

# **Fenobarbitál és dexametazon együttes hatása a mikroszómális citokróm P450 enzimekre**

Monostory Katalin

Magyar Tudományos Akadémia  
Központi Kémiai Kutató Intézet  
Farmakobiokémiai Osztály

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Budapest, 1994

**'I have yet to see any problem, however complicated, which, when you looked at in the right way, did not become still more complicated.'**

**(Paul Anderson, New Scientist, 1969)**

## TARTALOM

<b>1. BEVEZETÉS</b>	6
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	8
2.1. A citokróm P450 enzimek szerkezete	8
2.2. A citokróm P450 enzimaktivitás biokémiai mechanizmusa	10
2.3. A citokróm P450 enzimek indukciója	12
2.3.1. "MC-típusú" indukció (CYP1A)	15
2.3.2. "PB-típusú" indukció (CYP2B)	17
2.3.3. "Etanol típusú" indukció (CYP2E1)	19
2.3.4. "PCN / glukokortikoid típusú" indukció (CYP3A)	21
2.4. Az indukció néhány gyakorlati vonatkozása	25
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK</b>	28
<b>4. ANYAGOK és VIZSGÁLATI MÓDSZEREK</b>	30
4.1. Vegyszerek	30
4.2. Az állatok kezelése	30
4.3. Mikroszóma preparálás	33
4.4. Specifikus citokróm P450 enzimreakciók	34
4.5. p-Nitrofenol hidroxiláz aktivitás gátlása	36
4.5.1. Szénmonoxiddal	36
4.5.2. Kémiai gátlószerekkel: 3-amino-1,2,4-triazollal	36
4.5.3. Specifikus ellenanyaggal	37
4.6. Statisztikai analízis	37
4.7. A mikroszóma preparátumok poliakrilamid gélelektroforézise	37
4.8. A mikroszóma preparátumok <i>Western blot</i> analízise	38

<b>5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK</b>	<b>40</b>
5.1. A fenobarbitál + dexametazon kezelés okozta citokróm P450 enzimaktivitás változások	40
5.2. A fenobarbitál + dexametazonnal indukálható p-nitrofenol hidroxiláz enzim tulajdonságainak meghatározása	48
5.2.1. Az enzim aktivitásának gátlása szénmonoxiddal	48
5.2.2. Az enzim elektroforetikus tulajdonságainak és molekula- tömegének meghatározása	50
5.2.3. A CYP2E1 specifikus aktivitásainak meghatározása	54
5.2.4. p-Nitrofenol hidroxiláz aktivitás gátlása 3-amino-1,2,4-triazollal	57
5.2.5. p-Nitrofenol hidroxiláz aktivitás gátlása anti CYP2E1 IgG-vel	59
5.2.6. Western blot analízis	61
5.3. Az indukció mechanizmusának tanulmányozása	63
5.4. Fenobarbitál + dexametazon kezelés hatása nőstény patkányok máj mikroszómális aktivitására	65
5.5. Egyéb CYP3A induktorokkal végzett kettős indukciós vizsgálatok	70
5.5.1. Flumecinol (Zixoryn®) + dexametazon hatására bekövetkező indukció	70
5.6. Összegzés	76
5.7. Summary	78
<b>6. IRODALOMJEGYZÉK</b>	<b>80</b>

Alkalmazott rövidítések:

Ah	aromás szénhidrogén ('aromatic hydrocarbon')
MC	3-metilkolantrén
PB	fenobarbitál
PCN	pregnenolon 16 $\alpha$ -karbonitril
DXM	dexametazon
IS	isoniazid
ZX	flumecinol (Zixoryn®)

## 1. BEVEZETÉS

Az élő szervezetekbe nap mint nap számtalan, kémiai szerkezetét tekintve igen eltérő vegyület kerülhet. Az egyed túlélése, valamint az evolúció szempontjából létfontosságú az idegen anyagok - xenobiotikumok - lebontása és eltávolítása, amely a környezethez való alkalmazkodás egyik jelentős összetevője. Minden élőlényben kifejlődött olyan biokémiai mechanizmus, amely védelmet jelenthet a szervezetbe jutó kémiai anyagok káros hatásával szemben.

A citokróm P450 enzimeknek központi jelentősége van a xenobiotikumokra adott válaszreakció kialakulásában, mivel ezeket a főként apoláros vegyületeket (gyógyszereket, növényvédőszereket, tartósítószereket, káros környezeti anyagokat) oxidálják, polárosabbá alakítják, így azok közvetlenül vagy konjugációs folyamatok után kiüríthetővé válnak [1]. Az egyes citokróm P450 enzimek jelenlétét, mennyiségi megoszlását, aktivitását a genetikai háttér mellett több tényező is befolyásolja (hormonális állapot, dohányzás, alkohol fogyasztás, táplálék összetétele, betegségek, gyógyszeres kezelés, vagy éppen a környezeti ártalmak), amelyek relatív szerepe a citokróm P450 enzimek illetve gének szabályozásában meghatározza a méregtelenítő folyamat kimenetelét.

Az utóbbi évek citokróm P450 kutatásának jelentős hányada az említett tényezők hatására létrejövő szabályozó mechanizmusok feltárására irányul. A biokémiai és molekuláris biológiai technikák fejlődése lehetővé tette számos citokróm P450 enzimfehérje illetve gén szerkezetének meghatározását, valamint a szabályozás

mechanizmusának jobb megértését. A doktori értekezés alapjául szolgáló munka ezekhez a kutatásokhoz kíván csatlakozni, vizsgálva a gyógyszer-lebontásban (metabolizmusban) szerepet játszó citokróm P450 enzimek indukcióját két induktor vegyület együttes alkalmazása esetén.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A citokróm P450 monooxygenázok katalitikusan talán a legsokoldalúbb enzimek, amelyek az összes eddig tanulmányozott állat-, növény-, gomba- illetve baktériumfajban kimutathatók [2]. Emlősökben legnagyobb mennyiségben a májban fordulnak elő, de egyéb szervekben: a tüdőben, a mellékvesében, a vékonybélben, a bőrben és az agyban is jelen vannak [3, 4]. Az eukarióta citokróm P450 rendszer a sejtben az endoplazmás retikulum, a sejtmag és a mitokondrium membránjában található [5, 6].

### 2.1. A citokróm P450 enzimek szerkezete

A citokróm P450 elnevezés abból adódik, hogy a redukált állapotú hem-tartalmú enzim szénmonoxiddal képzett komplexe 450 nm-nél abszorpciós maximumot mutat [7, 8]. A vas(II)-karbonil komplex említett spektrális sajátága eltér a tipikus hem-tartalmú fehérjéktől (pl. mioglobintól), mert a citokróm P450 enzim aktív helyét képviselő vas-protoporfirin-IX gyűrűt a hisztidin nitrogénje helyett egy cisztein kén atomja kapcsolja a fehérjéhez [9].

A citokróm P450 enzimfehérjék molekulatömegét az elektroforézis vizsgálatok alapján 50.000-60.000 daltonra becsülik. Több, mint 160 enzim primer szerkezete ismert, az aminosav analízis szerint 490-560 aminosav alkotja a citokróm P450 proteineket [10, 11]. Az összehasonlító vizsgálatok alapján a citokróm P450



polipeptidek elsődleges szerkezete homológiát mutat, amely három jól meghatározott helyre koncentrálódik (152. cisztein, 390. aminosav, 436. cisztein körüli régiók). Ezek a helyek fontos szerkezeti vagy katalitikus szerepet játszanak az enzim természetes állapotában; például a NADPH-citokróm-P450-reduktáz illetve a citokróm  $b_5$ , vagy az aktív centrumban lévő hem kötésében vesznek részt [12]. Az enzim aktív helye körüli peptid rész vizsgálata azt mutatta, hogy a hem kötésében potenciálisan résztvevő ciszteinek (152., 180. és 436.) közül a 152. és a 436. aminosav körüli régió szinte minden fajnál változatlanul megőrződött, feltehetően ez a terület játszik szerepet a hem kötésében. A cisztein-módosító vizsgálatok kizárták a 152. cisztein ilyen feltételezett tulajdonságát; ez a funkció a 436. ciszteinnek tulajdonítható [13], amit *Poulos* és munkatársainak röntgen kristallográfiás vizsgálatai egyértelműen igazoltak [14, 15] (az adatok nyúl CYP2B1-re vonatkoznak).

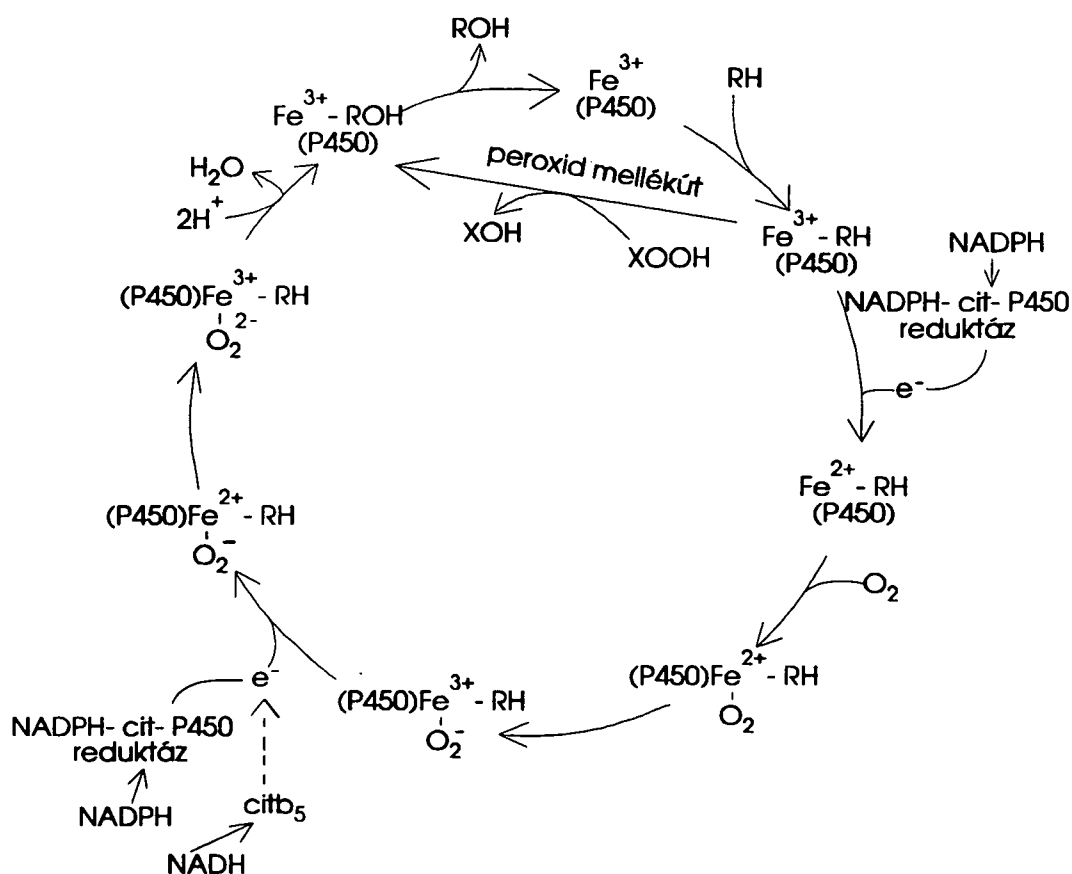
A citokróm P450 enzim membránba van ágyazva (kivéve a bakteriális citokróm P450-t). Az N-terminális végen található hidrofób rész minden mikroszómális citokróm P450 enzimmél szabadon van, ez a membránba épülés szignálpeptidje, amely nem hasítódott le az "érési folyamat" során a preproteinről. Ezt követi egy bázikus aminosavakból álló transzfer szignál. A kettő együtt alkotja a membránhoz rögzítő fehérjerészt. A 35-120 régió (Rossmann domain) valószínűleg a NADPH-citokróm-P450-reduktázhoz való kapcsolódásban vesz részt; a polipeptidlánc középső szakasza (200-300. aminosavig) a szubsztrát kötését végzi; míg a 287-307 és a 435-466 helikális peptid szakaszok szendvics-szerűen közrefogják az enzim

aktív helyén lévő hemet. Az enzim C-terminális végén lévő láncszakasz, amely az aktív helyet is tartalmazza, a citoszolba nyúlik [16-18].

## 2.2 A citokróm P450 enzimaktivitás biokémiai mechanizmusa

A citokróm P450 enzimek által katalizált különböző szubsztrát-átalakító folyamatok két alapfunkcióra vezethetők vissza. Valódi citokrómként elektrontranszportot katalizálnak, valamint monooxigenázként az elektrontranszporthoz kapcsolódva oxigénaktiválást végeznek [19].

A citokróm P450 enzim az elektrontranszportot létrehozó redukáló enzimekkel (NADPH-citokróm-P450-reduktáz, NADH-citokróm  $b_5$ -reduktáz) együtt multienzim komplexet alkot. Működéséhez molekuláris oxigénre és NADPH-ra van szükség [20]. Az enzim aktív helyén lévő protoporfirin-IX gyűrűben a vas ötös vagy hatos koordinációjú. Négy koordinációs helyet a planáris porfirin gyűrű négy nitrogénje foglalja le; ötödik ligandja a 436. cisztein aminosav tiolát anionja; míg a hatodik koordinációs helyre több ligand is szóba jöhet:  $H_2O$ ,  $O_2$ , CO, cianid. A hidrofób szubsztrát a hem közelében kötődik a fehérjéhez. A szubsztrát megkötése után az enzim aktív helyén lévő Fe(III) könnyen redukálódik. A redukcióhoz szükséges elektronok a NADPH-ról a NADPH-citokróm-P450-reduktázon keresztül jutnak el a citokróm P450-re. A vas(II)-iont tartalmazó, szubsztrátot kötött enzim aerob körülmények között gyorsan és reverzibilisen  $O_2$  molekulát köt a központi vas(II)-ionhoz. A keletkező komplex nagy elektronaffinitása miatt redukcióval



1. ábra: A citokróm P450 enzimek által katalizált reakció mechanizmusa.

Fe - az enzim aktív helyének hem-vasatomja

RH - szubsztrát

ROH - oxigenált termék

XOOH - peroxi-vegyület, amely alkalmasint O-donorként szolgálhat

stabilizálódik, újabb elektront vesz fel. A redukálást kétféle enzim végezheti. Egyik a már említett NADPH-citokróm-P450-reduktáz, a másik a NADH-citokróm b<sub>5</sub>-reduktáz. A létrejött komplex O-O kötése felhasad, egy molekula víz kilépése mellett aktív intermedier [P450(FeO)<sup>3+</sup>] jön létre, amely elvégzi a szubsztrát oxidációját. Végül az oxidált termék ledisszociál az enzimről [2, 21-23] (1. ábra).

Az 1. ábrán látható mellékút szerint a citokróm P450 enzim NADPH és  $O_2$  hiányában is képes szubsztrát-oxidációs folyamatokat katalizálni - ugyanis az  $O_2$ -t peroxidok helyettesíthetik [24].

A citokróm P450 monooxygenázok számos kémiai reakciót képesek katalizálni: hidroxilezést; N-, S- és O-dealkilezést; azocsoport, epoxidok és N-oxidok redukcióját. A szubsztrát átalakító folyamatok közös vonása, hogy a felhasznált molekuláris oxigénnek csak egyik atomja lép be a szubsztrátba, míg a másik oxigén a kísérő reakcióval vízzé alakul [25]. A mikroszómális citokróm P450 enzimek széles és átfedő szubsztrát specifitással rendelkeznek, nem specifikus enzimeknek tekinthetők, különböző mértékben képesek megkötni és oxidálni számtalan vegyületet. A szervezetbe jutott idegen vegyületek (xenobiotikumok) biotranszformációjában és így a méregtelenítő folyamatokban játszanak nagy szerepet. Néhány esetben az idegen anyag átalakítása során toxikusabb, esetleg karcinogén vagy mutagén termék jöhet létre [26].

### 2.3. A citokróm P450 enzimek indukciója

Már az 1960-as években felismerték azt a tényt, hogy a citokróm P450 enzimek mennyisége és katalitikus aktivitása egyes xenobiotikumok (induktor vegyületek) hatására megnövekszik [27]. A különböző induktor-vegyület csoportok illetve az általuk indukált citokróm P450 enzimek alapján az I. táblázatban lévő kategóriák állíthatók fel [28]. *Nebert* és munkatársai által javasolt nevezéktan szerint a *CYP* a

‘cytochrome P450’ rövidítéséből származik, ezt követő arab szám a géncsaládot, a betű az alcsaládot és egy újabb arab szám magát a gént jelöli. Két citokróm P450 enzim azonos géncsaládba sorolható, ha aminosav szekvenciájuk 40%-nál nagyobb hasonlóságot mutat. Az eddig ismert alcsaládok tagjai nem szegregálódó gének, ugyanazon kromoszómán belül egy gén csoportba (‘gene cluster’) tartoznak. Ha egy újonnan meghatározott citokróm P450 enzim csak néhány aminosavban különbözik a csoport bármelyik tagjától (az eltérés <3%), azonos elnevezést kap.

Az I. táblázat tartalmazza az egyes citokróm P450 enzimek “specifikus” reakcióit, amelyek egyszerűségüknel és gyorsaságuknál fogva jól alkalmazhatók az enzimaktivitások meghatározására. Meg kell jegyezni, hogy nem minden citokróm P450 enzim indukálható. Például a CYP2C vagy a CYP2D nem mutat indukálhatóságot egyetlen ismert induktor vegyület hatására sem [29]. A CYP2 géncsaládnak csak két tagja indukálható: a fenobarbitál (CYP2B) illetve az etanol (CYP2E1) által indukált enzimek; míg további 15 tagja nem mutatja ezt a sajátosságot. A szteroid-bioszintézisben résztvevő citokróm P450 enzimek sem adnak indukációs választ a különböző induktor xenobiotikumokra, még ha endogén anyagok képesek is az adott enzimet indukálni [30].

A legtöbb induktor szubsztrátja is annak a citokróm P450 enzimnek, amelyet indukál, ezáltal saját metabolizmusát is fokozza. Ezenkívül számos vegyület, amely a citokróm P450 enzimek induktora, hasonló hatást fejt ki a konjugációs enzimekre is (UDP-glukuronil-transzferáz [31], glutation-S-transzferáz [32]).

