá, halogen và hiđro từ cùng nguyên tử cacbon được thay thế bằng oxi ($R^1 R^2 CHX \rightarrow R^1 R^2 CO$) để tạo ra andehit hoặc axylhalua. Ví dụ :

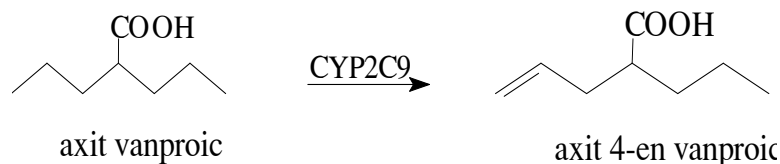


Xitocrom P-450 cũng có thể xúc tác sự loại halogen khử hoá các haloankan và khử hoá một số hợp chất chứa nitro và azo. Điều này có thể hiểu được từ chu trình xúc tác (hình 3.1). Sự liên kết của cơ chất vào xitocrom P-450 được tiếp tục bởi sự khử một electron nhờ NADPH – xitocrom P-450 reductaza. Dưới điều kiện ưa khí, sự khử sắt hem (Fe^{3+}) đến trạng thái sắt (II) cho phép liên kết oxi. Dưới điều kiện kỵ khí, ngược lại, chu trình bị ngắt tại điểm này, điều này cho phép xitocrom P-450 khử được những chất có khả năng nhận electron. Bởi vậy, xitocrom P-450 có thể xúc tác các phản ứng khử như khử nitro, khử azo và loại halogen khử hoá, đặc biệt dưới các điều kiện áp lực oxi thấp. Tính độc của nhiều haloankan phụ thuộc vào khả năng sinh chuyển hoá của chúng bởi sự loại halogen khử hoá này. Giai đoạn đầu trong loại halogen khử hoá và sự khử một electron với sự tạo gốc cacbon trung tâm độc cao và halua vô cơ. Đối với CCl_4 là gốc trichlometyl :

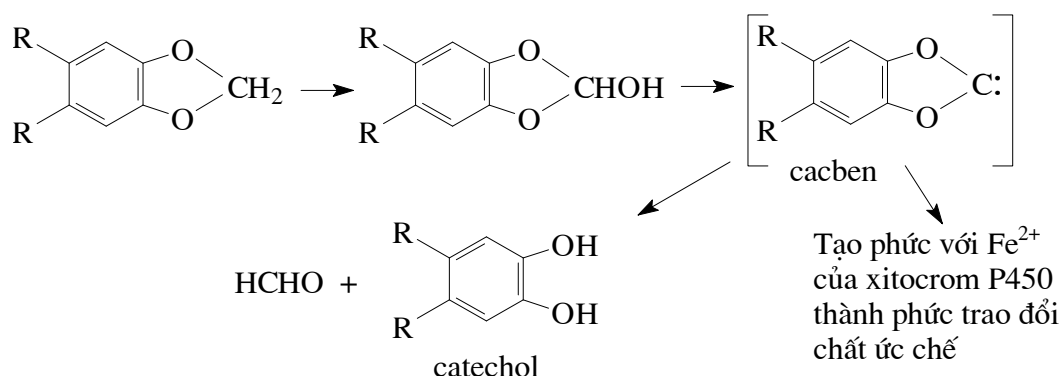


Đehiđro hoá : Xitocrom P-450 cũng có thể xúc tác cho sự đehiđro hoá (loại hiđro) của nhiều hợp chất bao gồm axetaminophen, nifeđipin, các chất liên quan đến sự khoá kênh canxi dihiđropiridin, spartein, nicotin, axit vanproic, digitoxin, testosteron. Ví dụ :





Sự phá vỡ vòng metylendioxi (benzodioxol). Các hợp chất metylendioxi – phenol như safrol hoặc chất hỗ trợ trừ sâu như piperonyl butoxit, rất nhiều trong số chúng có tác dụng ức chế sự monooxi hoá của CYP, bản thân chúng bị trao đổi chất thành các catechol. Cơ chế có thể là sự tấn công lên cacbon metylen, tiếp theo tách nước tạo cacben. Cacben hoạt động cao này phản ứng với sắt hem tạo phức CYP ức chế hoặc bị bẻ gãy thành catechol:

