

# Posljednja karika u biotransformaciji acetilsalicilne kiseline: Nove spoznaje o metabolizmu

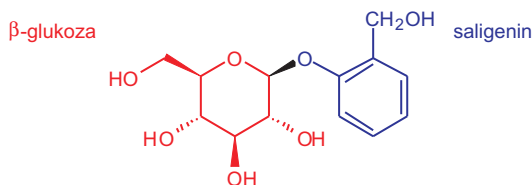
MIRZA BOJIĆ

Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,  
Zavod za farmaceutsku kemiju, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

## UVOD

Najraniji pisani tragovi o primjeni salicilata sežu gotovo četiri tisućljeća u prošlost. Primjena infuza od sušenih listova mrče (*Myrtus* sp., Mirtaceae) zabilježena je na Ebersovom papirusu (Egipat). U Europi je kao izvor salicilata služila kora bijele vrbe (*Salix alba* L., Salicaceae). Prvo kliničko ispitivanje u svijetu provedeno 1763., upravo na kori vrbe potvrdilo je antipiretski učinak salicilata (1).

Godine 1828. izoliran je salicin (slika 1.) iz kore bijele vrbe, a deset godina poslije utvrđen je njegov glikozidni karakter pri čemu je saligenin (alkohol) preveden u salicilnu kiselinu. Godine 1853. C. F. Gerhardt uspio je acetilirati salicilnu kiselinu s acetil-kloridom – rođena je acetilsalicilna kiselina. No, preparat nije bio odgovarajuće čistoće što se očitovalo fizičko-kemijskom nestabilnošću (1).



Slika 1. Kemijska struktura salicina.

H. Kolbe bio je začetnik industrijske sinteze salicilne kiseline, a potražnja za salicilnom kiselinom je rasla zbog pozitivnog učinka na reumatoidne bolove, glavobolje i migrene. Salicilna kiselina u svojoj strukturi ima dvije kisele skupine, karboksilnu i fenolnu, koje djeluju kaustično pa je potraga za sigurnijim lijekom nastavljena. Godine 1897. F. Hoffmann sintetizirao je acetilsalicilnu kiselinu acetilacijom salicilne

kiseline u suvišku anhidrida octene kiseline. Čistoću je potvrdio reakcijom sa željezovim(III) kloridom (1).

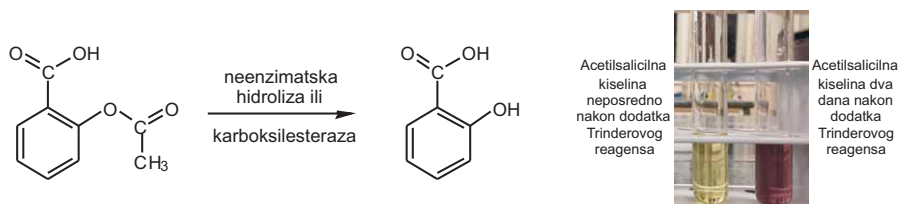
Danas je acetilsalicilna kiselina jedan od najprimjenjivanih lijekova. Istraživanje u SAD-u je pokazalo da svaka peta osoba koristi acetilsalicilnu kiselinu. S godinama se učestalost primjene povećava: svaka druga osoba starija od 65 godina upotrebljava acetilsalicilnu kiselinu (2).

Acetilsalicilna kiselina je također jedan od najistraživanijih lijekova. Svake godine objavi se više od dvije tisuće radova vezanih uz acetilsalicilnu kiselinu (3). No, jesmo li spoznali sve? U potrazi za novim indikacijama, trenutno su aktivne 233 kliničke studije vezane uz aspirin, a uključuju potencijalnu primjenu aspirina u terapiji raka pluća, raka prostate, hernije, tuberkuloznog meningitisa, preklampsije i drugih bolesti (4).

U području metabolizma acetilsalicilne kiseline, glavne metaboličke reakcije (hidroliza, konjugacija s glicinom i glukuronidacija) uveliko su istražene, no oksidacija je ostala dugo nepoznanica. U nastavku će biti opisani glavni biotransformacijski putovi (acetil)salicilne kiseline, s posebnim osvrtom na aromatsku hidroksilaciju.