I. táblázat: Az indukálható citokróm P450 enzimek főbb csoportjai [28]

Citokróm P450 enzim gén nomenklatúra Nebert [28] szerint	Jellemző induktor vegyületek	Indukált specifikus enzimaktivitás
	Policiklusos aromás vegyületek ( <i>"MC-típus"</i> )	
CYP1A1	3-metilkolantrén (MC)	7-etoxi-resorufin O-dealkiláz
CYP1A2	$\beta$ -naftoflavon 2,3,7,8-tetraklorodibenzodioxin	7-etoxi-kumarin O-dealkiláz
	<i>"PB-típus"</i>	
CYP2B1	fenobarbitál (PB)	7-pentoxi-resorufin
CYP2B2	flumecinol (Zixoryn®) fenitoin	O-dealkiláz
	<i>"Etanol-típus"</i>	
CYP2E1	etanol isoniazid aceton pirazol imidazol	anilin hidroxiláz p-nitrofenol hidroxiláz nitrozo-dimetilamin N-demetiláz
	<i>"PCN / glukokortikoid típus"</i>	
CYP3A1	dexametazon	etilmorfin N-demetiláz
CYP3A2	spironolakton pregnenolon 16 $\alpha$ -karbonitril (PCN) fenobarbitál flumecinol (Zixoryn®)	aminopirin N-demetiláz

### 2.3.1. "MC-típusú" indukció (CYP1A)

Az indukciót szabályzó mechanizmusok közül a CYP1A1 gén regulációja ismert leginkább. Induktor vegyületei: policiklusos aromás szénhidrogének (pl. 3-metilkolantrén [MC],  $\beta$ -naftoflavon), valamint halogénezett aromás szénhidrogének (pl. 2,3,7,8-tetraklorodibenzodioxin). Az "MC-típusú" induktorok optimális molekuláris sajátosságai: a lipoldékonyság, a planáris szerkezet, az azonos molekulaméret ( $3\text{\AA} \times 10\text{\AA}$  vagy  $7\text{\AA} \times 14\text{\AA}$ ) valamint a megfelelő töltéeloszlás [33]. A CYP1A indukció jól nyomon követhető a 7-etoxi-resorufin O-dealkiláz [34], valamint a 7-etoxi-kumarin O-dealkiláz aktivitás [35] meghatározásával, az "MC-típusú" vegyületek által indukált citokróm P450 enzimek specifikus reakcióival.

Az induktor vegyület passzív transzport útján bejut a sejtbe, majd specifikusan kötődik a sejt Ah-receptorához, amely az Ah lókuszt génterméke [36]. A vegyület indukáló képessége arányos az Ah-receptorhoz való kötődés erősségével. Alapállapotban az Ah-receptor a hsp90 ('heat shock protein') fehérjével komplexet képez a citoszolban, amely az induktor vegyület kötődésekor felbomlik, a hsp90 ledisszociál, míg az induktor molekula az Ah-receptorral képez komplexet [37]. A kialakult komplex bejut a sejtmagba, ahol a CYP1A1 gén átíródását stimulálja [38]. Az átíródást a következő regulátor DNS-szakaszok szabályozzák:

1. transzkripciós promóter régió ('basal transcription element' - BTE), amely közvetlenül a CYP1A1 struktúrgén transzkripciós start helye mellett helyezkedik el 5' irányban;

2. egy inhibitor komponens, a promotertől néhány száz bázispár távolságra (5' irányban), amely gátolja a promoter funkciót, amennyiben hozzákötődik egy represszor fehérje, - ugyanis a transzkripció bizonyos esetekben gátlás alá kerülhet, ami egy temporális (időszakos) gén működésének eredménye. Más szóval a szükséges ligand-receptor komplex jelenlétében az adott citokróm P450 enzim termelődése csak egy meghatározott fejlődési stádiumban történhet, amikor is a promoter hely működését nem gátolja a temporális gén terméke;

3. stimulátor régiók ('xenobiotic responsive elements' - XRE), a promoter régiótól kb. 500-3500 bázispár távolságban, amelyek receptor-függő mechanizmus szerint aktiválják az átíródást. Az induktor-Ah-receptor komplex közvetlenül ide kötődik [39].

Az induktor-receptor komplex stimulátor régióhoz való kötődése a DNS meghajlását eredményezi, ezáltal *Nebert* feltételezése szerint mintegy 1000 bázispárnyi DNS szakasz hurkolódik ki ("loop-out" modell) [40]. A hurok létrejöttében fehérje természetű transz-faktor(ok) közreműködését feltételezik, amely(ek) csak az induktor-Ah-receptor komplex jelenlétében hozzák létre a stimulátor illetve a promoter régió közti kapcsolatot. *Elferink* és *Whitlock* [41] szerint az induktor-receptor DNS-hez való kapcsolódása a DNS torzulását eredményezi, amelynek hatására a kromatin más transzkripciós aktivátorok számára könnyebben hozzáférhetővé válik. A struktúrgénekről történő átíródás eredményeként a sejtben megnövekszik a CYP1A1 mRNS, valamint a fokozott *de novo* fehérje-szintézis eredményeként a CYP1A1 enzim mennyisége [42].



Ellentétben a CYP1A1 enzimmel, a CYP1A2 szabályzásáról viszonylag keveset tudunk. Ez utóbbi citokróm P450 enzimet is policiklusos aromás vegyületek indukálják illetve az izoszaflon, amely a CYP1A1-re teljesen hatástalan. Laboratóriumi állatokat "MC-típusú" induktorkal kezelve a májon kívül a tüdőben, a bőrben vagy a vesében is megfigyelhető a CYP1A1 indukciója, míg a CYP1A2 enzim fokozódása a májra korlátozódik. A CYP1A2 regulációjában is az Ah-receptornak van szerepe, bár a további ismeretek hiányosak. Tény azonban, hogy 20-40-szeres CYP1A2 mRNS szint emelkedést tapasztaltak a sejtenyésztés- és állatkísérletek során, amely egyrészt a transzkripció fokozódásának, másrészt a poszt-transzkripciós folyamatoknak (a mRNS sejtmagból történő transzportját illetve a mRNS stabilitását növelő mechanizmusoknak) köszönhető. Úgy tűnik, hogy az Ah-receptornak ezen poszt-transzkripciós folyamatokban is szerepe van [43].

### 2.3.2. "PB-típusú" indukció (CYP2B)

"PB-típusú" vegyületekkel (pl. fenobarbitál [PB] és más barbiturátok, valamint fenitoin, DDT, flumecinol [Zixoryn®]) történő indukció során a májsúly, az endoplazmás retikulum, valamint az össz citokróm P450-mennyiség szignifikánsan nő [27]. Az indukció, hasonlóan az "MC-típusú" indukcióhoz, a CYP2B1 és a CYP2B2 gének transzkripcióját illetve ennek eredményeként *de novo* protein szintézist jelent [44, 45]. Emellett van egy olyan feltevés is, hogy a "PB-típusú" induktorok a mRNS sejtmagból való kijutását segítik elő, ami szintén a CYP2B

mRNS szintjét emeli [46]. "PB-típusú" induktor vegyületek hatására a CYP2B1 és a CYP2B2 enzimek mennyisége növekszik, amely a 7-pentoxi-resorufin O-dealkiláz aktivitás gyors, szenzitív és rendkívül specifikus növekedésével nyomon követhető [34], azonban az indukálhatóság eltérő az egyes szervezetekben. Kezeletlen állatokban a CYP2B2 mennyisége igen alacsony, a CYP2B1 pedig alig mérhető. Fenobarbitál-kezelés hatására a CYP2B1 mRNS mennyisége megemelkedik a májban, míg a tüdőben konstitutív módon nyilvánul csak meg. Úgyszintén a CYP2B2 a májban indukálható fenobarbitállal, azonban a vékonybélben konstitutív, a tüdőben pedig egyáltalán nem fejeződik ki [47].

A fenobarbitál okozta indukció molekuláris mechanizmusára vonatkozó ismeretek eléggé bizonytalanok. A kezdeti felismerő szakaszra vonatkozó információk egyenlőre hipotézis szinten léteznek. Feltételezhető, hogy van egy receptor, amely a "PB-típusú" induktorokat felismeri, azonban ennek igazolását több tényező is nehezíti. A "PB-típusú" induktor vegyületek nagy szerkezetbeli változatosságot mutatnak, ezért ha létezik is receptor, az induktorral való kapcsolódása nagyon laza, vagy maga a receptor meglehetősen flexibilis [48]. Van olyan elképzelés, miszerint a fenobarbitál-indukció nem igényel receptort. A fenobarbitál kapcsolódik a citokróm P450 enzimhez, ezáltal gátolja egy endogén CYP2B induktor metabolizmusát, vagy esetleg egy CYP2B represszor prekursor metabolikus aktiválását, bár ezek a folyamatok viszonylag lassú indukciót feltételeznek, ami ellentmondásban van a kísérleti tapasztalatokkal [49].

Mindemellett a CYP2B gének hormonális szabályozás alatt állnak. Hipofízis-irtott patkányokban a máj CYP2B1 és CYP2B2 szintje jelentősen emelkedett mind a hím, mind a nőstény állatokban. Amennyiben ezek az állatok növekedési hormont kaptak, a CYP2B enzimek szintje csökkent [50]. Az agyalapi mirigy, illetve a növekedési hormon szabályozó hatása más citokróm P450 enzimeknél is megfigyelhető, bár a molekuláris mechanizmus még nem ismert.

### 2.3.3. "Etanol-típusú" indukció (CYP2E1)

A krónikus etanol kezelés fokozza számos kisméretű, hidrofób vegyület (anilin, p-nitrofenol, nitrozaminok, szerves oldószerek, alifás alkoholok) metabolizmusát és az etanol oxidációját. Már egyszeri kezelés is megnövelheti az etanol mikroszómális lebomlását [51-54]. Az etanol indukálta citokróm P450 a CYP2E1 gén terméke, és bár a CYP2 géncsalád tagja, a CYP2E1-t nem képesek indukálni "PB-típusú" vegyületek. Induktorként tartják számon még az isoniazidot, az imidazolt, az acetont és a pirazolt [55-57].

A CYP2E1 gén magzati korban inaktív, születéskor aktiválódik. A génaktiváció mechanizmusa még nincs teljesen felderítve, az azonban ismert, hogy a transzkripció a gén 5' végén található citozin bázisok demetilézése után következik be. A gén középső szakaszán található citozin bázisok csak később demetilálódnak, ez azonban nem befolyásolja a gén-átíródás sebességét [58]. A CYP2E1 indukciója többféle mechanizmus szerint zajlik. A transzkripció fokozódása azonban nem

tartozik az elsődleges indukciós folyamatok közé; a poszt-transzkripciós mechanizmusoknak jut fő szerep. Etanol vagy aceton hatására a CYP2E1 fehérje 3-6-szoros emelkedése mellett a CYP2E1 mRNS szintje nem növekedett [59], aminek az az oka, hogy a CYP2E1 specifikus szubsztrátjai védelmet nyújtanak az enzim degradációjával szemben [60]. Az enzim molekulája 129. szerin aminosavának cAMP-függő foszforilációját gátolja a hozzákötődött specifikus szubsztrát [61]. Amennyiben a szubsztrát nincs jelen, a cAMP-függő protein kináz foszforilálja az enzimet, így az elveszíti hem csoportját, denaturálódik és gyorsan lebomlik [62]. A szubsztrát hatására a CYP2E1 enzim szintézis:degradáció arány eltolódik [63]. A glukagon és az adrenalin fokozza a foszforilációt illetve a CYP2E1 degradációját, amit az etanol vagy az imidazol (a CYP2E1 szubsztrátjai) kivédnek. Insulin hatására ellentétes irányú hatás mutatkozik, csökken a CYP2E1 foszforiláció-függő lebomlása. Az endogén - hormonális, - valamint az exogén - xenobiotikumok okozta - hatások együttesen szabályozzák a sejtekben a CYP2E1 enzim szintjét [61, 64].

Bár a citokróm P450 enzimek indukcióját az idegen vegyületek hatására történő gyors és adaptív válaszreakciónak könyvelik el, a CYP2E1-indukció jó példa arra, hogy a szervezet belső állapotának megváltozására is képes a rendszer válaszolni. Éhezés hatására megnő a nitrozodimetilamin N-demetiláz aktivitás, amely a CYP2E1 indukciójára vezethető vissza [65]. Az éhezés 3-4-szeresére emeli a CYP2E1 gén aktivitását a sejtmagban, amely a transzkripció fokozódását jelenti. Az éhezés indukciós hatását az etanol tovább növeli [66, 67].



Diabetes esetén fokozódik a mikroszómális anilin-hidroxiláz illetve a nitrozodimetilamin N-demetiláz aktivitás, emelkedik a CYP2E1 tartalom és ezzel párhuzamosan a plazma  $\beta$ -hidroxibutirát szintje is növekszik. A diabetes okozta megnövekedett keton szint stimulálja a CYP2E1 indukcióját [68], ami szintén adaptív válasznak tekinthető, mivel a CYP2E1 hatékonyan részt vesz a ketonok lebontásában. Patkányokban mesterségesen előidézett diabetes esetén a CYP2E1 mRNS mennyisége 10-szeresére emelkedett; ez azonban nem a transzkripció fokozódásának eredménye, valószínűleg a CYP2E1 mRNS stabilizálásáról van szó [69].

Összegezve, a CYP2E1 indukciója az enzimfehérje és a mRNS stabilizálását jelenti, míg a transzkripció fokozódása nem jelentős, születéskor valamint éhezés hatására következik be [70].

#### 2.3.4. "PCN / glukokortikoid-típusú" indukció (CYP3A)

A CYP3A enzimeket indukáló vegyületek közé szintetikus szteroidok (pl. pregnenolon-16 $\alpha$ -karbonitril [PCN], spironolakton), endogén és szintetikus glukokortikoidok (pl. dexametazon), fenobarbitál-típusú vegyületek (pl. fenobarbitál, fenitoin, flumecinol [Zixoryn®]), makrolid antibiotikumok (pl. erythromycin, rifampicin) és gomba ellenes szerek (ketokonazol, klotrimazol) tartoznak [71-74]. Az induktorok változatos kémiai természetéből adódóan a CYP3A regulációja is meglehetősen komplex. Az indukciós folyamatok során a

megnövekedett transzkripció mellett [75] a poszt-transzkripciós folyamatoknak is nagy szerep jut. A poszt-transzkripciós folyamatok több szintet is érintenek: stabilizálják magát a CYP3A enzimet [74] vagy a CYP3A mRNS-t [76].

A CYP3A géncsalád patkányokban meglevő két tagja, a CYP3A1 és a CYP3A2, szerkezetét tekintve nagyon hasonló (a mRNS nukleotid szekvenciákat összehasonlítva 90%-os a homológia), katalitikus tulajdonságaik is azonosnak tekinthetők; szabályozásuk azonban jelentős eltéréseket mutat. A CYP3A1 a születés utáni időszakban rövid ideig konstitutívan jelenik meg, míg a kifejlett állatban induktor hiányában csak igen alacsony szinten detektálható [77-79]. A CYP3A2 inkább konstitutív módon fejeződik ki a hím állatokban; a CYP3A2 gén átíródása szoros kapcsolatban van a hormonális állapottal [77]. A specifikus induktorokra adott CYP3A1 válasz eltér az egyedfejlődés egyes szakaszaiban. Dexametazon hatására mind a fiatal, ivaréretlen, mind a felnőtt állatokban bekövetkezik a CYP3A1 gén transzkripciós aktiválása, azonban a mRNS mennyisége a fiatal patkányokban rövid idő alatt (2 óra) megnövekszik, míg a kifejlett állatokban ez hosszabb időt (12 óra) vesz igénybe. Ehhez járul még az a tény, hogy egy labilis fehérje komponens *de novo* szintézise szükséges a CYP3A1 mRNS képződéséhez felnőtt állatokban, míg fiatal korban ez hiányzik [79].

A CYP3A induktori valószínűleg egy sztereospecifikus felismerő rendszerrel ("PCN-receptor") lépnek kapcsolatba, amely hasonló lehet a glukokortikoidok által kifejtett transzkripciós szabályzásban résztvevő glukokortikoid kötő receptor-fehérjéhez (GR), bár a receptor létezésére még nincsenek direkt bizonyítékok. A

klasszikus glukokortikoid receptornak a CYP3A-indukcióban való részvételét kizárták [80, 81], sőt a CYP3A1 gén 164 bázispárnyi promoter szakasza, amely a dexametazon hatására bekövetkező transzkripció aktiválást irányítja, nem tartalmaz glukokortikoid érzékeny elemet ('glucocorticoid response element' - GRE) [82]. A klasszikus szteroid hormon hatás során a hormon molekula a glukokortikoid receptorhoz kötődik, a képződött komplex a sejtmagban kapcsolatba lép a GRE szakasszal, ezáltal fellazul a nukleoszóma szerkezete, ami lehetővé teszi más regulációs fehérjék bekötődését és a transzkripció iniciációs komplex kialakulását [83].

Az induktorok sorában fenobarbitál-típusú vegyületek is szerepelnek, azonban a fenobarbitált felismerő receptor, amely a CYP3A indukciójához vezet, valószínűleg nem azonos a CYP2B1 és a CYP2B2 feltételezett receptorával. A fenobarbitál két irányú hatást fejt ki, egyrészt stimulálja a CYP3A szintézisét, másrészt gátolja a CYP3A enzimfehérje degradációját [74].

Tekintélyes azon gyógyszer vegyületek (pl. warfarin, ciklosporin, nifedipin, lidocain), toxinok (pl. aflatoxin B1, aflatoxin G1) és endogén szubsztátok (pl. progeszteron, tesztoszteron, kortizol) száma [84], amelyek oxidációját a CYP3A enzimek katalizálják, így az indukció hatására bekövetkező metabolizmus fokozódásával ezen vegyületek esetén számolni kell.

---

Az ismertett típusok alapján megállapítható, hogy a citokróm P450 enzimek indukciójáért nem egyetlen mechanizmus felelős. A legáltalánosabb módozat a transzkripció fokozódása, amely egyértelműen igazolt a CYP1A és a CYP2B indukció esetén. A mRNS szint emelkedését azonban nemcsak a fokozott transzkripció idézheti elő. A mRNS stabilitását eredményező poszt-transzkripciós folyamatoknak is van jelentősége, még azoknál az indukciós kategóriáknál is, ahol a fő mechanizmust a transzkripció fokozódása jelenti (pl. az "MC-típusú" indukciónál) [43, 46]. A poszt-transzkripciós folyamatok magukba foglalják a mRNS-"érésének", valamint a mRNS sejtmagból a citoszolba történő transzportjának szabályozását, a mRNS-stabilizálást, a fokozott enzim-szintézist és az enzimfehérje-stabilizálást. Ez utóbbi folyamatok érvényesülnek leginkább a CYP2E1 és a CYP3A indukciója során [58, 59, 74].