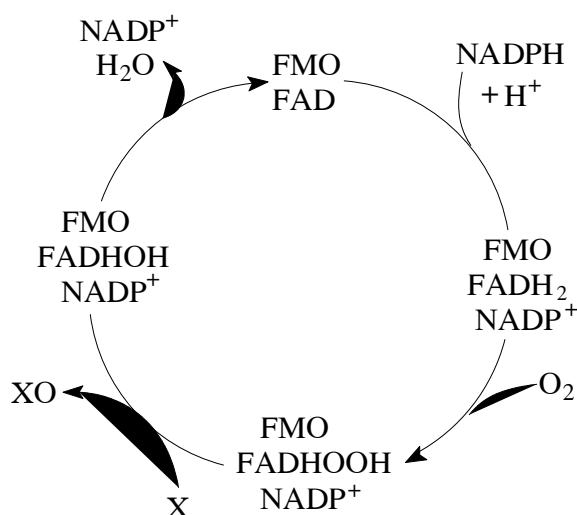


Monooxygenaza chứa flavin (FMO)

Các amin bậc ba như trimetylamin và dimetylanilin từ lâu được biết bị trao đổi chất thành các N-oxit bởi amin oxidaza vì thế mà không phụ thuộc vào CYP. Enzim này hiện nay được biết là monooxygenaza vì thể chứa flavin (FMO) và cũng phụ thuộc vào NADPH và O_2 như CYP, nhưng khác biệt về các tính chất hoá lí và tính đặc trưng cơ chất và có ít nhất sáu dạng đồng phân (FMO1 đến FMO6) đã được miêu tả bởi axit amin hoặc trình tự cADN. Mặc dù mỗi dạng đồng phân được đặc trưng ở người, một số trong chúng lại không có chức năng ở người trưởng thành. Thí dụ, FMO1 biểu hiện ở trong bào thai, mất đi tương đối nhanh sau khi sinh. FMO2 có trong hầu hết cư dân Caucasian và Asian chứa mã kết thúc sớm, cản trở sự biểu hiện của protein chức năng. FMO3 là FMO chủ yếu của người, biểu hiện ít ở người đẻ non, nhưng lại biểu hiện ở hầu hết những cá thể một tuổi. Sự biểu hiện của FMO3 tiếp tục tăng ở trẻ nhỏ và đạt mức cực đại ở trẻ trưởng thành. Một số dạng đa hình của FMO3 đảm trách bệnh chứng trimetylamin, còn gọi là “hội chứng mùi cá” được đặc trưng bởi một số cá thể không có khả năng chuyển hoá trimetylamin (từ thức ăn hoặc trao đổi chất) nặng mùi thành N-oxit không mùi. Mặc dù bản sao FMO4 đã được tìm thấy ở một số loài, protein còn chưa được biểu hiện thành công trong các loài bất kì. Mặc dù FMO5 biểu hiện ở người ở mức độ thấp, hoạt tính xúc

tác tòi của FMO5 đối với các loại cơ chất của FMO nói lên nó ít tham gia vào sự oxi hoá các chất ngoại sinh. FMO6 được phát hiện gần đây còn ít dữ liệu.

Trừ một số ít ngoại lệ, FMO tác dụng như là chất xúc tác oxi hoá electrophin. Nói chung, các sản phẩm trao đổi chất được tạo ra bởi FMO là các sản phẩm của phản ứng hoá học giữa chất ngoại sinh và peraxit hoặc peroxit, phù hợp với cơ chế xúc tác của FMO (hình 3.2). Theo cơ chế này sau khi phần FAD bị khử đến FADH₂ bởi NADPH, đồng yếu tố oxi hoá NADP⁺, nằm lại liên kết vào enzym. FADH₂ sau đó liên kết oxi tạo ra peroxit (nghĩa là 4a-hiđroperoxiflavin của FAD). Peroxit tương đối bền, có thể vì tâm hoạt động của FMO gồm các gốc axit amin ưa béo không nucleophin. Trong quá trình oxi hoá chất ngoại sinh, 4a-hiđroperoxiflavin được chuyển thành 4a-hiđroxiflavin với sự chuyển oxi peroxit flavin đến cơ chất ($X \rightarrow XO$, ở hình). Từ giai đoạn sau, ta có thể hiểu vì sao sản phẩm trao đổi chất là sản phẩm của phản ứng hoá học giữa chất ngoại sinh và peroxit hoặc peraxit. Giai đoạn cuối cùng trong chu trình xúc tác gồm sự dehiđrat hoá 4a-hiđroxiflavin