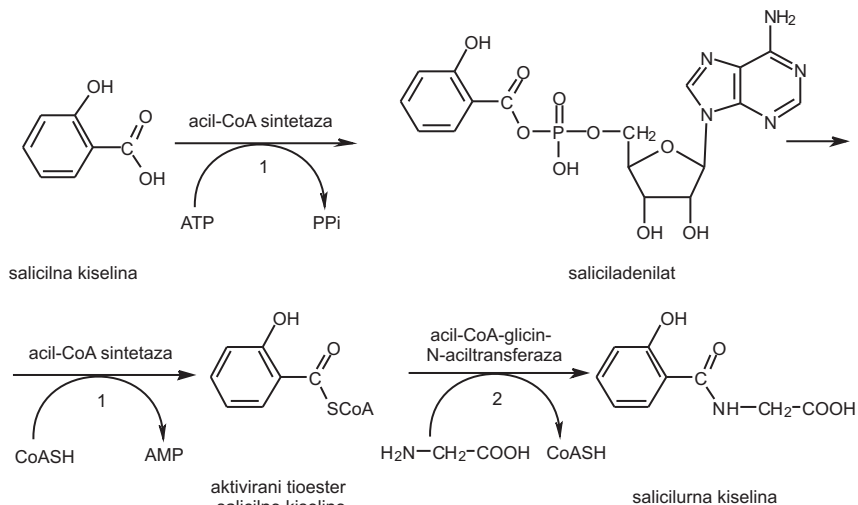
### Metabolizam (acetil)salicilne kiseline

Acetilsalicilna kiselina je ester salicilne kiseline i podložna je reakciji hidrolize. Hidroliza može biti spontana, posebice u kiselom mediju želuca ili katalizirana hidrolazama – karboksilesteraze (CES). O spontanosti reakcije hidrolize potvrđuje i eksperiment u kojem se acetilsalicilna kiselina inkubira s Trinderovim reagensom (kisela otopina željezova(III) klorida). Na početku je otopina žute boje, a oslobađanjem salicilne kiseline nastaje kompleks s feri ionima koji je ljubičasto obojen (slika 2.).



Slika 2. Hidroliza acetilsalicilne kiseline i njezino praćenje s Trinderovim reagensom.

Salicilna kiselina je dalje podložna reakcijama konjugacije s glicinom ili glukuronidacije. Konjugacija s glicinom odvija se u dva koraka (slika 3.). Prvi korak je kataliziran acil-CoA sintetazom srednjelančanih masnih kiselina koja djeluje kao ligaza salicilne kiseline i koenzima A. Za nastajanje tioesterske veze potrebna je prethodna aktivacija karboksilne skupine prevođenjem u anhidrid s ATP-om. Drugi korak je konjugacija aktiviranog oblika salicilne kiseline s glicinom uz enzim acil-CoA-aminokiselinska N-aciltransferaza (glicin-N-aciltransferaza, GLYAT) (5–7).

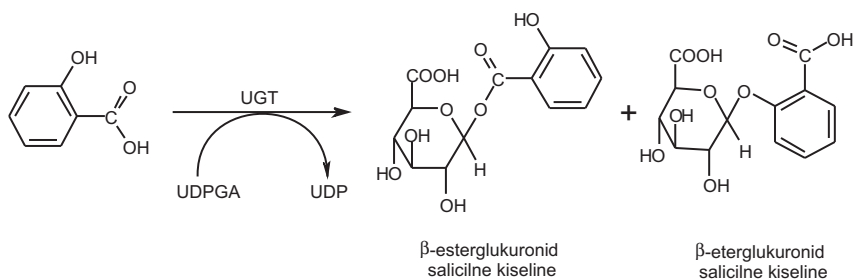


**Slika 3.** Konjugacija salicilne kiseline s glicinom.

Salicilurna kiselina je glavni metabolit pri normalnom režimu doziranja (2 tablete od 300 mg) i njezin udio u odnosu na ukupne salicilate izlučene urinom iznosi oko 75 %. 10 % primijenjene doze izlučuje se u obliku nekonjugirane salicilne kiseline (8). Ako dođe do predoziranja, udio salicilurne kiseline zbog zasićenosti enzima koji sudjeluju u reakcijama konjugacije s glicinom, opada na 30 %. Pri tome raste udio eliminirane slobodne salicilne kiseline (34 %) (9).