Az indukciós típusok listája korántsem teljes. Számos vegyületről tudott, hogy indukál olyan citokróm P450 enzimeket, ami eddig nem került említésre. Az indukció mechanizmusát tekintve, ezek a vegyületek is hasonló módon fejthetik ki hatásukat, mint a már ismert induktor kategóriák modell vegyületei, bár a kérdés még sok szempontból nyitott.



#### 2.4. Az indukció néhány gyakorlati vonatkozása

Két fontos gyakorlati ténytet kell leszögezni a citokróm P450 enzimek indukciójával kapcsolatban:

1. az indukció megváltoztathatja az alkalmazott gyógyszer vegyület(ek) hatékonyságát;
2. egyensúly eltolódást okozhat a méregtelenítő illetve a toxikus (esetenként karcinogén) metabolitokat létrehozó folyamatok között.

Számos gyógyszerként használt vegyület amellet, hogy valamely citokróm P450 enzim induktora, szubsztrátja is, így fokozza saját metabolizmusát, valamint kiürülését a szervezetből (pl. a barbiturátok: CYP2B és CYP3A indukciója). Ezáltal a farmakológiai hatás időtartama és intenzitása csökken vagyis a gyógyszer tolerancia jelensége következik be. Az adott gyógyszer oxidatív inaktiválása fokozódik, így magasabb dózis szükséges a kívánt terápiás hatás eléréséhez. Az enzimindukció következtében megváltozhatnak más gyógyszerek metabolikus tulajdonságai is. Jól ismert, hogy például a fenobarbitál az antiepileptikumok (pl. fenitoin) vagy a fogamzásgátlók eliminációját fokozza, ezért azonos terápiás hatás eléréséhez magasabb dózissra van szükség [85].

A citokróm P450 enzimek, mint a méregtelenítő folyamatok terminális oxidázai, a potenciális toxikus testidegen vegyületek biológiai inaktiválásában vesznek részt. Ismert tény azonban, hogy bizonyos esetekben az eredetileg ártalmatlan vegyületből kémiaiailag reaktív, toxikus vagy karcinogén anyagokat képeznek [26]. Ezen kívül a

citokróm P450 enzimek indukálhatósága nagyobb, mint a méregtelenítésben résztvevő másik enzim csoport, a konjugációs enzimek (UDP-glukuronil-transzferáz, glutation-S-transzferáz) indukálhatósága. A citokróm P450 enzimek katalizálta reaktív metabolit képződés és a konjugációs enzimek által történő elimináció között egyensúly eltolódás jöhet létre, amely a keletkezett metabolit sajátságaitól függően nekrozist vagy rákot okozhat. Például az epilepszia kezelésére használt görcsgátló hatású valproinsav fenobarbitállal való együttes alkalmazása esetén súlyos májkárosodás jelentkezhethet, ugyanis a fenobarbitál indukálta citokróm P450 enzim a valproinsavat erősen toxikus telítetlen zsírsavvá alakítja [86].

A citokróm P450 enzimeknek kettős szerepe van a karcinogén vegyületek metabolizmusában. Egyrészt a potenciális karcinogén vegyületek lebontását végzik, másrészt bizonyos prekarcinogén vegyületeket aktiválhatnak. Szinte mindegyik indukálható citokróm P450 enzim esetén van adat arra vonatkozóan, hogy valamilyen prekarcinogén vegyületet aktivál; azonban a CYP1A enzimeknél fordul elő legnagyobb százalékban [87, 88]. A metabolikus aktiválás során olyan elektrofil intermedier keletkezik, amely a DNS-sel vagy más makromolekulákkal reagálva tumor képződéséhez vezető folyamatokat iniciál. A legtöbb vegyület esetén inkább a keletkezett metabolit, mint az eredeti molekula felelős a karcinogenitásért. Másrészt a prekarcinogén vegyületek nagy része (policiklusos aromás szénhidrogének, aromás és heterociklusos aminok, aminoazobenzének) a CYP1A enzimeket indukálja, ezáltal saját metabolikus aktiválását fokozza. A kémiai karcinogének egy másik csoportja, a kis molekulású nitrozaminok a CYP2E1 enzim katalizálta aktiválás után válnak reaktív vegyületekké [89].

Ezen folyamatok leginkább a májban zajlanak, ahol a keletkezett karcinogén vegyületek a citokróm P450 enzimek, valamint a konjugációs enzimek génjeit indukálják. A karcinogén aktiválás során képződött metabolit polárosabb, mint az eredeti molekula, így nagyobb lehetőség van arra, hogy konjugáció után gyorsan ürüljön a szervezetből. A máj így megvédheti a perifériás szöveteket, mivel a karcinogén anyag továbbjutását megakadályozza. Ugyanez a helyzet a placenta esetében is, ahol a májhoz hasonlóan lejátszódó indukció végül is a magzat védelmét eredményezi [90]. Egyéb szervek citokróm P450 aktivitásának nem annyira a méregtelenítésben, mint inkább a reaktív metabolitok helyi előállításában van szerepe.

Az indukció jelenségét a terápiában is próbálják hasznosítani, elsősorban az újszülöttkori sárgaság (icterus neonatorum) kezelésében. Példaként meg kell említeni a fenobarbitált, vagy a flumecinolt (Zixoryn®), amelyet a Richter Gedeon Gyógyszergyár vizsgált az újszülöttkori és egyéb sárgaság (pl. Gilbert-kór) lehetséges kezelésére [91, 92]. Jelentek meg közlemények a diabetes [93] és a hyperlipidaemia [94] induktorokkal való sikeres kezeléséről is. A szakma véleménye azonban nem egyértelmű az induktorokkal, mint gyógyszerekkel végzett kezelésről, mert igen sok fenntartás van az induktorok későbbi hatását illetően.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

A xenobiotikumok metabolizmusában fontos szerepet játszó citokróm P450 enzimek egy része különböző vegyületekkel indukálható. Az enzimindukció következtében megváltozhat egy gyógyszer vegyület hatékonysága, hatóideje és toxicitása; ugyanakkor kémiaailag inaktív, nem toxikus anyagok metabolikus aktiválása is fokozódhat. A terápiában elég általános jelenség több gyógyszer vegyület együttes alkalmazása, amely további változásokat eredményezhet a citokróm P450 enzimek indukciójában.

Vizsgálataink kiinduló gondolata az volt, hogy ha kiválasztunk két, ugyanazon citokróm P450 enzimet indukáló vegyületet és azt feltételezzük, hogy a hatásukra bekövetkező indukció különböző mechanizmusok szerint történik (pl. az egyik induktor citokróm P450 gén-transzkripciót fokozó hatású, a másik pedig mRNS vagy enzimfehérje stabilizáló vegyület), úgy e két vegyülettel együtt kezelve az állatokat, az adott citokróm P450 enzim mennyiségének megemelkedése additív hatást tükrözhet a két induktorral külön-külön kezelt állatokhoz képest.

Két, CYP3A-induktor, a fenobarbitál és a dexametazon együttes alkalmazásával vizsgáltuk, hogy az alapgondolatban megfogalmazottak mennyiben igazolódnak; azaz a **fenobarbitál + dexametazon** hatására bekövetkező CYP3A indukció mutat-e növekedést a csak fenobarbitált és csak dexametazont kapott állatok CYP3A indukciójához viszonyítva. Az indukció mértékét a CYP3A specifikus aktivitásaival: az etilmorfin és az aminopirin N-demetilézésével határoztuk meg.

Tanulmányoztuk a fenobarbitál + dexametazon okozta egyéb citokróm P450 enzim változásokat is. A kettős indukció hatására megemelkedő p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás háttérében álló enzim(ek) indirekt módon, specifikus gátlás vizsgálatokkal (specifikus kémiai gátlószerrel, illetve ellenanyaggal) történő azonosítására törekedtünk. Meghatároztuk az indukált enzim elektroforetikus tulajdonságait és molekulatömegét. Választ kerestünk arra, hogy a fenobarbitál + dexametazon kezelés hatására bekövetkező jelenség mutat-e szexuális különbségeket. A fenobarbitál + dexametazon kezelés mellett RNS illetve fehérje szintézist gátló szereket alkalmaztunk azzal a céllal, hogy megállapítsuk, vajon az indukció a transzkripció vagy a poszttranszkripciós folyamatok szintjén zajlik.

Felmerült a kérdés, vajon kizárólagosan a fenobarbitál és a dexametazon sajátosága az, hogy e két vegyületet együtt kapott állatokban megnyilvánuló citokróm P450 indukció eltér a csak fenobarbitállal és csak dexametazonnal kezelt csoportoktól, vagy más induktor kombinációval is kiváltható a megfigyelt jelenség. **Flumecinol + dexametazon** kezelés hatását vizsgálva próbáltunk a kérdésre feleletet adni.

## 4. ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

### 4.1. Vegyszerek

A következő anyagokat használtuk az indukciós vizsgálatokhoz (2. ábra):

fenobarbitál - Sigma (St Louis MO, USA)

dexametazon - Sigma (St Louis MO, USA)

Zixoryn® (flumecinol) - Richter Gedeon Gyógyszergyár (Budapest)

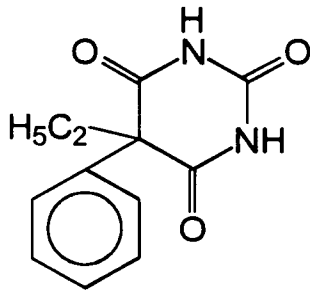
isoniazid - Richter Gedeon Gyógyszergyár (Budapest).

Az enzimaktivitás mérésekhez felhasznált vegyszerek Reanal (Budapest), Merck (Darmstadt, Németország), Boehringer (Mannheim, Németország), Sigma (St Louis MO, USA) és Aldrich (Steinheim, Németország) termékek voltak.

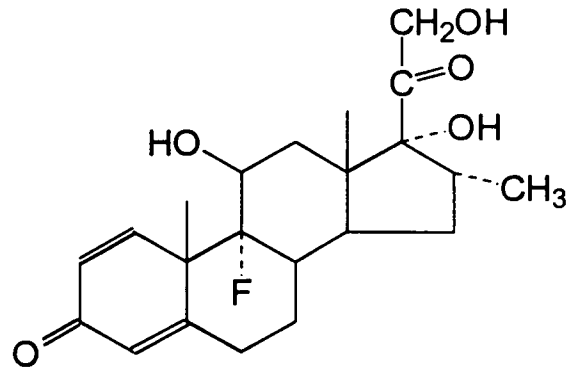
A transláció-gátló cikloheximid valamint az RNS-szintézis gátló aktinomycin D a Reanal (Budapest) termékei voltak.

### 4.2. Az állatok kezelése

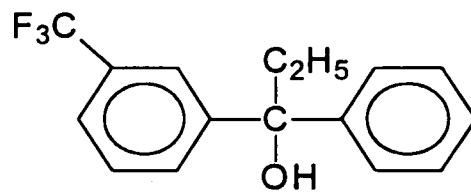
Vizsgálatainkat kezeletlen és a már említett (ld. Célkitűzések) vegyületekkel kezelt hím és nőstény patkányokon végeztük. A 100-120 g-os Wistar (SPF) patkányokat (LATI, Gödöllő) műanyag ketrecekben, keményfaforgács almon, 12 órás világítás-



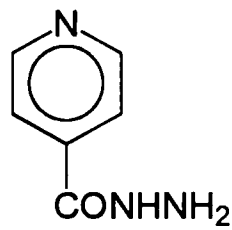
fenobarbitál



dexametazon



flumecinol (Zixoryn®)



isoniazid

2. ábra: A citokróm P450 enzimindukciós vizsgálatok során alkalmazott vegyületek szerkezete.

ritmusú helyiségben 22°C-on tartottuk. Altromin standard patkánytápot (LATI, Gödöllő) és csapvizet szabadon fogyaszthattak. Az állatokat mindig azonos időpontban, reggel 8 órakor kezeltük és az utolsó kezelés után 24 órával dekapitáltuk. A patkányokat a kezeléstől függően a következő csoportokba osztottuk:

1. **Kezeletlen csoport;**

2. **Fenobarbitál** kezelés: 3 napon át napi 350  $\mu\text{mol/kg}$  (80 mg/kg) dózisban i.p. (40 mg/ml koncentrációjú vizes oldatban beadva);

3. **Dexametazon** kezelés: 3 napon át napi 255  $\mu\text{mol/kg}$  (100 mg/kg) dózisban p.o. (25 mg/ml koncentrációjú 5% TWEEN-80 tartalmú vizes szuszpenzióban beadva);

4. **Flumecinol (Zixoryn®)** kezelés: 3 napon át napi 285  $\mu\text{mol/kg}$  (80 mg/kg) dózisban p.o. (40 mg/ml koncentrációjú 5% TWEEN-80 tartalmú vizes szuszpenzióban bejuttatva);

5. **Isoniazid** kezelés: 4 napon át napi 365  $\mu\text{mol/kg}$  (50 mg/kg) dózisban i.p. (25 mg/ml koncentrációjú vizes oldatban bejuttatva).

A kettős indukció hatásának vizsgálatához a következő módon kezeltük az állatokat (az indukáló anyagok azonos koncentrációban kerültek beadásra, mint az egyedüli kezelések alkalmával):

6 **Fenobarbitál + Dexametazon:** 3 napon át napi 350  $\mu\text{mol/kg}$  fenobarbitál i.p. + 255  $\mu\text{mol/kg}$  dexametazon p.o.



A kiegészítő vizsgálatok során a következő induktor kombinációt alkalmaztuk:

**7. Flumecinol (Zixoryn®) + Dexametazon:** 3 napon át napi 285  $\mu\text{mol/kg}$  flumecinol p.o. + 255  $\mu\text{mol/kg}$  dexametazon p.o.

Az indukció mechanizmusának tanulmányozásához egy napos fenobarbitál + dexametazon kezelés mellett az állatok egyik csoportja 5 mg/kg cikloheximidet (2,5 mg/ml vizes oldatban) kapott i.p., míg egy másik csoportot 2 mg/kg aktinomycin D-vel (0,5 mg/ml 5% etanol tartalmú olajos szuszpenzióban) i.p. kezeltünk, majd a kezeléstől számított 24 óra múlva preparáltuk a mikroszómákat.

#### 4.3. Mikroszóma preparálás

Az állatokat a dekapitálás előtt 12 órán át éhezettük, a máját 0,1 M TRIS-HCl pufferben (pH 7,4), amely 1,15% KCl-ot és 1 mM EDTA-t tartalmazott, homogenizáltuk és a mikroszóma preparálást *van der Hoeven* és *Coon* módszere alapján [95] hajtottuk végre. Azaz, a májhomogenizátumot 10.000 g-vel centrifugáltuk 30 percig (Heraeus Varifuge 20RS), majd a felülúszót 105.000 g-vel 1 óráig ultracentrifugáltuk (Janetzki VAC 602). Az üledéket a fenti összetételű pufferben szuszpendáltuk és újabb 1 óráig centrifugáltuk 105.000 g-vel. A kiülepedett mikroszóma-frakciót ismét szuszpendáltuk és az így nyert preparátumot  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a felhasználásig. A mikroszóma preparátumok fehérje-tartalmát *Lowry* és munkatársai [96] által kidolgozott módszer szerint mértük marha szérumban albumint használva standardként.

#### 4.4 Specifikus citokróm P450 enzimreakciók

Az enzimek jellemzésére az irodalomban leírt módszereket alkalmaztuk.

A mikroszómális citokróm P450 tartalmát a redukált vas tartalmú enzim-karbonil komplex [Fe(II)-CO] differencia spektrumának felvételével *Omura* és *Sato* [7, 8] által leírtak szerint mértük.

Az enzimaktivitások meghatározását 0,1 M TRIS-HCl (pH 7,4) pufferben 37°C-on végeztük; az enzim működéséhez szükséges NADPH-t a következő összetételű rendszer termelte:

0,5 mM NADPH

5 mM glukóz 6-foszfát

4 mM MgCl<sub>2</sub>

0,5 E/ml glukóz 6-foszfát dehidrogenáz (E.C. 1.1.1.49).

A p-nitrofenol hidroxilezését 4-nitrokatekollá *Reinke* és *Moyer* [97] által leírt módszer kissé módosított változata alapján határoztuk meg:

- pH 7,0 TRIS pufferben dolgoztunk;
- a MgCl<sub>2</sub>-ot kihagytuk a NADPH-generáló rendszerből, mert zavarta a p-nitrofenol hidroxiláz enzimtesztet (hiánya nem befolyásolta lényegesen a NADPH képződésének sebességét);
- az enzim reakciót (2 ml térfogatú elegyben) 0,5 ml 20% triklórecetsavval állítottuk le (a *Reinke* által alkalmazott 0,6 N perklórsav helyett);

- a 10 N NaOH-dal történő pH 14 beállítása után 522 nm-en spektrofotometriásan mértük a termelődött 4-nitrokatekolt.

Az etilmorfin, az aminopirin valamint a nitrozodimetilamin oxidatív N-demetilizését a képződő formaldehid mennyiségének *Nash* [98] módszere szerint történő meghatározásával követtük nyomon. A formaldehidből acetilacetonnal ammónium-só jelenlétében keletkező sárga színt (3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidin) 412 nm-en mértük.

A pentoxiresorufin mikroszómális O-dealkiláz aktivitást *Burke* és munkatársai [34] által leírtak alapján határoztuk meg. Az enzimműködés eredményeként képződő resorufin termelődését fluorimetriásan követtük.

Az anilin hidroxiláz aktivitást a termelődő p-aminofenol mérésével *Fujita* és *Mannering* [99] által alkalmazott módszer szerint határoztuk meg. A p-aminofenolból 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> és 2% fenol tartalmú 0,5 N NaOH hatására keletkező kék festék intenzitását 630 nm-en mértük.

A spektrofotometriás méréseket Milton Roy, Model Spectronic 401 (Rochester, NY, USA) és Hewlett-Packard Model 8452A (Palo Alto, CA, USA) készüléken végeztük. A fluorimetriás mérésekhez a Farrand Optical Co. Inc. (Valhalla, NY, USA) Spectrofluorometer Mark I. készülékét használtuk.

#### 4.5. A p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás gátlása

##### 4.5.1. Szénmonoxiddal

A 2 ml végtérfogatú inkubációs elegy a következőket tartalmazta:

0,1 M TRIS-HCl puffer (pH 7,0),

1,5 mg mikroszóma fehérje / ml,

NADPH generáló rendszer:

0,5 mM NADPH,

5 mM glukóz 6-foszfát

0,5 E/ml glukóz 6-foszfát dehidrogenáz.

Szénmonoxiddal telített reakció elegyben 0,2 mM p-nitrofenol hozzáadásával indítottuk a reakciót és a 10 perces inkubálás alatt is folyamatos szénmonoxid-buborékoltatást végeztünk. A 0,5 ml 20%-os triklórecetsavval leállított inkubációs elegyből a 4-nitrokatekol mennyiségét a 4.4. pontban leírtak szerint határoztuk meg.