Hình 3.2

Chu trình xúc tác của flavin monooxygenaza (FMO)

X = cơ chất ngoại sinh,

XO = sản phẩm trao đổi chất,

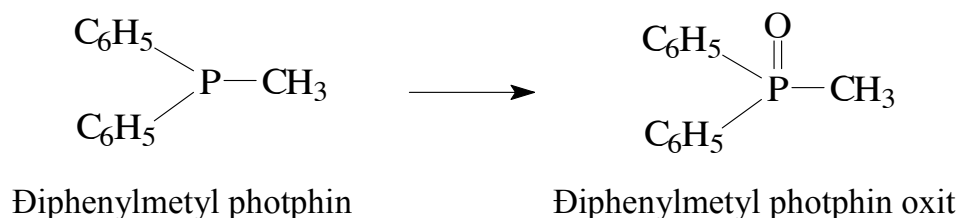
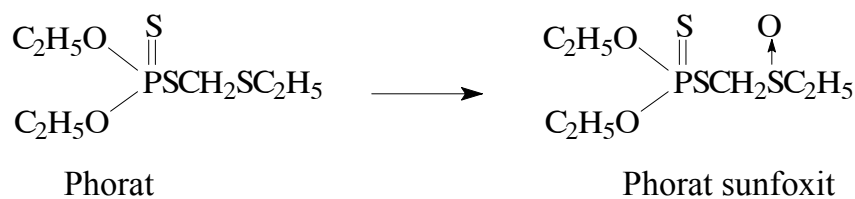
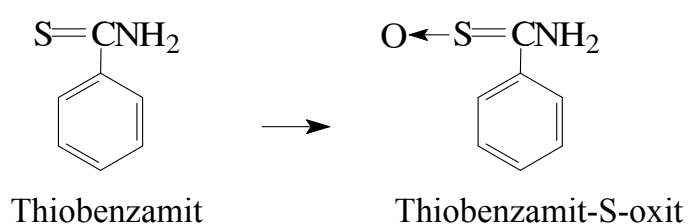
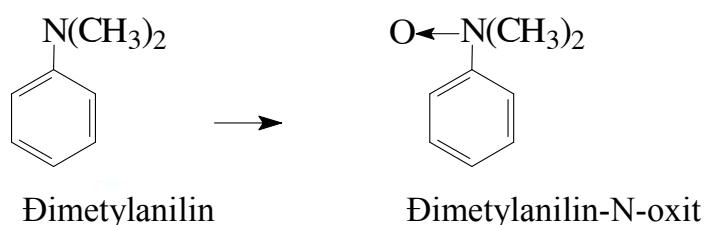
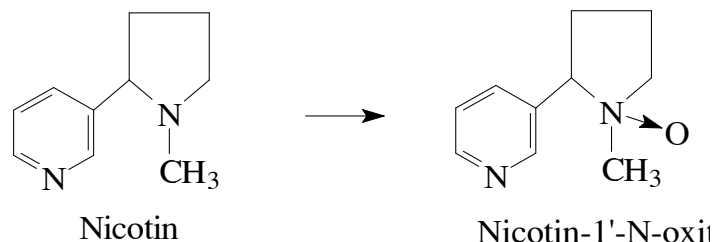
FADHOOH = 4a-hiđroperoxiflavin;

FADH-OH = 4a-hiđroxiflavin

để hoàn lại FAD ở trạng thái dừng, oxi hoá, và giải phóng NADP⁺. Giai đoạn cuối cùng là quan trọng vì có là giai đoạn quyết định tốc độ, và nó xảy ra sau sự oxi hoá cơ chất. Do vậy, giai đoạn này xác định giới hạn trên của tốc độ oxi hoá cơ chất. Tất cả các cơ chất tốt đối với FMO được chuyển hoá thành các sản phẩm ở cùng một tốc độ cực đại (nghĩa là V_{CD} được xác định bởi giai đoạn cuối cùng trong chu trình xúc tác). Sự liên kết của NADP⁺ vào FMO trong quá trình xúc tác là quan trọng vì nó cản trở sự khử của oxi đến H₂O₂. Trong sự vắng mặt của NADP⁺ liên kết, FMO có chức năng như một NADPH-oxidaza, tiêu thụ NADPH và gây ra sự căng thẳng oxi hoá qua sự dư thừa H₂O₂.