Udio glukuronida u ukupnom metabolizmu salicilne kiseline izrazito je varijabilan, a kreće se u rasponu od 0,8 % do 42 % od primijenjene doze (10). Načelno, s porastom doze raste i udio izlučenih glukuronida. Kako salicilna kiselina uz karboksilnu skupinu posjeduje i fenolnu, a obje su podložne reakcijama glukuronidacije, konačni produkti su ester i eter glukuronid salicilne kiseline (slika 4.). Reakcije konjugacije kataliziraju enzimi uridindifosfo-glukuronoziltransferaze (UGT).

Salicilna kiselina, ali i njezini hidroksilirani metaboliti I. faze biotransformacije podložni su reakcijama konjugacije s glukuronskom kiselinom, pri čemu mogu



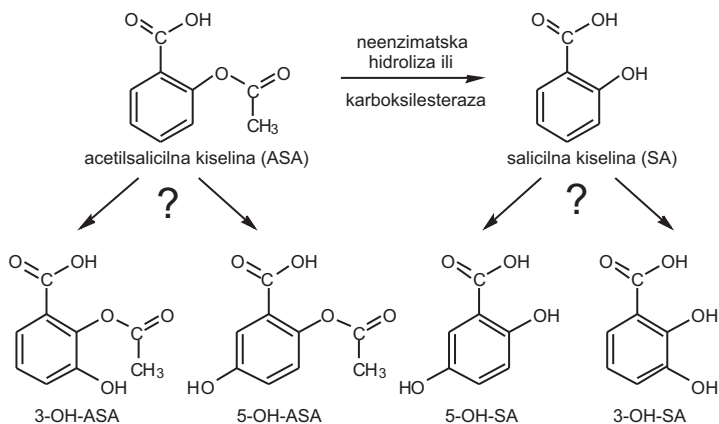
**Slika 4.** Reakcije glukuronidacije salicilne kiseline.

nastati gentizinska kiselina i njezini glukuronidi, odnosno dvostruki konjugati salicilne kiseline – acil (ester) glukuronid salicilurne kiseline. Udio ovih metabolita u ukupnom metabolizmu acetilsalicilne kiseline je do 3 %.

Zanimljivo je da glukuronidacija salicilne kiseline nije specifična za pojedine uridindifosfo-glukuronoziltransferaze. U tim reakcijama glukuronidacije sudjeluje niz enzima: UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B4, i UGT2B7 (11).

### Aromatska hidroksilacija salicilne kiseline

Iako je gentizinska kiselina izolirana u urinu zdravih dobrovoljaca u količinama od 1–3 % primijenjene doze, mehanizam i slijed hidroksilacija nije bio poznat (10). Mala izlučena koncentracija hidroksiliranih metabolita salicilne kiseline upućuje na sporu reakciju biotransformacije. Osnovno je pitanje, u proučavanju aromatske hidroksilacije, koji su enzimi odgovorni za reakcije biotransformacije. Na temelju pokusa s animalnim jetrenim mikrosomima pretpostavljeno je da u reakcijama hidroksilacije sudjeluju citokromi P450, iako su neka istraživanja ukazivala i na mogućnost neenzimatske hidroksilacije kao posljedice Fentonove reakcije. Jedno od temeljnih načela biotransformacije je prevođenje lipofilnih supstancija u hidrofilne pogodne za eliminaciju iz organizma (12), što je nametnulo sljedeće pitanje – je li acetilsalicilna kiselina bolji supstrat za aromatsku hidroksilaciju u odnosu na hidrofilniju salicilnu kiselinu (slika 5.).