##### 4.5.2. Kémiai gátlószerekkel: 3-amino-1,2,4-triazollal

Az előző pontban részletezett reakció elegyhez szénmonoxid helyett különböző koncentrációjú 3-amino-1,2,4-triazolt (0,5-100 mM) adtunk, majd 15 perces 37°C-on történő előinkubálás után tettük hozzá a p-nitrofenolt. A továbbiakat a szénmonoxid gátlás vizsgálatához hasonlóan végeztük.

#### 4.5.3. *Specifikus ellenanyaggal*

A tisztított CYP2E1 ellen nyúlban termeltetett ellenanyagot *M. Ingelman-Sundberg*-től (Karolinska Institutet, Stockholm, Svédország) kaptuk. A 4.5.1. pontban részletezett p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás szénmonoxiddal történő gátlás vizsgálatához hasonlóan kivitelezett kísérletben a szénmonoxidot anti CYP2E1 IgG-vel helyettesítettük és 1,5-6 mg/ml ellenanyaggal végeztük a gátlás vizsgálatot.

#### 4.6. Statisztikai analízis

Minden adatot a csoport átlag  $\pm$ SD-ban fejeztünk ki. A csoportok közti különbséget Student-féle két-mintás t-próbával állapítottuk meg. A  $p < 0,01$  értékeket statisztikailag szignifikáns változásnak tekintettük. Az adatok feldolgozását IBM kompatibilis számítógépen 'GraphPAD InStat 1.14' (GraphPAD Software) és 'Statistica for Windows 4.3' (StatSoft Inc., 1993) segítségével végeztük.

#### 4.7. A mikroszóma preparátumok poliakrilamid gélelektroforézise

A mikroszóma preparátumok elektroforetikus jellemzésére, valamint fehérje molekulatömeg meghatározáshoz *Laemmli* [100] által kidolgozott Na-dodecilszulfát (SDS)-poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk. A mintákat 2% SDS és 5% merkaptóetanol jelenlétében 2 percig forraltuk, majd az így előkezelt

preparátumokat diszkontinuus rendszerben: 4,3% akrilamid tartalmú koncentráció és 7,5% akrilamid tartalmú 12x20 cm méretű 2 mm vastagságú szeparáló gélben futtattuk. A mikroszóma minták mellett ismert molekulatömegű fehérje-keveréket is elektroforetizáltunk:

szénsav anhidráz (marha eritrocita)	M: 29.000
alkohol dehidrogenáz (élesztő)	alegység M: 39.800
szérum albumin (marha)	M: 66.000

Az elektroforézis során szétvárt fehérjéket Coomassie Brilliant Blue-val (Ferak, Berlin, Németország) festve tettük láthatóvá.

#### 4.8. A mikroszóma preparátumok *Western blot* analízise

A 4.7. pontban részletezett módon SDS-poliakrilamid gélben szétválasztott mikroszóma fehérjéket a gélből nitrocellulóz lapra (LKB) juttattuk át elektroforetikusan. A folyamatot 20% metanol, 25 mM TRIS és 192 mM glicin tartalmú pufferben 4°C-on 90 percig végeztük *Towbin* és munkatársai [101] által leírtak szerint. A fehérjéknek a gélből a nitrocellulóz lapba való teljes átjutását ellenőriztük egyrészt a gél Coomassie Brilliant Blue-val, másrészt a nitrocellulóz lap 0,5% Ponceau S oldattal történő festésével. Ez utóbbi festék csak ideiglenesen kötődik a nitrocellulóz lapon lévő fehérjékhez, a lapról vízzel lemosható. A lapok fehérjét nem kötött területeit 3% marha szérum albuminnal (10 mM foszfát/NaCl

pH 7,2 pufferben) telítettük egy éjszakán át, majd foszfát pufferrel háromszor mostuk. Ezután hozzáadtuk a primer ellenanyagot, a nyúl anti CYP2E1 IgG-t (1 µg/ml) és szobahőmérsékleten 45 percen át inkubáltuk a lapokat. Ismételt foszfát pufferes mosás után további 45 percig kecskében termeltetett anti-nyúl IgG-vel (BioRad, Brüsszel, Belgium), mint szekunder ellenanyaggal inkubáltunk. Ez utóbbi ellenanyag tormaperoxidázzal konjugált formáját alkalmaztuk. Újabb mosás után a CYP2E1 enzim előhívását a peroxidáz aktivitás segítségével  $H_2O_2$  és 3,3'-diaminobenzidinnel (DAB) végeztük. A tormaperoxidáz hatására  $H_2O_2$  jelenlétében a 3,3'-diaminobenzidin oxidatív polimerizációja és ciklizációja egy barna, vízben oldhatatlan csapadékot eredményez azon a területen, ahol ellenanyag kötődött a nitrocellulóz laphoz. A reakciót néhány perc után vizes mosással leállítottuk és a lapokat megszáritottuk.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 5.1. A fenobarbitál + dexametazon kezelés okozta citokróm P450 enzimaktivitás változások

Vizsgálataink alapgondolataként azt feltételeztük, hogy ha a CYP3A1 enzimet indukáló fenobarbitál illetve dexametazon az indukciós hatást eltérő mechanizmus alapján fejti ki, úgy e két vegyületet együttesen kapott patkányokban a CYP3A1 szintje magasabb lehet, mint a fenobarbitált vagy a dexametazont külön-külön kapott csoportokban, ami a specifikus CYP3A aktivitások (etilmorfin és aminopirin N-demetiláz) emelkedésében jelentkezhet.

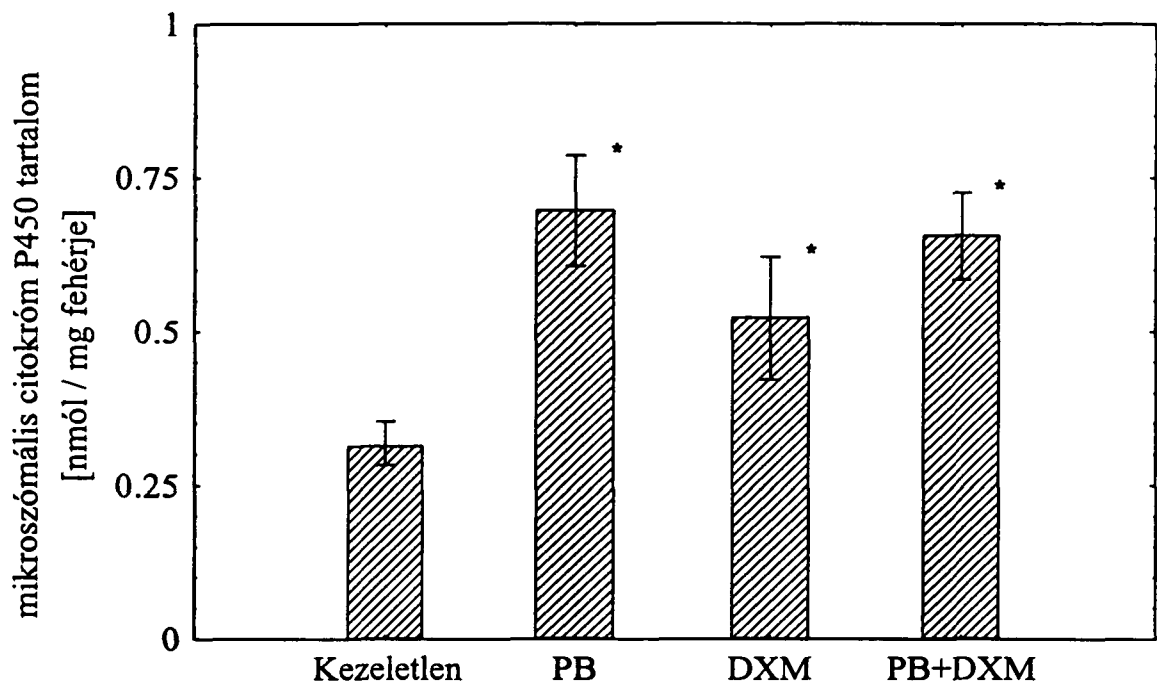
Hím patkányokat kezeltünk fenobarbitállal (n=7) illetve dexametazonnal (n=5) külön-külön, valamint a két vegyülettel együtt (n=5). A 3-5. ábrák a kezelések hatására bekövetkező mikroszómális citokróm P450 tartalom, pentoxiresorufin O-dealkiláz illetve etilmorfin és aminopirin N-demetiláz aktivitás változásokat mutatják be.

Kezeletlen állatokhoz viszonyítva a fenobarbitál-kezelés kétszeresre, a dexametazon pedig 70%-kal emelte meg a **citokróm P450 enzimek összmenyiségét**. A fenobarbitált és dexametazont együtt kapott állatok májában a mikroszómális citokróm P450 koncentráció szintén kétszerese volt a kezeletlen csoport értékeinek; azaz a kettős kezelés nem eredményezett szignifikáns változást a csak fenobarbitált kapott állatokhoz viszonyítva (3. ábra).



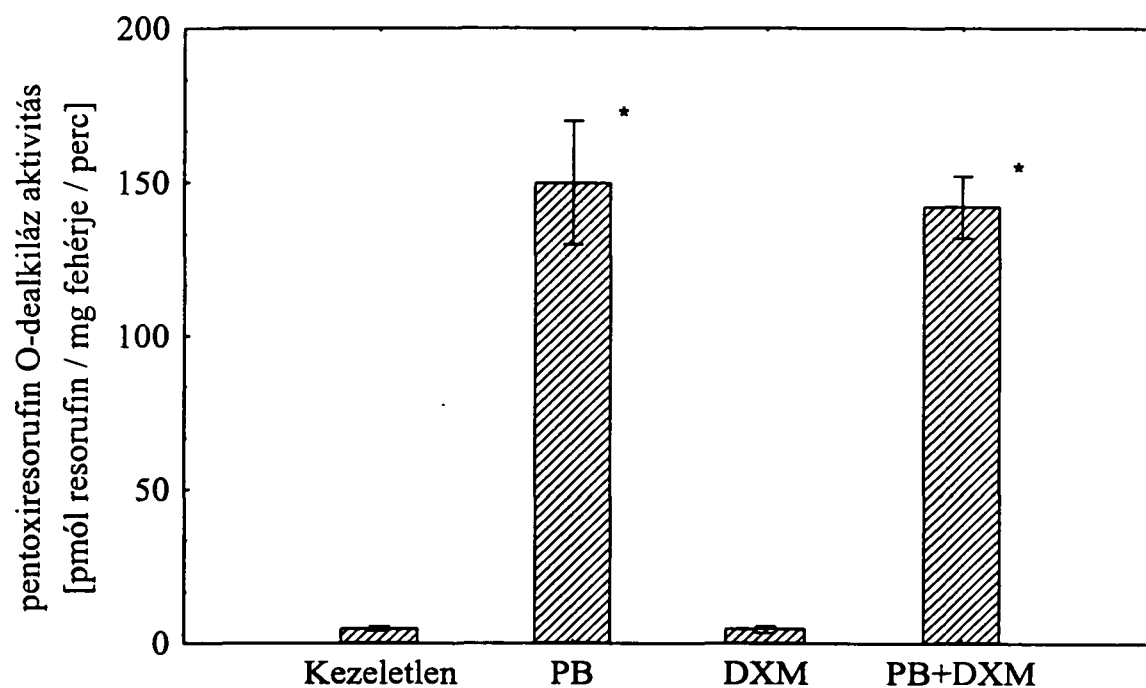
A CYP2B enzimek aktivitását a **pentoxiresorufin O-dealkilezésével** mértük. Fenobarbitál-kezelt állatok máj mikroszómájában 31-szeres aktivitás fokozódást tapasztaltunk a kezeletlen csoporttal összehasonlítva, ami a mai ismeretek szerint a CYP2B1 és a CYP2B2 gének megnövekedett átíródásának és a fokozott (*de novo*) CYP2B enzim szintézisének következménye. Dexametazont kapott patkányok esetén nem történt változás a pentoxiresorufin O-dealkilezésében. A két vegyület együttes hatása a CYP2B enzimaktivitás ugyanolyan mértékű (30-szoros) emelkedését okozta, mint azt a csak fenobarbitál-kezelt állatokban láttuk (4. ábra).

Mind a fenobarbitál, mind a dexametazon a CYP3A enzimek induktora. A kezdeti elgondolás szerint, amennyiben a hatásukra bekövetkező CYP3A indukció eltérő mechanizmus(ok) eredménye, úgy együttes alkalmazásuk esetén a CYP3A specikus aktivitásainál (**etilmorfin és aminopirin N-demetilezés**) additív hatást várhatunk. Az eredmények azt mutatják, hogy ilyen irányú változás nem következett be a dexametazont és fenobarbitált együtt, illetve külön-külön kapott patkányok mikroszómális CYP3A aktivitásait összehasonlítva. Mindhárom esetben a kezeletlen állatok értékeihez képest kétszeres aktivitás növekedést mértünk mind az etilmorfin, mind az aminopirin N-demetilezése esetén (5. ábra).



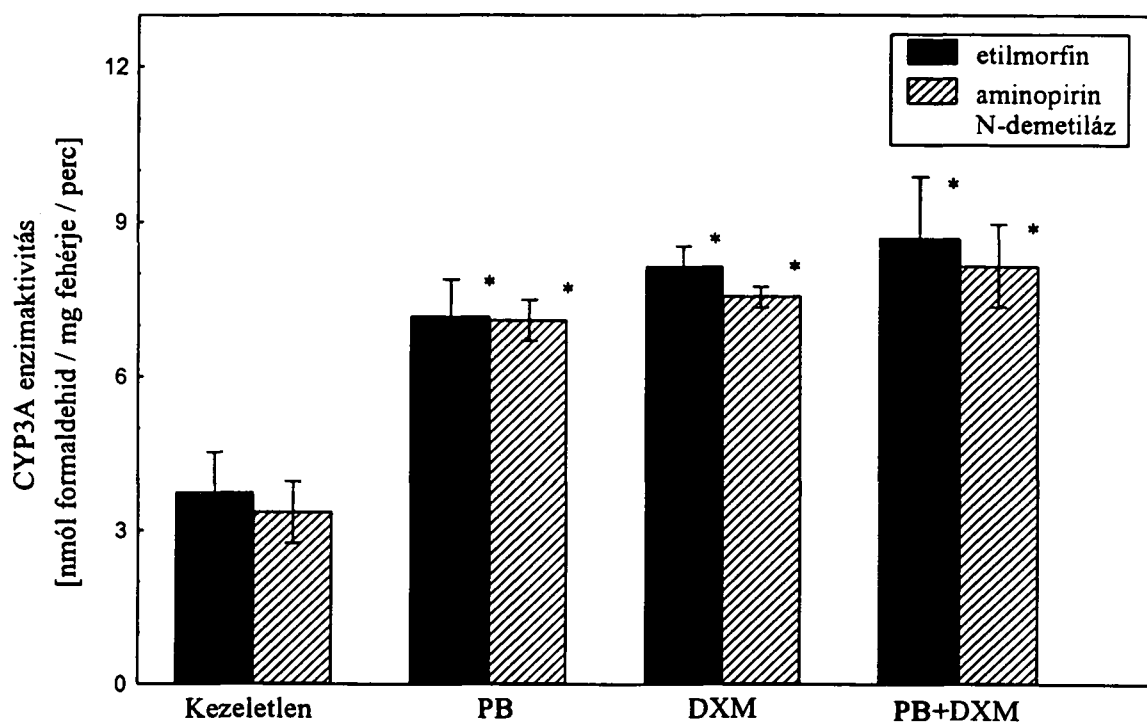
**3. ábra:** Fenobarbitállal (PB) illetve dexametazonnal (DXM) külön-külön, valamint együttesen (PB+DXM) kezelt hím patkányok máj mikroszómális citokróm P450 tartalma.

A kezeletlen állatokhoz képest szignifikáns változásokat ( $p < 0,01$ ) \* jelöli.



4. ábra: Fenobarbitállal (PB) és dexametazonnal (DXM) külön-külön, illetve együttesen (PB+DXM) kezelt hím patkányok pentoxiresorufin O-dealkiláz aktivitása (CYP2B).

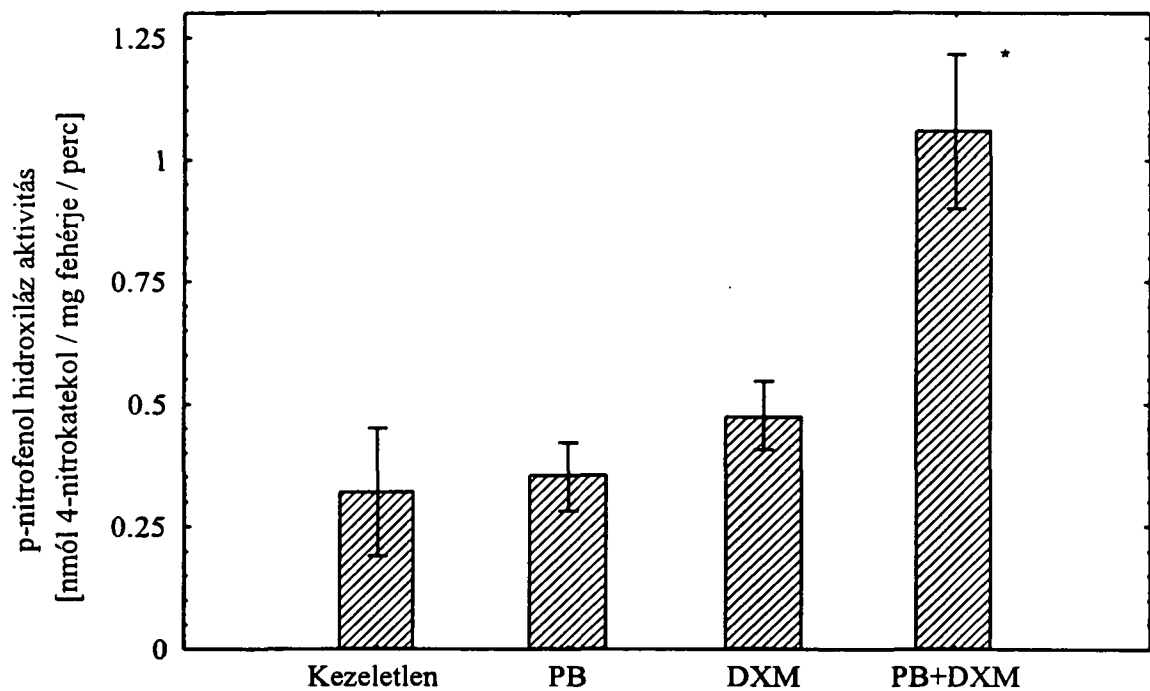
A kezeletlen csoporthoz viszonyítva szignifikáns aktivitás emelkedést ( $p < 0,01$ ) \* jelöli.