Các cơ chất chứa các nucleophin mềm (N, S, P, Se) là các ứng cử viên tốt cho sự oxi hoá của FMO: các thuốc như dimetylanilin, imipramin, thiobenzamit, clopromazin, promethazin, ximetidin, tamoxifen; thuốc trừ sâu như phorat, fonofot, methiocarb; tác

nhân môi trường như chất gây ung thư 2-aminofluorin, chất độc thần kinh nicotin và 1-metyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP). Một số chất thức ăn hoặc nội sinh cũng chịu sự trao đổi chất của FMO như trimetylamin, sisteamin, methionin và một số các liên hợp –S-sistein. Trong hầu hết các trường hợp trao đổi chất bởi FMO tạo ra các sản phẩm khử độc, mặc dù có một vài ví dụ về cơ chất bị sinh hoạt hoá bởi sự oxi hoá của FMO lại độc như trường hợp các cơ chất tham gia sự oxi hoá lưu huỳnh.



Cả hai enzym FMO và CYP là enzym vi thể đòi hỏi NADPH và oxi, đồng thời hầu hết các cơ chất của FMO cũng là cơ chất của CYP nên rất khó phân biệt enzym nào đảm trách sự oxi hoá. Tuy nhiên các FMO nói chung kém bền nhiệt, đun nóng chế phẩm vi thể lên 50°C trong 1 phút làm mất hoạt tính của FMO, trong khi đó các CYP rất ít ảnh hưởng.

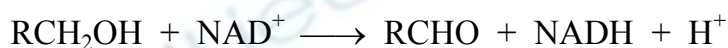
Thêm nữa, sự đóng góp của các FMO có thể được đánh giá bằng sử dụng chất ức chế chung của CYP như là N-benzylimidazol hoặc bằng kháng thể ức chế đối với NADPH – xitocrom P-450 reductaza, cần coenzim CYP.

Điều lí thú về mặt độc học là enzym FMO đảm trách sự oxi hoá nicotin thành nicotin-1'-N-oxit, trong khi sự oxi hoá nicotin thành cotinin được xúc tác bởi hai enzym tác dụng theo trật tự : CYP tiếp theo bởi andehit dehydrogenaza hoà tan.

3.1.2. Những sự oxi hoá không vi thể

Ngoài các monooxygenaza vi thể, các enzym khác tham gia vào sự oxi hoá các chất ngoại sinh. Những enzym này có ở trong ti thể hoặc trong tế bào chất.

Ancol dehydrogenaza. Ancol dehydrogenaza xúc tác cho sự chuyển hoá ancol thành andehit hoặc xeton :



Phản ứng này không lẫn lộn với sự monooxi hoá của etanol bởi CYP xảy ra trong các vi thể. Phản ứng của ancol dehydrogenaza là thuận nghịch, với các hợp chất cacbonyl bị khử thành ancol.

Enzim này được tìm thấy trong phân đoạn hoà tan của gan, thận, phổi và có khả năng là enzym quan trọng nhất trong sự trao đổi chất của các ancol ngoại. Ancol dehydrogenaza có vô số biến thể. Trong động vật có sáu loại enzym đã được mô tả. Ancol dehydrogenaza có thể sử dụng NAD hoặc NADP như là coenzim, nhưng phản ứng xảy ra chậm hơn nhiều so với NADP. Trong cơ thể còn nguyên phản ứng xảy ra theo chiều tiêu thụ ancol, vì các andehit bị oxi hoá đến axit để bài tiết. Như vậy sự oxi hoá ancol có thể được xem là một phản ứng hoạt hoá, sự oxi hoá xa hơn đến axit là giai đoạn khử độc.

Ancol bậc nhất bị oxi hoá đến andehit, n-butanol là cơ chất bị oxi hoá ở tốc độ cao. Ancol bậc hai bị oxi hoá đến xeton, tốc độ chậm. Ancol bậc ba không dễ bị oxi hoá.

Ancol dehydrogenaza bị ức chế bởi nhiều hợp chất dị vòng như pyrazol, imidazol và các dẫn xuất của chúng.