**Slika 5.** Reakcije aromatske hidroksilacije acetilsalicilne i salicilne kiseline.

Glavni je tehnički problem u proučavanju aromatske hidroksilacije detekcija hidroksiliranih metabolita zbog nedovoljne osjetljivosti dostupnih analitičkih metoda. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta UV-Vis detektorom, koja je uveliko dostupna, nije dovoljno osjetljiva za detekciju pikomolnih količina hidrok-

siliranih produkata. Kako salicilna kiselina posjeduje dvije skupine podložne ionizaciji, karboksilnu i fenolnu, mogla bi se primijeniti detekcija spektrometrijom masa. No, ionizacija nederivatiziranih metabolita je iznimno niska, a čak i s derivatizacijom primjenjiva je isključivo za kvalitativnu analizu. Derivatizacijom s diazometanom (reagira s karboksilnom skupinom) dokazana je produkcija 3- i 5-hidroksi(acetil)salicilne kiseline (13).

S kemijske strane, problem praćenja hidroksilacije je i Fentonova kemija prema kojoj bi hidroksilirani metaboliti mogli nastati i neenzimatski. Ako je slobodno željezo prisutno u otopini, može doći do produkcije snažnih slobodnih radikala kao što je hidroksilradikal koji dalje hidroksilira salicilnu kiselinu (14). Učinak Fentonove kemije može se ukloniti primjenom ionskih izmjenjivačkih smola za izmjenu željeza i/ili primjenom kelatora željeza kao što je deferoksamin. Na taj se način pokazalo da 3- i 5-hidroksi(acetil)salicilna kiselina nastaje enzimatski djelovanjem citokroma (13).

Citokromi P450 koji kataliziraju aromatsku hidroksilaciju određeni su primjenom specifičnih inhibitora citokroma humanih jetrenih mikrosoma (12,13). Iako je acetilsalicilna kiselina lipofilniji supstrat od salicilne kiseline, hidroksilacija se primarno događa na salicilnoj kiselini. Primarno se aromatska hidroksilacija odvija na položaju 5 benzenske jezgre salicilne kiseline i kataliziraju je CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 i CYP2E1. Hidroksilaciju na položaju 3 kataliziraju CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP2E1 (13). I u slučaju 3- i u slučaju 5-hidroksilacije, najizraženiju enzimsku aktivnost pokazuje CYP2E1, što je i očekivano, jer ovaj enzim katalizira metabolizam velikog broja manjih molekula, npr. etanola i toluena. No, brzina reakcije je iznimno niska (8 pmol/nmol CYP2E1/min) u usporedbi s brzinom 6 $\beta$ -hidroksilacije testosterona (160.000 pmol/nmol CYP3A4/min). Kao i u slučaju glukuronidacije salicilne kiseline, tako je i hidroksilacija katalizirana relativno velikim brojem enzima (11), a u ovu biotransformaciju su uključeni citokromi P450 koji metaboliziraju većinu ksenobiotika, odnosno pokazuju najveći promiskuitet prema supstratima (15). Svi dobiveni rezultati potvrđeni su i na rekombinantnim enzimskim sustavima (13).

## ZAKLJUČAK

Salicilna kiselina u različitim oblicima (salicin, saligenin, salicilna kiselina, natrijev salicilat) obilježila je pojedine epohe ljudske civilizacije (Egipat, Antička Grčka, Europa). Sintezom je acetilsalicilna kiselina postala zlatni standard u terapiji boli, povišene temperature i upala. Renesansu je doživjela sredinom prošlog stoljeća otkrićem antitrombotnog djelovanja (16). Iako mala molekula, slika sheme biotransformacije (acetil)salicilne kiseline sporo se popunjavala. Farmakokinetika vezana uz nastanak glavnog metabolita – salicilurne kiseline opisana je 1970-tih. Prije desetak godina opisani su enzimi koji sudjeluju u reakcijama glukuronidacije, a tek ove godine

shema biotransformacije je kompletirana dodatkom humanih jetrenih enzima citokroma P450 koji sudjeluju u reakcijama aromatske hidroksilacije salicilne kiseline (13).