**5. ábra:** Fenobarbitállal (PB) illetve dexametazonnal (DXM) külön-külön valamint együttesen (PB+DXM) kezelt hím patkányok **etilmorfin** és **aminopirin N-demetiláz** aktivitása.

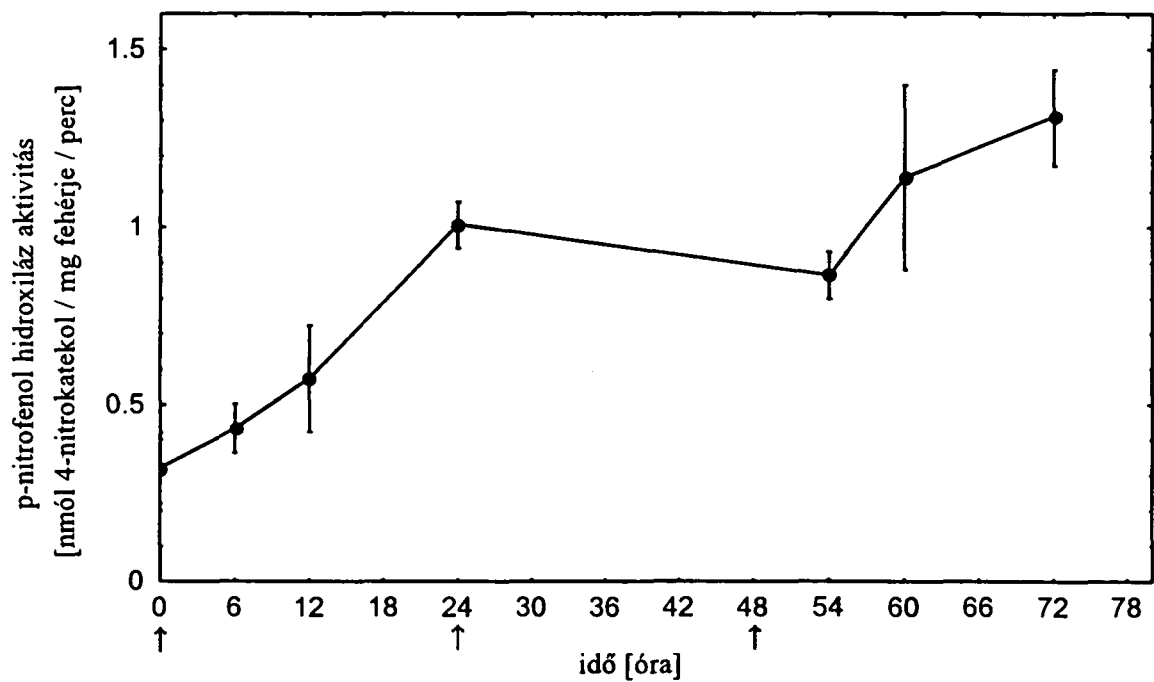
A kezeletlen patkányokhoz képest szignifikáns ( $p < 0,01$ ) változásokat jelöltük \*-gal.

A fenobarbitált vagy dexametazont önmagában kapott állatok mikroszómális **p-nitrofenol hidroxiláz** aktivitása nem változott jelentősen a kezeletlen csoport értékeihez viszonyítva. Ugyanakkor a két említett induktor kombinációja meglepő módon, szignifikáns - több, mint háromszoros - növekedést eredményezett (6. ábra). A 6. ábrán bemutatott fenobarbitál + dexametazon okozta p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás fokozódás három napos kezelés eredménye. Megvizsgáltuk, hogy a kettős indukció hatására időben hogyan változik az említett enzimaktivitás. Ezért az első kezeléstől számítva különböző időpontokban preparáltuk a máj mikroszómát és meghatároztuk a p-nitrofenol hidroxiláz aktivitást (7. ábra). A fenobarbitál + dexametazon kezelés hatására rendkívül gyors indukció következett be; az első kezeléstől számított 24 óra múlva már háromszoros aktivitás fokozódás történt, ami csak kissé emelkedett tovább a 72. óra végére.



**6. ábra:** Fenobarbitállal (PB) valamint dexametazonnal (DXM) történő külön-külön, illetve együttes (PB+DXM) kezelés hatása a máj mikroszómális **p-nitrofenol hidroxiláz** aktivitásra hím patkányokban.

\*: a kezeletlen állatokhoz viszonyított szignifikáns aktivitás emelkedés ( $p < 0,01$ ).



**7. ábra:** A p-nitrofenol hidroxilezését végző enzim fenobarbitál + dexametazon hatására bekövetkező indukciójának időbeli változása.

Nyilak jelzik a kezelések időpontját. A mikroszóma preparálást az első kezeléstől számított különböző időpontokban végeztük. Minden időponthoz tartozó csoportban 5-5 hím patkány volt.

## 5.2. A fenobarbitál + dexametazonnal indukálható p-nitrofenol hidroxiláz enzim tulajdonságainak meghatározása

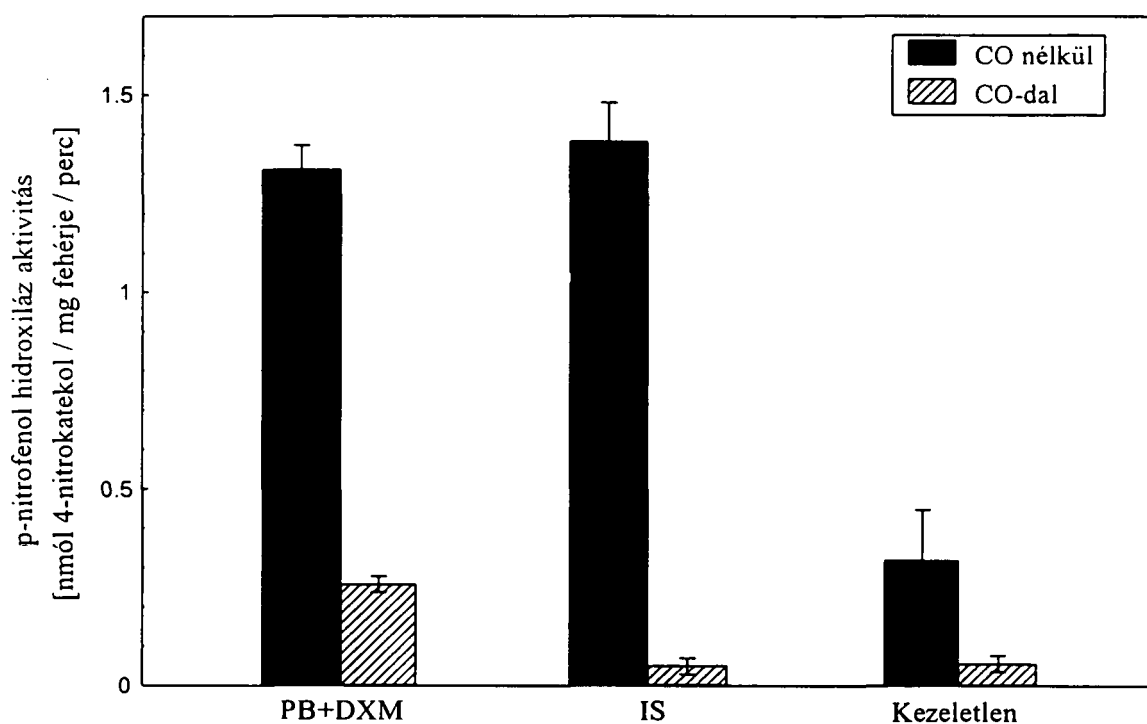
### *5.2.1. Az enzim aktivitásának gátlása szénmonoxiddal*

A redukált vasat (FeII) tartalmazó citokróm P450 enzim szénmonoxiddal stabil komplexet képez. A NADPH-citokróm P450-reduktáz enzim NADPH-ról elektronokat szállít a citokróm P450-hez, amely azután szénmonoxiddal [Fe(II)-CO] komplexet képezve inaktíválódik. Amennyiben a p-nitrofenol hidroxilezését a hem-vas tartalmú citokróm P450 enzimek valamelyike végzi, úgy szénmonoxid jelenlétében az enzim inaktíválódik és a reakció nem megy végbe.

A szénmonoxiddal telített inkubációs elegyben a fenobarbitál + dexametazonnal indukált patkányok máj mikroszómális p-nitrofenol hidroxiláz aktivitása az eredeti (szénmonoxid mentes) aktivitás 20%-ára csökkent. Összehasonlításként: a kezeletlen patkányok esetén az aktivitás 17%-a maradt meg szénmonoxid jelenlétében, míg az isoniazid-kezelt állatok mikroszómájában szinte teljes gátlást okozott, az eredeti aktivitásnak mindössze 4%-át mértük a gátló anyag jelenlétében (8. ábra). Az isoniazid a CYP2E1 enzimet indukálja, amely a mai ismereteink szerint a p-nitrofenol hidroxilezését végzi.

Az eredmények szerint a fenobarbitál + dexametazon-indukált állatokban a máj mikroszómális p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás szénmonoxiddal való gátlhatósága valamely citokróm P450 enzim részvételét feltételezi a reakcióban.





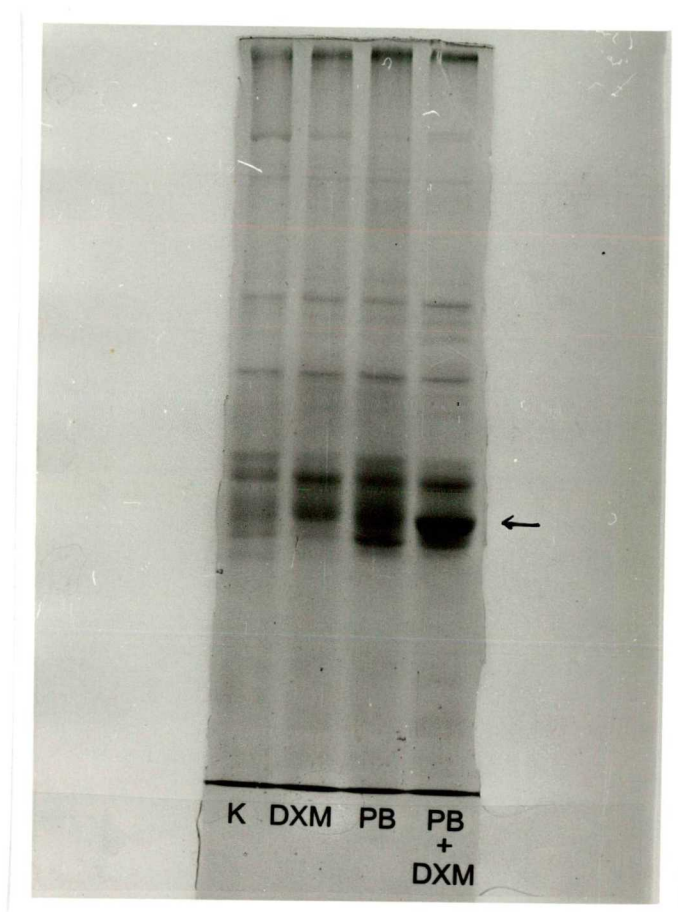
8. ábra: Fenobarbitál + dexametazon (PB+DXM) és isoniazid (IS)-kezelt valamint kezeletlen patkányok mikroszómális p-nitrofenol hidroxiláz aktivitásának szénmonoxiddal való gátlhatósága.

### 5.2.2. Az enzim elektroforetikus tulajdonságainak és molekulatömegének meghatározása

A fenobarbitált és dexametazont külön-külön illetve együttesen kapott patkányok máj mikroszómális fehérjéit SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét (9a. ábra).

A mikroszómák fehérje-összetételének meghatározása során a fenobarbitál + dexametazon-indukált állat mikroszómájában egy intenzív fehérje-sáv jelent meg (a 9a. ábrán nyíl jelzi), amely hiányzott a csak fenobarbitállal vagy csak dexametazonnal kezelt, valamint a kezeletlen állatok mikroszómájából. Ezenkívül az említett fehérje-sáv intenzitása növekedett a fenobarbitál + dexametazonnal történő első kezeléstől eltelt idő függvényében (9b. ábra). Ez a kép jó összhangban van a p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás növekedésével, amit az első kezeléstől számított különböző időpontokban preparált mikroszómákban mértünk (5.1., 7. ábra). Mindebből arra lehet következtetni, hogy az említett fehérje felelős a p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás fokozódásáért fenobarbitál + dexametazon-indukált állatokban.

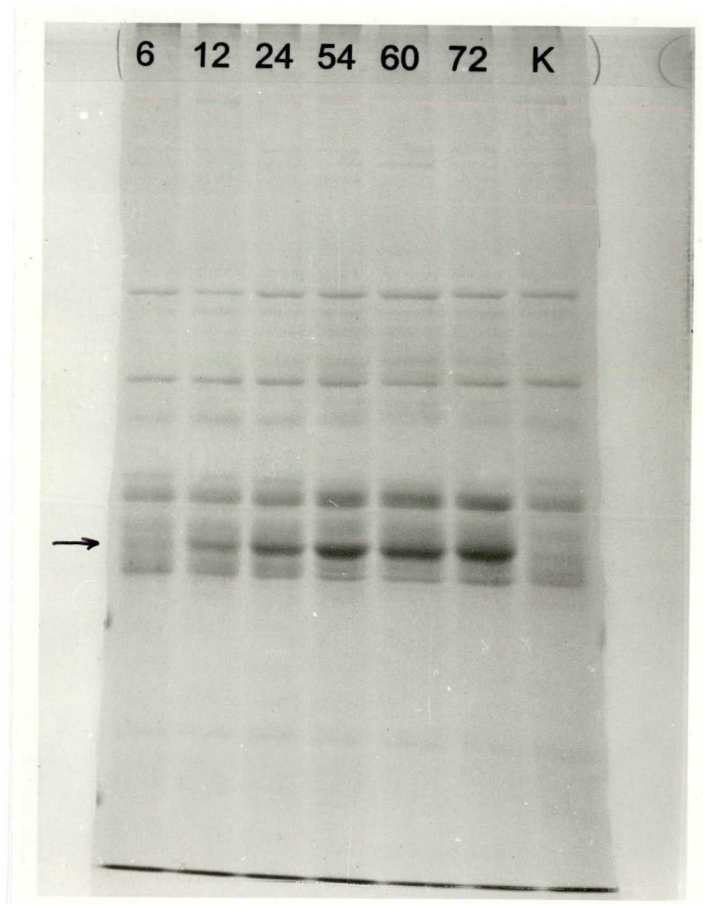
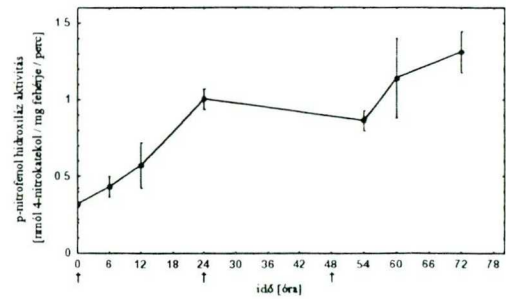
Az enzimfehérje molekulatömege az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis során három ismert molekulatömegű fehérje (szénsav anhidráz, alkohol dehidrogenáz, szérum albumin) segítségével meghatározva 53.000 daltonnak adódott (10. ábra).



9a. ábra: Kezeletlen, fenobarbitállal és dexametazonnal külön-külön, illetve együttesen kezelt hím patkányok máj mikroszómájának elektroforetikus képe.

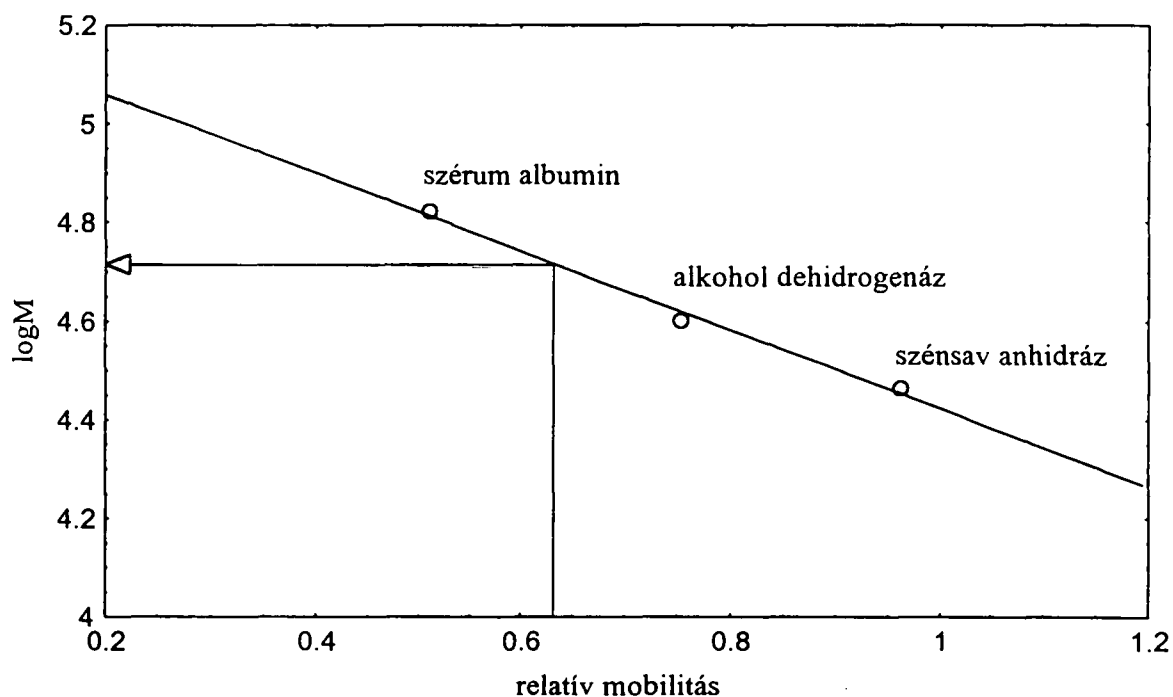
1. sáv: kezeletlen (K),
2. sáv: dexametazon-kezelt (DXM),
3. sáv: fenobarbitál-kezelt (PB),
4. sáv: fenobarbitál + dexametazon-kezelt (PB+DXM).





**9b. ábra:** A fenobarbitál + dexametazon-kezelt állatok különböző időpontokban preparált máj mikroszómájának SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel meghatározott összetétele. A számok az első kezeléstől eltelt időt jelentik órában. Az ábra sarkában összehasonlításul a 7. ábrát is megjelenítettük (47. oldal).

K: kezeletlen állat mikroszómája.