Andehit dehydrogenaza. Các andehit được sinh ra từ các cơ chất nội và ngoại. Các andehit nội sinh được hình thành từ sự trao đổi chất của các axit amin, cacbohidrat, lipid, amin sinh vật, vitamin, steroid. Sự trao đổi chất của các thuốc, các tác nhân môi trường tạo ra các andehit. Các andehit là các hợp chất electrophin hoạt tính cao, chúng phản ứng với các thiol và các nhóm amin tạo ra những ảnh hưởng khác nhau. Một số andehit tạo ra các ảnh hưởng nhẹ nhàng, nhưng thường nhiều hơn là các ảnh hưởng độc tế bào, độc gen, dị biến và ung thư. Andehit dehydrogenaza là enzym quan trọng giúp làm dịu các ảnh hưởng

độc của sự sinh ra andehit. Enzim này xúc tác sự hình thành các axit từ các andehit béo và thơm; các axit là những cơ chất sẵn sàng phản ứng đối với các enzim liên hợp:

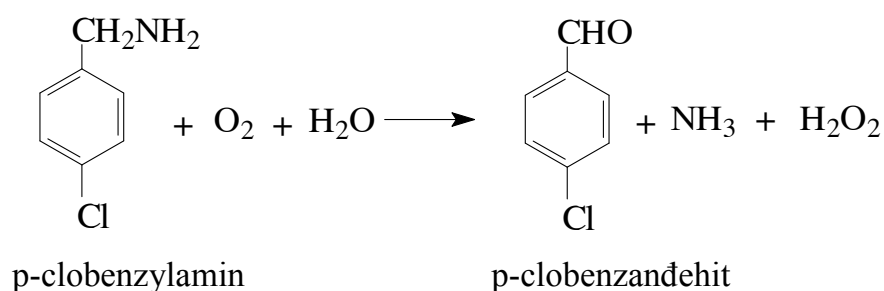


Siêu họ gen andehit rất lớn có trên 330 andehit hydrogênaza gen trong các loài nhân sơ và nhân chuẩn. Siêu họ gen andehit dehydrogênaza nhân chuẩn gồm 20 họ gen, 9 trong số họ đó chứa 16 gen người và 3 giả gen.

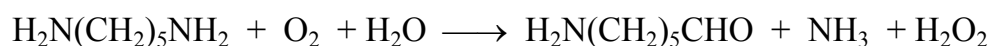
Các enzim khác có trong phân đoạn tan của gan oxi hoá các andehit là andehit oxidaza và xanthin oxidaza, cả hai flavoprotein này có chứa molipđen; tuy nhiên vai trò chủ yếu của chúng là oxi hoá các andehit nội sinh tạo ra từ các phản ứng deamin hoá.

Amin oxidaza. Chức năng quan trọng nhất của amin oxidaza là oxi hoá các amin tạo ra trong các quá trình bình thường. Hai loại amin oxidaza deamin oxi hoá quan trọng đối với cả các amin nội sinh và ngoại sinh là:

Monoamin oxidaza — Monoamin oxidaza là họ flavoprotein tìm thấy trong ti thể của nhiều mô: gan, thận, não, ruột non và tiểu cầu máu. Chúng là nhóm các enzim tương tự có những tính đặc trưng và sự ức chế trùng lặp nhau. Mặc dù enzim trong hệ thần kinh trung ương chủ yếu liên quan với sự luân chuyển truyền thần kinh, trong khi ở gan lại deamin hoá các amin bậc một, bậc hai và bậc ba béo, tốc độ phản ứng của amin bậc nhất nhanh hơn cả. Các nhóm thế hút $\bar{e}$ trên nhân thơm làm tăng tốc độ phản ứng, trong khi các hợp chất có nhóm metyl ở cacbon α như amphetamin và ephedrin lại không bị trao đổi chất.