## The last puzzle in acetylsalicylic acid biotransformation: New achievements in metabolism

by M. Bojić

### Abstract

The history of salicylates began four millennia ago. Salicylates were used for centuries in the form of a herbal drug – willow bark. Isolation of salicin started in 1829, followed by the first synthesis in 1857. It took four decades to find the acetylated form of salicylic acid that could be obtained as a pure substance. Aspirin was born in 1897.

Salicylates were unique drugs in many ways. The first clinical trial was conducted in 1763 and confirmed the antipyretic activity of willow bark. In 1899, clinical trials confirmed the beneficial effects of aspirin, granting aspirin the status of a panacea (universal remedy).

Owing to its analgesic, antipyretic, anti-inflammatory and antithrombotic properties, aspirin is one of the most widely used drugs today. Every fifth adult takes aspirin on a daily basis, and every second person aged 65 and above. The metabolism of aspirin is revisited in this paper, highlighting the latest achievements in researching its metabolic fate. Hydrolysis, glucuronidation and glycine conjugation, as major metabolic reactions, are covered accompanied with the minor metabolic pathway of aromatic hydroxylation. Addition of human cytochromes P450 completes the biotransformation scheme of (acetyl)salicylic acid.

1. Soni A. Aspirin use among the adult U.S. non institutionalized population, with and without indicators of heart disease. Medical Expenditure Panel Survey, Statistical Brief #129, Agency for Healthcare Research and Quality, 2005.
2. Goldberg DR. Aspirin: Turn of the Century Miracle Drug. Chemical Heritage Magazine. 2009; 27:1–4.
3. US National Library of Medicine, National Institutes of Health. [www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov)
4. US National Library of Medicine, National Institutes of Health. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)
5. Vessey DA, Lau E, Kelley M, Warren RS. Isolation, sequencing, and expression of a cDNA for the HXM-A form of xenobiotic/medium-chain fatty acid: CoA ligase from human liver mitochondria. J Biochem Mol Toxicol. 2003; 17:1–6.
6. Mawal YR, Qureshi IA. Purification to homogeneity of mitochondrial acyl coa: glycine N-acyltransferase from human liver. Biochem Biophys Res Commun. 1994; 205:73–79.
7. Campbell L, Wilson HK, Samuel AM, Gompertz D. Interactions of m-xylene and aspirin metabolism in man. Br J Ind Med. 1988; 45:127–132.

8. Patel DK, Hesse A, Ogunbona A, Notarianni LJ, Bennett PN. Metabolism of aspirin after therapeutic and toxic doses. *Hum Exp Toxicol.* 1990; 9:131–136.
9. Patel DK, Notarianni LJ, Bennett PN. Comparative metabolism of high doses of aspirin in man and rat. *Xenobiotica.* 1990; 20:847–854.
10. Hutt AJ, Caldwell J, Smith RL. The metabolism of aspirin in man: a population study. *Xenobiotica.* 1986; 16:239–249.
11. Kuehl GE, Bigler J, Potter JD, Lampe JW. Glucuronidation of the aspirin metabolite salicylic acid by expressed UDP-glucuronosyltransferases and human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2006; 34:199–202.
12. Bojić M. Predklinička ispitivanja inhibicijskog i interakcijskog potencijala novih lijekova na razini citokroma P450. *Farm glas.* 2015; 71:229–242.
13. Bojić M, Sedgeman CA, Nagy LD, Guengerich FP. Aromatic hydroxylation of salicylic acid and aspirin by human cytochromes P450. *Eur J Pharm Sci.* 2015; 73:49–56.
14. Ingelman-Sundberg M, Kaur H, Terelius Y, Persson JO, Halliwell B. Hydroxylation of salicylate by microsomal fractions and cytochrome P-450. Lack of production of 2,3-dihydroxybenzoate unless hydroxyl radical formation is permitted. *Biochem J.* 1991; 276:753–757.
15. Rendić SP, Guengerich FP. Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Chemicals. *Chem Res Toxicol.* 2015; 28:38–42.
16. Miner J, Hoffhines A. The discovery of aspirin's antithrombotic effects. *Tex Heart Inst J.* 2007; 34:179–186.

*Primljeno 4. svibnja 2015.*