**10. ábra:** Kalibrációs görbe a SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel történő molekulatömeg meghatározáshoz.

A fenobarbitál + dexametazon kezelés hatására indukálódó fehérje molekulatömegének meghatározását nyíl jelzi az ábrán.

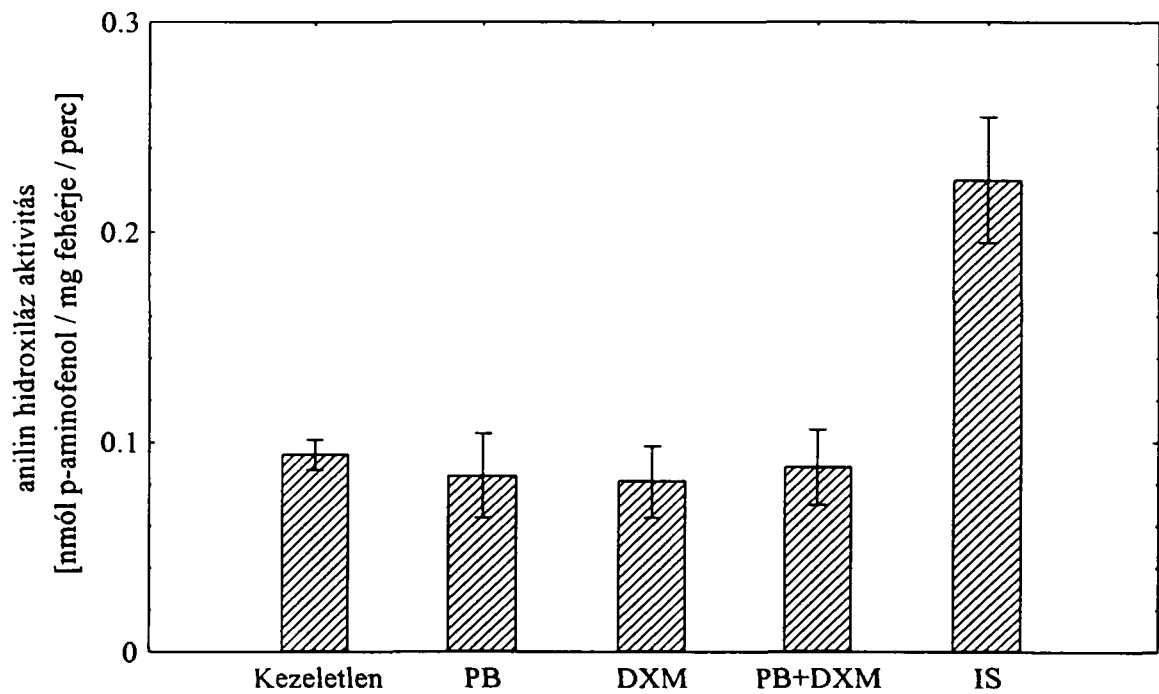
### 5.2.3. A CYP2E1 specifikus aktivitásainak meghatározása

Mai ismereteink alapján a megnövekedett p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás a CYP2E1 enzim indukciójára vezethető vissza [102]. A CYP2E1, amelynek jól ismert induktorai az etanol, az aceton vagy az isoniazid, katalizálja a p-nitrofenolon kívül az anilin hidroxilezését, valamint a nitrozodimetilamin N-demetilézését [59, 103].

A fenobarbitállal és dexametazonnal külön-külön kezelt állatokban az **anilin hidroxilezése** nem fokozódott a kezeletlen állatcsoporthoz képest, és nem mutatható ki aktivitás emelkedés a két vegyülettel együttesen kezelt csoportban sem (11. ábra). Összehasonlításként: az isoniazidot kapott állatok mikroszómális anilin hidroxiláz aktivitása a kezeletlen csoport 2,5-szeresére növekedett a CYP2E1 indukciójának következtében.

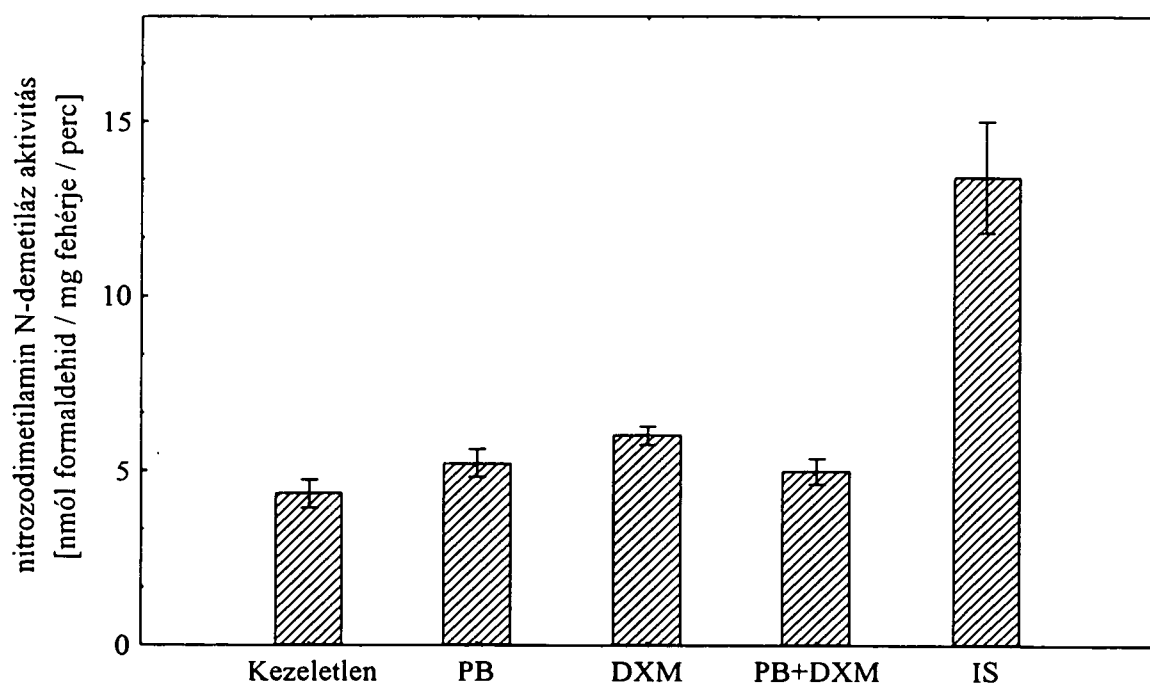
Hasonlóan, a **nitrozodimetilamin N-demetiláz** aktivitás -, amely szintén a CYP2E1 enzim által katalizált specifikus reakció, - sem mutatott szignifikáns növekedést a kettős indukció hatására a kezeletlen állatokhoz viszonyítva (12. ábra), míg az isoniazid-kezelés háromszoros emelkedést okozott a mikroszómális nitrozodimetilamin N-demetilézésében.

E két utóbbi CYP2E1 aktivitás, amely a kezeletlen állatok mikroszómális aktivitásához hasonló értékeket mutatott, nem támasztja alá azt a feltételezést,



**11. ábra:** Fenobarbitállal (PB) és dexametazonnal (DXM) külön-külön, illetve együttesen (PB+DXM) kezelt állatok mikroszómális **anilin hidroxiláz** aktivitása.

Összehasonlításként az ábra bemutatja az isoniazid (IS)-indukált patkányok enzimaktivitását is.



12. ábra: Fenobarbitállal (PB) és dexametazonnal (DXM) külön-külön, illetve együttesen (PB+DXM) kezelt állatok mikroszómális **nitrozodimetilamin N-demetiláz** aktivitása.

Összehasonlításként az ábra bemutatja az isoniazid (IS)-indukált patkányok enzimaktivitását is.



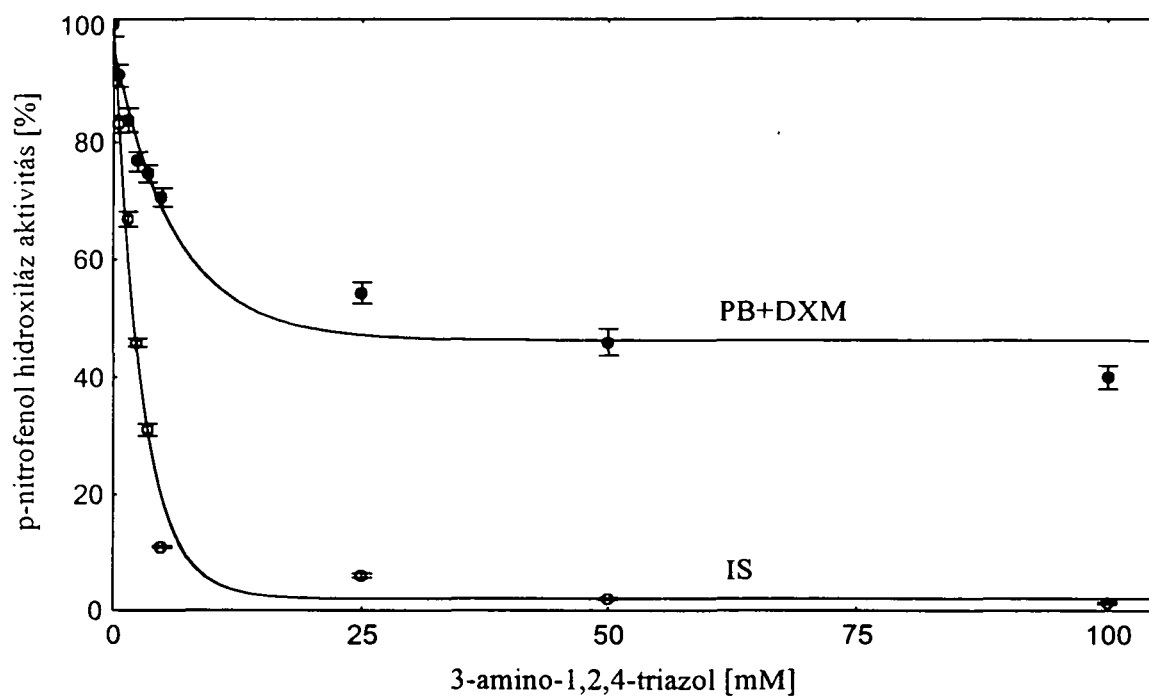
miszerint a fenobarbitál + dexametazonnal kezelt állatokban a megnövekedett p-nitrofenol hidroxiláz aktivitásért a CYP2E1 enzim lenne felelős.

#### 5.2.4. *p*-Nitrofenol hidroxiláz aktivitás gátlása 3-amino-1,2,4-triazollal

A fenobarbitál + dexametazon kezelés hatására megemelkedő p-nitrofenol hidroxiláz aktivitásból a CYP2E1 enzim indukciójára lehetne következtetni. Ezzel valamelyest ellentmondásban áll az a tény, hogy párhuzamosan sem az anilin hidroxiláz, sem a nitrozodimetilamin N-demetiláz aktivitásban nem történt változás. Felmerült a kérdés, hogy a kettős indukció hatására fokozódó p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás hátterében a CYP2E1 áll vajon, vagy más indukálódó citokróm P450 enzim(ek) is képes(ek) katalizálni a reakciót.

*Koop* szerint [104], etanol-kezelt nyulak mikroszómájának p-nitrofenol hidroxiláz aktivitása 90%-ban gátolható a CYP2E1-re specifikus 3-amino-1,2,4-triazollal. Saját vizsgálataink azt mutatták, hogy az isoniazid-indukált patkányok máj mikroszómális CYP2E1 aktivitása 95%-ban gátolható az említett herbiciddel (13. ábra). A maximális gátlás feléhez szükséges inhibitor koncentráció ( $I_{50}$ ) 3 mM.

Azonban a fenobarbitál + dexametazon indukció eredményeként megnövekedő p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás csak mindössze 60%-ban gátolható 3-amino-1,2,4-triazollal (13. ábra), azaz az említett aktivitás csak 60%-ban



13. ábra: A 3-amino-1,2,4-triazol p-nitrofenol hidroxilázt gátló hatása fenobarbitál + dexametazon (PB+DXM)-kezelt hím patkányok mikroszómáiban.

Összehasonlításul az isoniazid (IS)-indukált állatok máj mikroszómális p-nitrofenol hidroxiláz gátlását is bemutatja az ábra az inhibitor koncentráció függvényében. Az értékeket a gátlószer mentes aktivitás százalékában fejeztük ki.

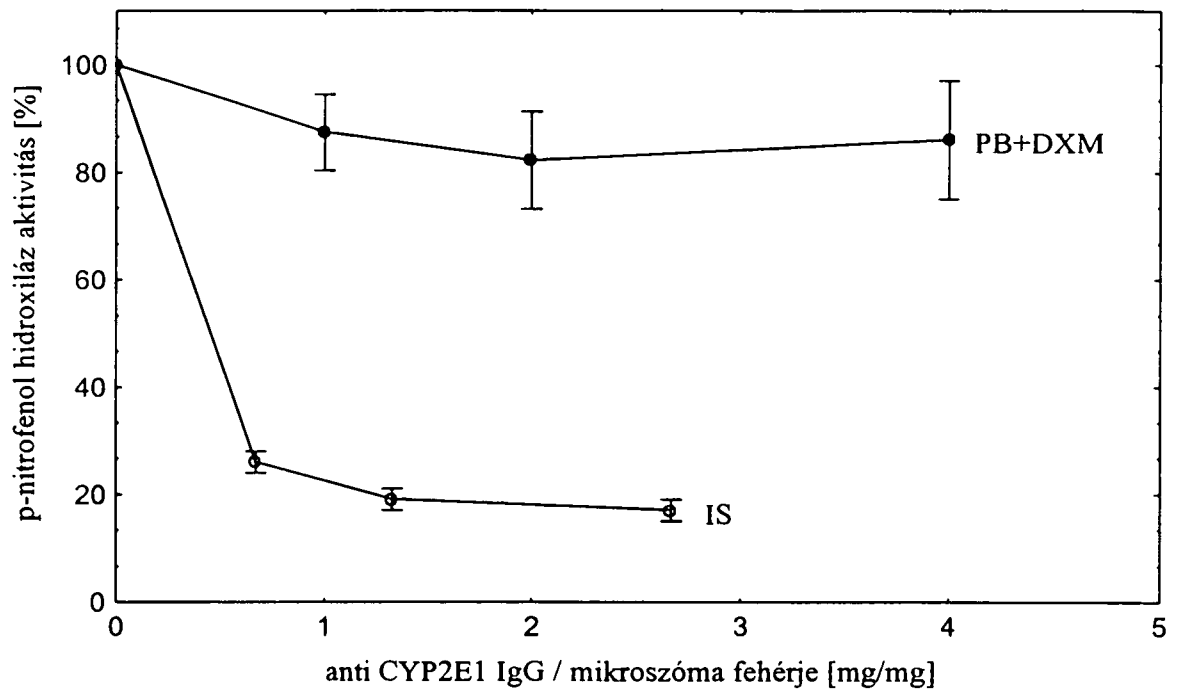
tulajdonítható a CYP2E1 enzimnek. A maximális gátlás feléhez szükséges inhibitor koncentráció 3 mM.

#### 5.2.5. *p*-Nitrofenol hidroxiláz aktivitás gátlása anti CYP2E1 IgG-vel

CYP2E1 ellen nyúlban termeltetett ellenanyag alkalmazásával igyekeztünk meghatározni a CYP2E1 enzim *p*-nitrofenol hidroxilezésében betöltött szerepét fenobarbitál + dexametazon kezelt állatok máj mikroszómájában. A CYP2E1-re specifikus poliklonális ellenanyagot a mikroszómális fehérje 1-4-szeres mennyiségében alkalmaztuk. A 14. ábra mutatja be a fenobarbitál + dexametazon, illetve az isoniazid-kezelt patkányok mikroszómális aktivitását anti CYP2E1 IgG jelenlétében.

Isoniazid-indukált állatok mikroszómájában az anti CYP2E1 IgG hatékonyan gátolta a *p*-nitrofenol hidroxiláz aktivitást; 80%-os aktivitás csökkenés figyelhető meg már 0,6 mg ellenanyag / mg mikroszómális fehérje arány esetén. Ezzel szemben a fenobarbitál + dexametazon-kezelt állatok mikroszómális *p*-nitrofenol hidroxiláz aktivitása még 4 mg ellenanyag / mg mikroszóma fehérje aránynál is csak nem egész 20%-kal csökkent.

Az ellentmondást azzal magyarázhatjuk, hogy az isoniazid hatására bekövetkező *p*-nitrofenol hidroxiláz aktivitás emelkedés szinte teljes egészében a CYP2E1 enzim indukciójának köszönhető, míg a fenobarbitál + dexametazont kapott patkányok



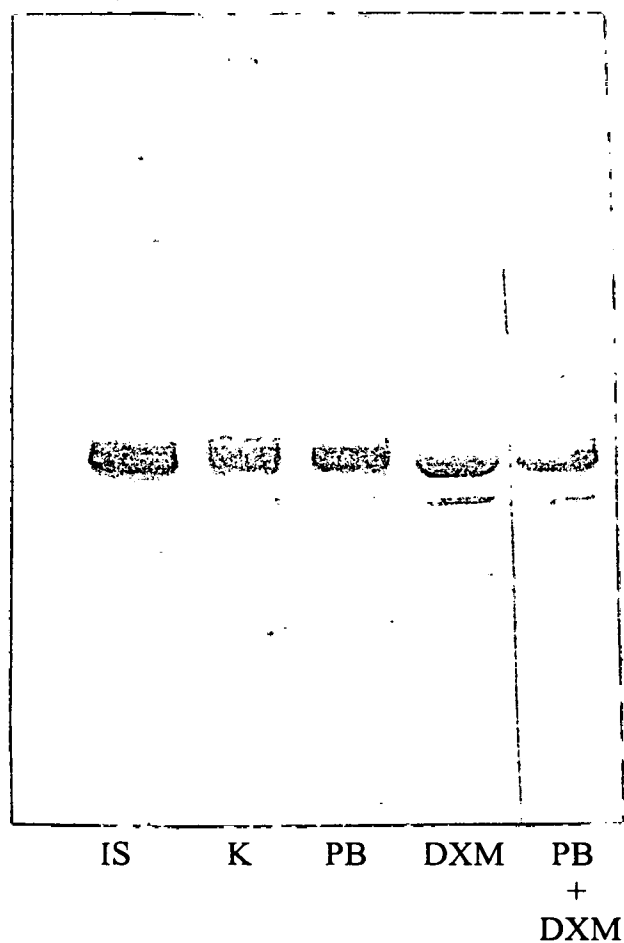
**14. ábra:** p-Nitrofenol hidroxiláz aktivitás gátlása anti CYP2E1 IgG-vel.