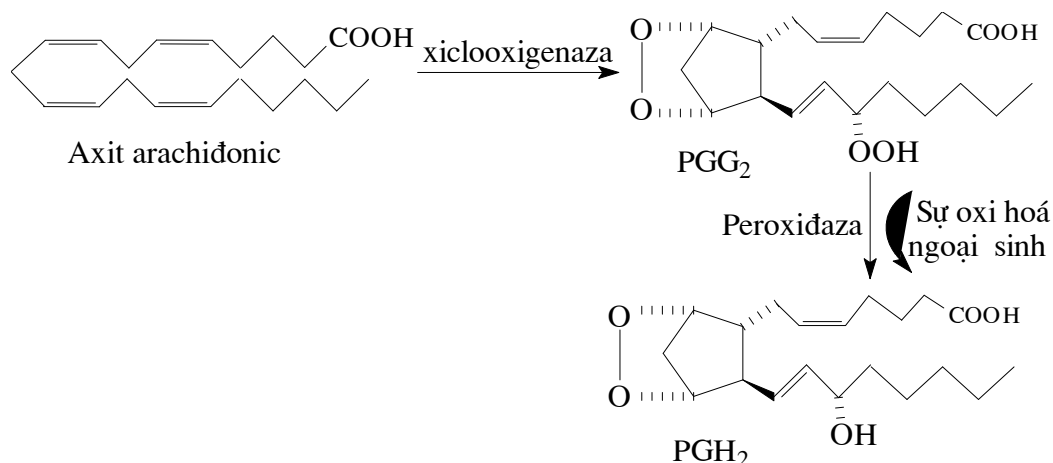


Điamin oxidaza - Điamin oxidaza là enzim oxi hoá các amin đến andehit. Cơ chất thích hợp là các điamin béo có chiều dài mạch bốn (putretxin) hoặc năm (cadaverin) nguyên tử cacbon. Các điamin với mạch cacbon dài hơn chín không được xem là cơ chất nhưng có thể bị oxi hoá bởi các monoamin oxidaza. Các amin bậc hai và bậc ba không bị trao đổi chất. Các điamin oxidaza điển hình là các protein tan chứa pyridoxal photphat cũng như chứa đồng. Chúng được tìm thấy trong đa số các mô bao gồm gan, ruột non, thận và nhau.



Đồng oxi hoá bởi xicloooxygenaza

Trong quá trình sinh tổng hợp prostaglandin, axit béo đa chưa no như axit arachidonic đầu tiên bị oxi hoá đến hidroperoxi andoperoxit (prostaglandin G₂). Chất này sau đó bị trao đổi chất tiếp thành prostaglandin H₂, cả hai phản ứng được xúc tác bởi cùng một enzym, xicloooxygenaza, như được biết là prostaglandin synthaza.



Enzim này có trong màng vi thể và được tìm thấy ở mức độ lớn nhất ở các mô hô hấp như phổi. Nó nói chung cũng có ở thận và túi tinh. Nó là glycoprotein có $M \approx 70.000$ Đanton có chứa một hem trên một đơn vị phụ. Trong quá trình giai đoạn hai của chuỗi liên tiếp trên (peroxidaza) nhiều chất ngoại sinh bị đồng oxi hoá, và sự nghiên cứu về cơ chế đã chỉ ra rằng các phản ứng là các phản ứng hidroperoxit phụ thuộc được xúc tác bởi peroxidaza, enzym này sử dụng prostaglandin G làm cơ chất. Trong ít nhất một số trường hợp sự nhận biết peroxidaza này được xác định là prostaglandin synthaza.

Các xicloooxygenaza được biết có hai dạng khác nhau. COX-1 là enzym chủ yếu biểu hiện tính giữ nhà được tìm thấy trong hầu hết các mô và điều dẫn các đáp ứng sinh lý. COX-2 là dạng cảm ứng biểu hiện chủ yếu bởi các tế bào tham gia vào đáp ứng (viêm). Một số mô thấp trong biểu hiện CYP lại giàu trong COX, cái đó có ý nghĩa trong các hiệu ứng gây ung thư của các amin thơm trong các cơ quan này.

Trong quá trình đồng oxi hoá, một số cơ chất được hoạt hoá trở thành độc hơn so với chúng ban đầu. Trong một số trường hợp sự oxi hoá cơ chất tạo ra sản phẩm gốc tự do, chúng có thể khơi mào sự peroxi hoá lipid hoặc liên kết vào protein tế bào hoặc ADN. Con đường hoạt hoá khác tham gia vào sự tạo thành gốc peroxy từ sự trao đổi chất kế tiếp prostaglandin G₂. Phân tử hoạt động này có thể epoxi hoá nhiều cơ chất bao gồm các PAH, nói chung tạo ra độc tính tăng lên của các cơ chất tương ứng.