Az ábra bemutatja a fenobarbitál + dexametazon, valamint összehasonlításul az isoniazid-kezelt patkányok mikroszómális aktivitását növekvő koncentrációban alkalmazott anti CYP2E1 IgG jelenlétében. Az értékeket az ellenanyagot nem tartalmazó elegyben mért aktivitás százalékában fejeztük ki.

máj mikroszómájában fokozódó p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás azon része, amely akár az anti CYP2E1 IgG, akár a 3-amino-1,2,4-triazol jelenlétében is megmarad, valamely más. CYP2E1-től különböző citokróm P450 enzimnek tulajdonítható.

#### 5.2.6. *Western blot analízis*

Az előző pontban ismertetett eredmények jó összhangban vannak a mikroszómák *Western blot* analízise során tapasztaltakkal. A poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztott és nitrocellulóz lapra átjuttatott fehérjék közül immunokémiai festéssel határoztuk meg a CYP2E1 enzimet kezeletlen, fenobarbitállal és dexametazonnal külön-külön, illetve együttesen kezelt állatok mikroszómájában. Összehasonlításként isoniaziddal indukált állat mikroszómájának CYP2E1 tartalmát is vizsgáltuk. Az anti CYP2E1 IgG-vel specifikusan előhívott fehérje-sáv intenzitása azonosnak tekinthető a kezeletlen, illetve a fenobarbitál-, a dexametazon-, valamint a fenobarbitál + dexametazon-kezelt állatokból származó máj mikroszómában, de mennyisége lényegesen kisebb, mint az isoniazid-indukált állat mikroszómájának CYP2E1 tartalma. Vagyis a fenobarbitál + dexametazon kezelés nem emelte meg a CYP2E1 mikroszómális mennyiségét (15. ábra).



15. ábra: A mikroszóma preparátumok CYP2E1 tartalmának meghatározása *Western blot* analízissel.

IS: isoniazid-kezelt,

K: kezeletlen,

PB: fenobarbitál-kezelt,

DXM: dexametazon-kezelt,

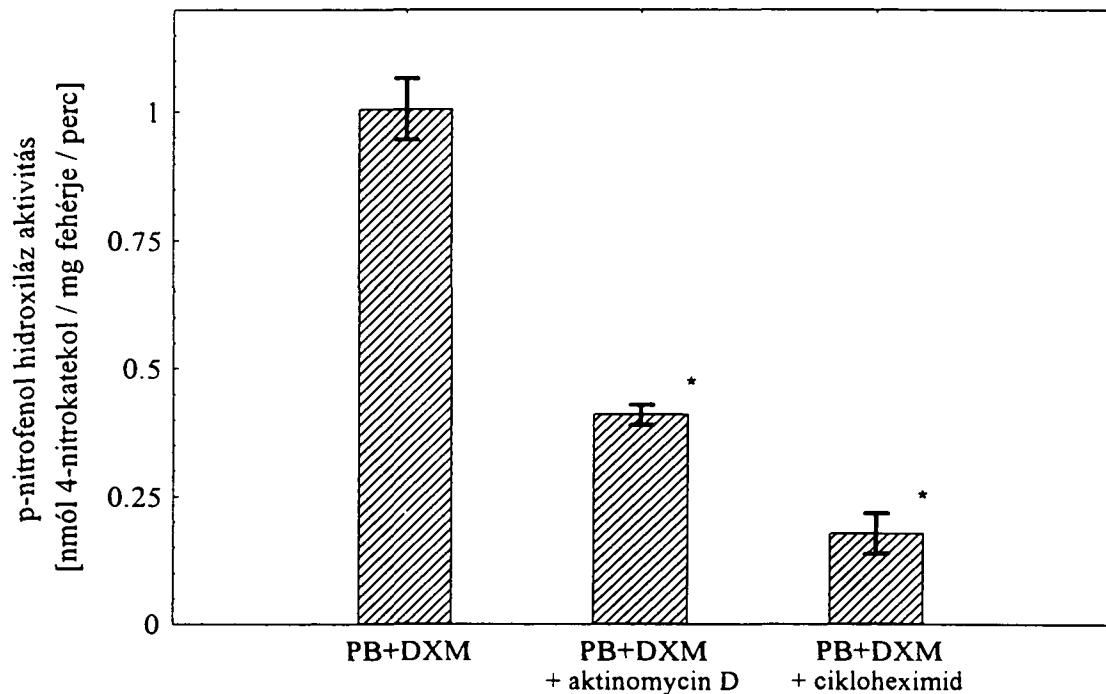
PB+DXM: fenobarbitál + dexametazon-kezelt állat mikroszómája.

### 5.3. Az indukció mechnizmusának tanulmányozása

Az aktinomycin D gátolja az RNS szintézist azáltal, hogy a DNS két citozin-guanin bázispárja közé ékelődik és megakadályozza, hogy a DNS az átíródásnál hatékony templátként működjön. A transláció-gátló cikloheximid eukariótákban a riboszómák 60S alegységéhez kötődve megakadályozza a peptidil-transzferáz enzim működését. E két gátlóanyag p-nitrofenol hidroxiláz enzim indukciójára gyakorolt hatását tanulmányoztuk fenobarbitál + dexametazon-kezelt állatokban. Célunk az volt, hogy meghatározzuk a fokozódó transzkripció, vagy transláció és ezzel az esetleges mRNS- vagy enzimfehérje-stabilizáló folyamatok szerepét az indukciós folyamatban.

Az állatokat egy napig kezeltük fenobarbitállal és dexametazonnal, mivel az indukció mértéke a kezeléstől számított 24 óra múltán már a három napos kezelés során kialakuló maximummal összevethető volt (7. ábra). A fenobarbitál + dexametazon mellett **aktinomycin D**-vel is kezelt állatok mikroszómális p-nitrofenol hidroxiláz aktivitása jelentősen (60%-kal) csökkent a kettős-kezelt patkány-csoporthoz viszonyítva. A fehérje szintézist gátló **cikloheximid** még nagyobb (80%-os) aktivitás csökkenést okozott a fenobarbitál + dexametazon-indukált állatokban (16. ábra).

Az eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a fenobarbitál + dexametazon kezelés okozta p-nitrofenol hidroxiláz enzim indukciója fokozódó transzkripció illetve *de novo* enzimfehérje szintézis eredményeként jön létre.



**16. ábra:** RNS- és fehérjeszintézist gátló anyagok (**aktinomycin D** és **cikloheximid**) hatása a fenobarbitál + dexametazon hatására kialakuló p-nitrofenol hidroxiláz enzim indukciójára.

A fenobarbitál + dexametazon kezelés mellett az aktinomycin D-t 2 mg/kg, a cikloheximidet 5 mg/kg dózisban i.p. alkalmaztuk, az állatokat egy napig kezeltük.



#### 5.4. Fenobarbitál + dexametazon kezelés hatása nőstény patkányok máj mikroszómális aktivitására

Felmerült a kérdés, hogy vajon a fenobarbitál + dexametazon kezelés okozta specifikus citokróm P450 aktivitás változásokban tapasztalható-e szexuális különbség, ezért a hím állatok mellett nőstény patkányoknál is megvizsgáltuk a kettős indukció hatását.

A hím állatok esetén kapott eredményekhez hasonlóan a fenobarbitál nőstényekben is indukálta a máj mikroszómális CYP2B enzimeket, amely a pentoxiresorufin O-dealkiláz aktivitás emelkedésében nyilvánult meg. Kiegészítésül meg kell jegyezni, hogy a nőstény patkányok máj mikroszómális CYP2B enzimeinek fenobarbitállal történő indukálhatósága nem olyan mértékű, mint a hím állatoké. A hímek 31-szeres pentoxiresorufin O-dealkiláz aktivitás emelkedésével szemben nőstényeknél csak 23-szoros aktivitás fokozódást tapasztaltunk (a kezeletlen állatcsoportokhoz viszonyítva). A fenobarbitált dexametazonnal együtt adva szintén erőteljes CYP2B aktivitás fokozódás mérhető, bár a pentoxiresorufin O-dealkilezés mértéke nem érte el a csak fenobarbitál-kezelt állatokét. Meg kell említeni még, hogy a hím állatoktól eltérően, nőstényekben kissé a dexametazon is indukálta a CYP2B aktivitását (a kezeletlen állatok aktivitásának 2,5-szeresére) (III. táblázat).

A CYP3A enzimek etilmorfin vagy aminopirin N-demetiláz aktivitásai közel 2-3-szoros növekedést mutattak akár fenobarbitállal vagy dexametazonnal külön-külön,

akár együttesen kezelt nőstény állatok mikroszómális aktivitásait viszonyítottuk a kezeletlen csoport értékeihez (III. táblázat).

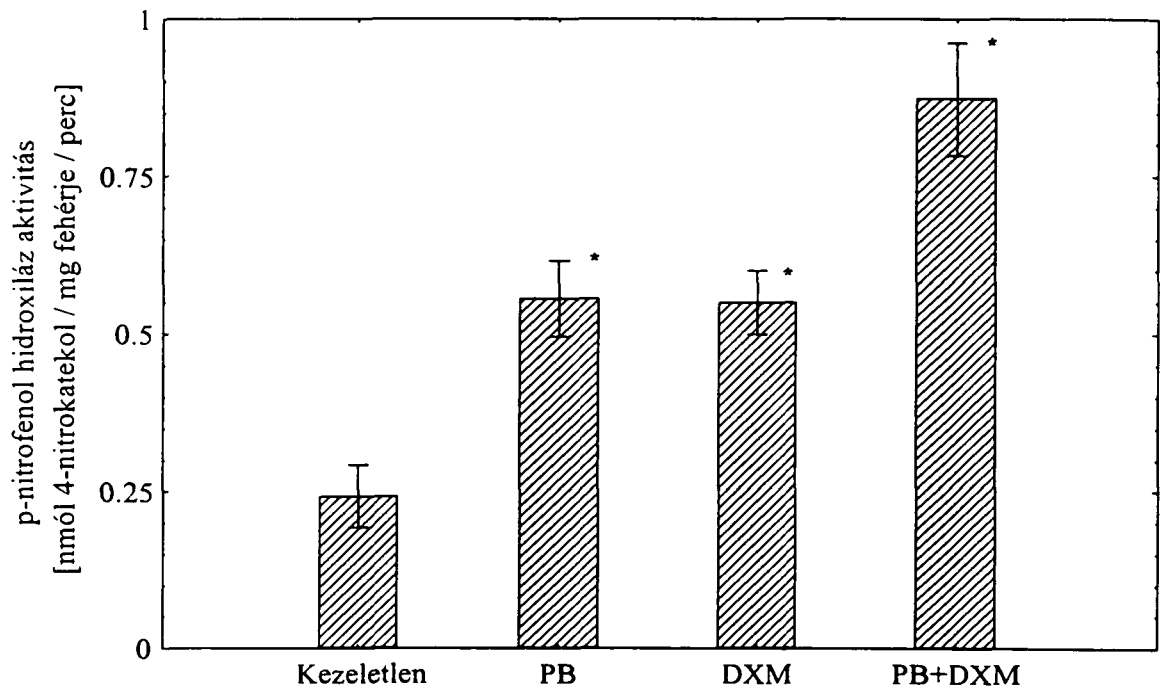
**III. táblázat:** Fenobarbitál + dexametazon (PB+DXM) kezelés hatása nőstény patkányok máj mikroszómális citokróm P450 (CYP2B és CYP3A) aktivitásaira. Összehasonlításként a fenobarbitál (PB) illetve dexametazon (DXM) okozta változásokat is bemutatja a táblázat. Az átlag értékek melletti \* a kezeletlen állatokhoz viszonyított szignifikáns változásokat jelöli.

	pentoxiresorufin O-dealkiláz <sup>a</sup>	etilmorfin N-demetiláz <sup>b</sup>	aminopirin
Kezeletlen (n=5)	4,63 ±0,55	3.024 ±0,85	3,577 ±1,02
PB (n=5)	106,8 ±5,3*	8,146 ±0,4*	7,193 ±0,5*
DXM (n=5)	11,96 ±3,0*	8,796 ±0,3*	6,487 ±0,3*
PB+DXM (n=5)	77,86 ±10,7*	7,956 ±0,38*	5,692 ±0,5*

a: pmól resorufin / mg fehérje / perc

b: nmól formaldehid / mg fehérje / perc

A kettős kezelés eredményei szerint fenobarbitál + dexametazon hatására a hím állatoknál tapasztalható p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás fokozódás megfigyelhető nőstény patkányok esetében is; a kezeletlen állatokhoz viszonyítva 3,6-szeres aktivitás emelkedést mértünk. Meg kell jegyezni, hogy a hím állatoktól eltérően a csak fenobarbitált illetve csak dexametazont kapott nőstény állatokban is megnövekedett a p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás. A kezeletlen csoporthoz



17. ábra: Fenobarbitállal (PB), valamint dexametazonnal (DXM) való külön-külön, illetve együttes (PB+DXM) kezelés hatása a máj mikroszómális p-nitrofenol hidroxiláz aktivitásra **nőstény** patkányokban.

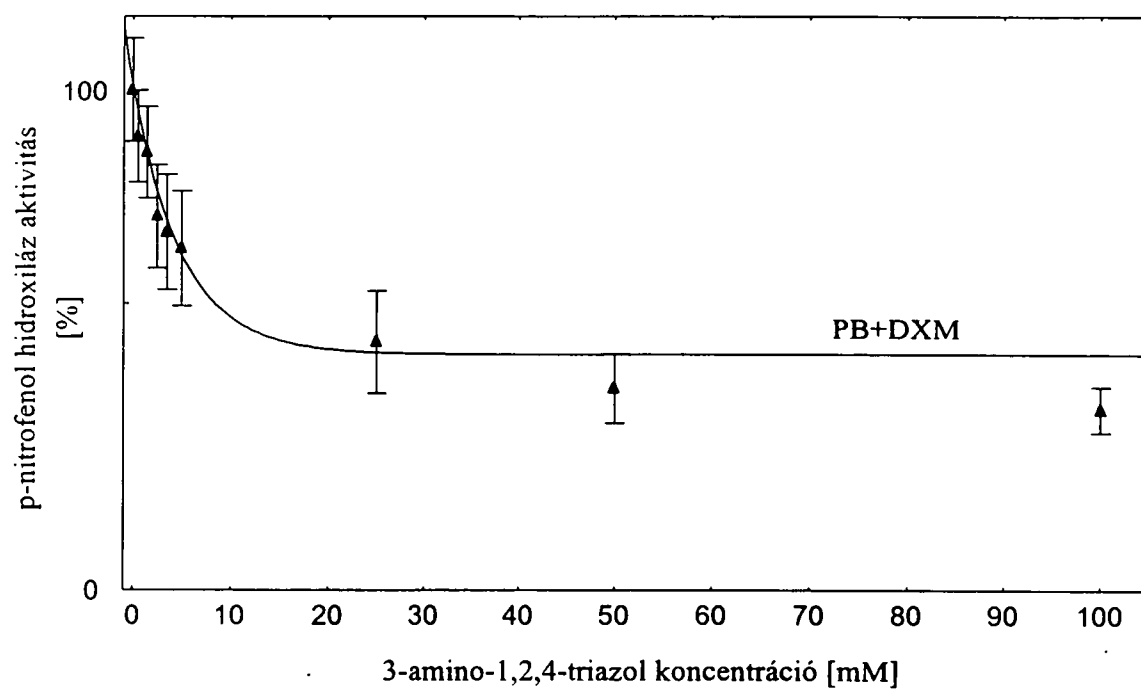
A kezeletlen csoporthoz viszonyítva szignifikáns eltéréseket ( $p < 0,01$ ) \*-gal jelöltük.

viszonyított kétszeres aktivitás fokozódás további szignifikáns emelkedést mutatott, ha a két vegyülettel együttesen kezeltük a nőstény állatokat (17. ábra).

Ugyanakkor sem az anilin hidroxiláz, sem a nitrozodimetilamin N-demetiláz aktivitás nem változott; vagyis a fenobarbitállal vagy dexametazonnal külön-külön illetve együttesen kezelt nőstények utóbb említett CYP2E1 aktivitásai a kezeletlen csoportban mérhető értékeket mutatták. (A számszerű vagy grafikus adatok bemutatásától eltekintünk, lévén az eredmények igen hasonlóak a hím állatoknál mért értékekhez).

Fenobarbitál + dexametazon kezelés hatására a nőstény patkányok máj mikroszómáiban megemelkedő p-nitrofenol hidroxiláz aktivitást a 3-amino-1,2,4-triazol, mint specifikus CYP2E1 inhibitor, 60%-ban gátolta (18. ábra), hasonlóan a hím állatoknál kapott gátlás vizsgálat eredményeihez. A maximális gátlás feléhez szükséges inhibitor koncentráció ( $I_{50}$ ) 3 mM.

A hím és nőstény állatokkal kapcsolatban bemutatott kísérleti eredményeket összehasonlítva azt mondhatjuk, hogy a fenobarbitál + dexametazon indukció hatására mindkét nemben megjelenik egy olyan enzim, amely képes a p-nitrofenolt hidroxilezni és feltehetőleg nem azonos a CYP2E1-el, hiszen annak specifikus inhibitora nem gátolja teljesen a p-nitrofenol hidroxiláz aktivitást. Megállapíthatjuk, hogy a jelenség nem mutat szexuális különbségeket.



18. ábra: A 3-amino-1,2,4-triazol p-nitrofenol hidroxiláz aktivitást gátló hatása fenobarbitál + dexametazon (PB+DXM) kezelt **nőstény** patkányok mikroszómáiban.

Az értékeket a gátlószer mentes aktivitás százalékában fejeztük ki.

### 5.5. Egyéb CYP3A induktorokkal végzett kettős indukciós vizsgálatok

Az előzőekben (5.1.-5.4.) bemutatásra kerültek a fenobarbitál + dexametazon indukció okozta citokróm P450 enzimaktivitás változások; ezenkívül kísérletet tettünk a kettős kezelés hatására indukálódó enzim(ek) egyes tulajdonságainak meghatározására. Felmerült bennünk, hogy vajon kizárólag a fenobarbitál + dexametazon kombináció képes a bemutatott jelenséget kiváltani, avagy más vegyületek is okozhatnak hasonló változásokat. A fenobarbitált flumecinnal (Zixoryn®) helyettesítve megvizsgáltuk a dexametazonnal együttesen kifejtett indukciós hatást. A flumecinol fenobarbitál-típusú induktorként viselkedik, a CYP2B és a CYP3A enzimeket indukálja.

#### *5.5.1. Flumecinol (Zixoryn®) + dexametazon hatására bekövetkező citokróm P450 indukció*

A **flumecinnal dexametazonnal** együtt beadva hím patkányoknak a mikroszómális CYP2B és CYP3A aktivitások a flumecinnal illetve dexametazont külön-külön kapott állatok mért értékeihez igazodnak, - azaz a pentoxi-resorufin O-dealkiláz aktivitás 13-szoros, az etilmorfin és aminopirin N-demetiláz pedig kétszeres emelkedést mutat a kezeletlen állatcsoportéhoz képest (IV. táblázat). Érdeemes megemlíteni, hogy a flumecinol hatására bekövetkező 12-szeres pentoxiresorufin O-dealkiláz aktivitás növekedésével szemben a fenobarbitál 31-szeresre emelte a

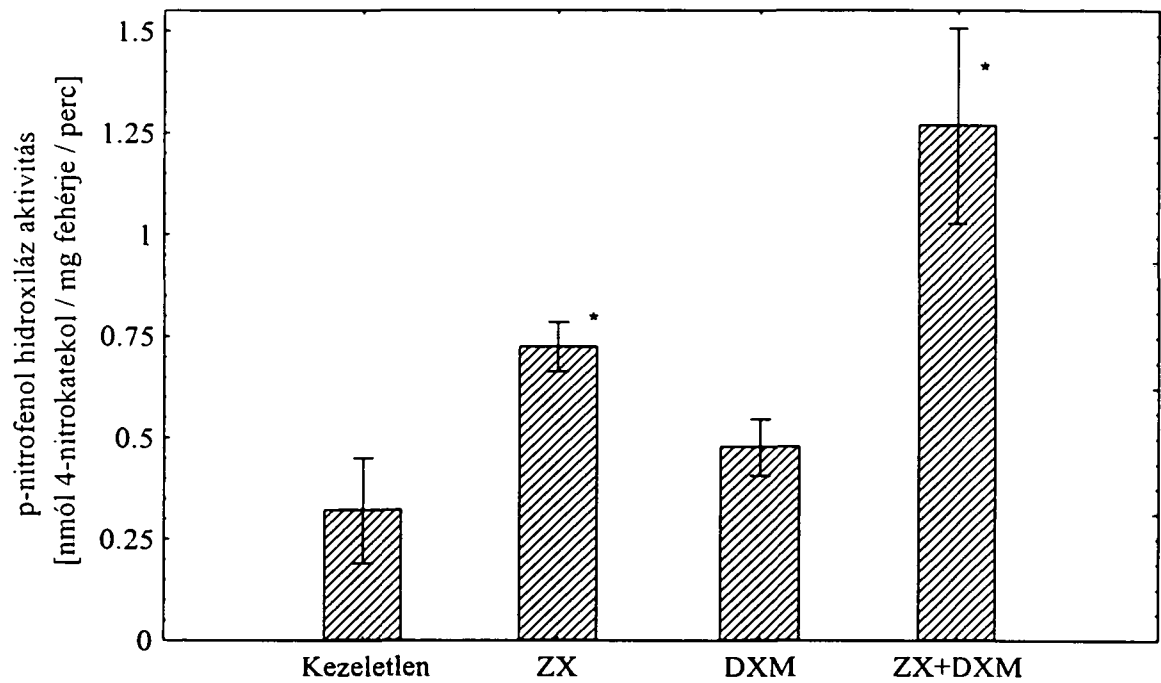
CYP2B aktivitását, amiből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a flumecinol nem olyan hatékony CYP2B induktor, mint a fenobarbitál.

**IV. táblázat Flumecinol: (Zixoryn®) + dexametazon (ZX+DXM) kezelés hatása** hím patkányok máj mikroszómális citokróom P450 (CYP2B és CYP3A) aktivitásaira. Összehasonlításként a Zixoryn® (ZX) illetve dexametazon (DXM) okozta változásokat is bemutatja a táblázat. Az átlag értékek melletti \* a kezeletlen állatokhoz viszonyított szignifikáns változásokat jelöli.

	pentoxiresorufin O-dealkiláz <sup>a</sup>	etilmorfin N-demetiláz <sup>b</sup>	aminopirin
Kezeletlen (n=11)	4,8 ±0,8	3,735 ±0,8	3,358 ±0,6
ZX (n=10)	57,4 ±10,0*	7,906 ±0,7*	7,019 ±0,7*
DXM (n=5)	4,5 ±1,0	8,135 ±0,4*	7,546 ±0,2*
ZX+DXM (n=7)	63,4 ±10,0*	7,497 ±0,6*	7,755 ±0,9*

a: pmól resorufin / mg fehérje / perc  
b: nmól formaldehid / mg fehérje / perc

A flumecinol + dexametazon-kezelés okozta **p-nitrofenol hidroxiláz** aktivitás közel négyszeres emelkedéséből (19. ábra) úgy tűnik, hogy a fenobarbitál + dexametazon-indukció során kapott eredmények nem kizárólag ez utóbbi két vegyület kombinációjának tulajdoníthatók. Igaz ugyan, hogy a flumecinol önmagában is képes a p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás kétszeres fokozására, dexametazonnal együtt viszont további emelkedést figyelhetünk meg.



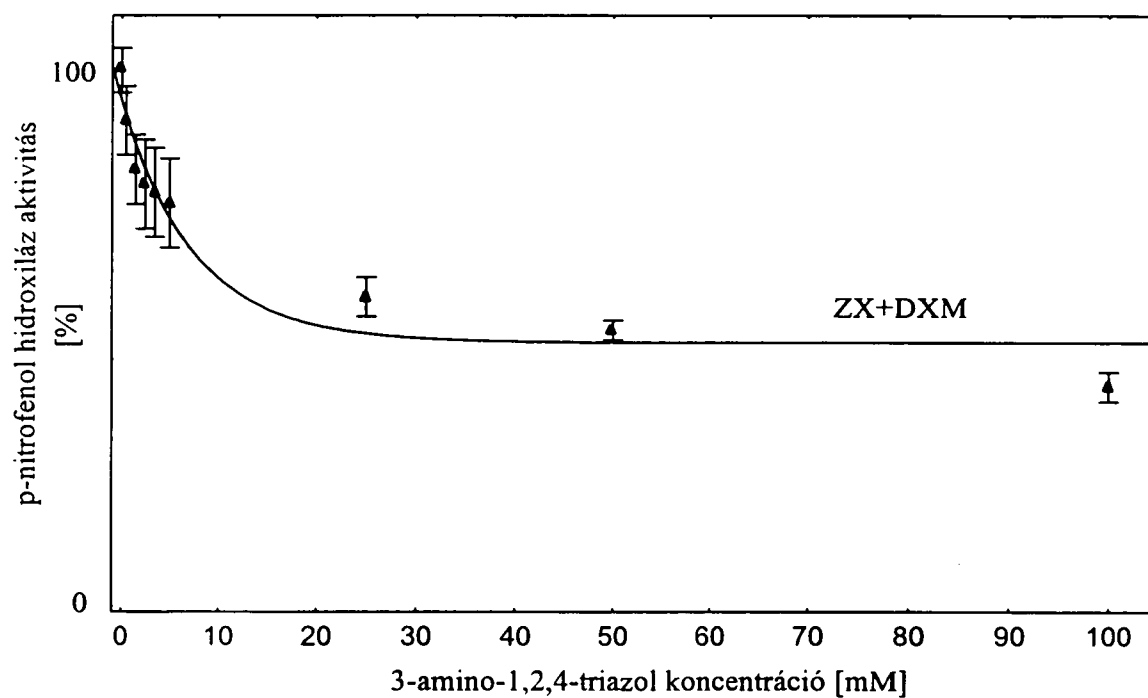
19. ábra: Flumecínolt (Zixoryn®, ZX) és dexametazont (DXM) önmagában, illetve együtt (ZX+DXM) kapott hím patkányok **p-nitrofenol hidroxiláz** aktivitása.

\*: a kezeletlen patkányokhoz viszonyítva szignifikáns ( $p < 0,01$ ) változás.



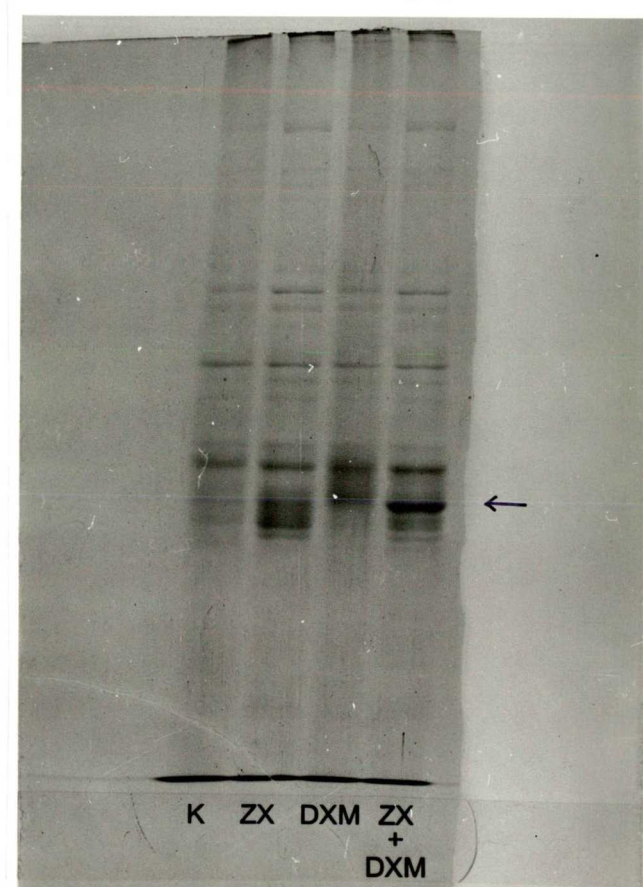
A CYP2E1 enzim katalizálta anilin hidroxiláz és nitrozodimetilamin N-demetiláz aktivitások a flumecínolt és dexametazont külön-külön, illetve együtt kapott állatokban azonosnak mutatkoztak; a kezeletlen patkányokhoz képest nem történt fokozódás ezen CYP2E1 aktivitások esetén, ami azt sugallja, hogy a p-nitrofenol hidroxilezésében mérhető aktivitás emelkedés nem a CYP2E1 indukciójának tulajdonítható. Ezt támasztja alá a 3-amino-1,2,4-triazollal végzett gátlás vizsgálat is. A CYP2E1-re specifikus inhibitor a p-nitrofenol hidroxiláz aktivitást 60%-ban gátolta (20. ábra); a gátlás mértéke a fenobarbitál + dexametazon-kezelt patkányoknál kapott eredményekkel (5.2.4., 13. ábra) azonos képet mutatott. A maximális gátlás feléhez szükséges inhibitor koncentráció 3 mM.

A flumecínolt és dexametazont önmagában, illetve együtt kapott állatok mikroszómájának SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (21. ábra) meghatározott fehérje-összetételét a fenobarbitál-, a dexametazon- valamint a fenobarbitál + dexametazon-kezelt csoportok mikroszómájával (9a. ábra) azonosnak találtuk. A flumecínol + dexametazon hatására indukálódott enzimfehérje intenzív sávként jelenik meg festés után a gélben; molekulatömege 53.000 dalton.



20. ábra: A 3-amino-1,2,4-triazol p-nitrofenol hidroxiláz aktivitást gátló hatása flumecinol (Zixoryn®) + dexametazon-kezelt állatok (ZX+DXM) mikroszómájában.

Az értékeket a gátló anyag mentes aktivitás százalékában fejeztük ki.



21. ábra: Flumecinolt (Zixorin<sup>®</sup>, ZX) és dexametazont (DXM) önmagában, illetve együttesen (ZX+DXM) kapott állatok máj mikroszómájának SDS-poliakrilamid gélelektroforetikus képe.

K: kezeletlen állat mikroszómájának összetétele.

## 5.6. Összegzés

A vizsgálatok eredményeit összegezve a következő megállapításokat tehetjük:

1. A fenobarbitált és a dexametazont (a két CYP3A induktor vegyületet) együtt beadva patkányoknak a máj mikroszómális CYP3A enzim aktivitásaiban (etilmorfin és aminopirin N-demetiláz) nem következnek be változások a csak fenobarbitállal vagy csak dexametazonnal kezelt állatok aktivitásaihoz képest, vagyis nem adódik össze a két vegyület által okozott indukció.
2. A fenobarbitál + dexametazon kezelés a mikroszómális p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás több, mint háromszoros emelkedését okozza a kezeletlen állatokhoz viszonyítva, míg sem a fenobarbitál, sem a dexametazon önmagában nem képes hasonló aktivitás fokozásra.
3. A fenobarbitál + dexametazon hatására igen hamar bekövetkezik az indukció, az első kezeléstől eltelt 24 óra múltán már jelentős (háromszoros) p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás növekedést tapasztalhatunk.
4. A megemelkedett p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás hátterében citokróm P450 enzim áll, mivel működése szénmonoxiddal gátolható.
5. A fenobarbitál + dexametazon hatására indukálódó enzim molekulatömege 53.000 dalton.

6. A fokozódó p-nitrofenol hidroxiláz aktivitás a CYP2E1 indukcióját sejteti, azonban ennek ellentmondanak azok a tények, miszerint az anilin hidroxilezésére, illetve a nitrozodimetilamin N-demetilezésére (a CYP2E1-re specifikus reakciókra) a fenobarbitál + dexametazon-indukált patkányból származó mikroszóma csak a kezeletlen állatok mikroszómális aktivitásainak megfelelő szinten képes. Ezenkívül a CYP2E1-re specifikus inhibitor, a 3-amino-1,2,4-triazol, illetve az anti CYP2E1 IgG nem gátolja teljesen a p-nitrofenol hidroxiláz aktivitást. Sőt a mikroszóma *Western blot* analízise szerint a fenobarbitál + dexametazon-indukált állatból származó preparátum CYP2E1 tartalma hasonló a kezeletlen állatéhoz.

Tehát nem a CYP2E1 felelős a megemelkedett p-nitrofenol hidroxiláz aktivitásért, amiből az is következik, hogy a p-nitrofenol hidroxilezését nem csak a CYP2E1 enzim képes katalizálni.

7. A kettős kezelés hatására bekövetkező p-nitrofenol hidroxiláz enzim indukciója hasonló a hím és nőstény patkányokban, azaz a jelenség nem mutat szexuális különbségeket.
8. A fenobarbitálon kívül a flumecinol (Zixoryn®) is képes a dexametazonnal együttesen a p-nitrofenol hidroxiláz enzim indukcióját kiváltani. Vagyis nem kizárólag a fenobarbitál és a dexametazon kombinációja rendelkezik az említett képességgel.

### 5.7. Summary

1. Phenobarbital and dexamethasone are potent inducers of CYP3A, the glucocorticoid inducible cytochrome P450 enzymes. After treatment with any of these two compounds, ethylmorphine or aminopyrine N-demethylation, the specific activities of CYP3A are increased about twofold in rat liver microsomes comparing to untreated animals. If the mechanism of CYP3A induction caused by phenobarbital and dexamethasone is different, additive effect may be expected in CYP3A activities of liver microsomes from rats coadministered phenobarbital+dexamethasone. The results showed that the effect of coinduction did not differ from that of the treatment with phenobarbital or dexamethasone alone; coadministration of phenobarbital and dexamethasone caused similar elevation of CYP3A activities as it could be seen in the groups of rats treated with phenobarbital or dexamethasone alone.

2. Phenobarbital or dexamethasone are not able to lift p-nitrophenol hydroxylase activity of CYP2E1. However, rats treated with phenobarbital and dexamethasone in combination showed threefold increase in p-nitrophenol hydroxylation. The threefold induction was detected after the first 24 hours from the coadministration.

3. Cytochrome P450 enzyme is in the background of elevated p-nitrophenol hydroxylation, as its activity could be inhibited by CO.

4. Molecular weight of the enzyme induced by phenobarbital + dexamethasone is measured 53.000 dalton as determined with SDS-polyakrilamid gel electrophoresis.

5. p-Nitrophenol hydroxylation assay is considered to be an indicator of participation of CYP2E1. Although aniline hydroxylation and N-nitrosodimethylamine N-demethylation (the specific activities of CYP2E1) in liver microsomes from phenobarbital + dexamethasone treated rats were on the same level as in the microsomes of untreated animals. Furthermore, the specific inhibitor of CYP2E1, 3-amino-1,2,4-triazole or anti CYP2E1 IgG could not inhibited completely p-nitrophenol hydroxylation. Western blot analysis displayed that the microsomes from phenobarbital + dexamethasone induced rats had similar content of CYP2E1 as those from untreated animals.

CYP2E1 is not responsible for the threefold increase of p-nitrophenol hydroxylation in the microsomes of phenobarbital + dexamethasone treated rats. The conclusion can be drawn that CYP2E1 is not the only one which can catalyse p-nitrophenol hydroxylation.

6. The effect of double induction with phenobarbital and dexamethasone is similar both in male and female rats.

7. Flumecinol (Zixoryn<sup>®</sup>) + dexamethasone can produce the same induction of p-nitrophenol hydroxylation as phenobarbital + dexamethasone. (Flumecinol is a 'phenobarbital-type' inducer.) So the ability of the induction is not possessed by phenobarbital + dexamethasone combination alone.

## 6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Schenkman, J.B.: Handbook of Experimental Pharmacology: Cytochrome P450. vol. 105. (szerk. Schenkman, J.B., Greim, H.) Springer-Verlag, Berlin, 3-13 (1993).
2. Porter, T.D., Coon, M.J.: J. Biol. Chem. 266, 13469-13472 (1991).
3. Waxman, D.J.: Cytochrome P-450: Structure, Mechanism an Biochemistry (szerk. Ortiz de Montellano, P.R.) Plenum Press, New York, 525-539 (1986).
4. Philpot, R.M.: Methods in Enzymology: Cytochrome P450 (szerk. Waterman, M.R., Johnson, E.F.) vol. 206, Academic Press, Inc., San Diego, 623-631 (1991).
5. Omura, T., Siekevitz, P., Palade, G.E.: J. Biol. Chem. 242, 2389-2396 (1967).
6. Kinoshita, T., Horie, S., Shimazono, N., Yohro, T.: J. Biochem. 60, 391-404 (1966).
7. Omura, T., Sato, R.: J. Biol. Chem. 239, 2370-2378 (1964).
8. Omura, T., Sato, R.: J. Biol. Chem. 239, 2379-2385 (1964).
9. Sono, M., Andersson, L.A., Dawson, J.H.: J. Biol. Chem. 257, 8308-8320 (1982).
10. Ozols, J., Heinemann, F.S., Johnson, E.F.: J. Biol. Chem. 256, 11405-11408 (1981).
11. Haugen, D.A., Armes, L.G., Yasunobu, K.T., Coon, M.J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 967-973 (1977).



12. Black, S.D., Coon, M.J.: *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 60, 35-87 (1987).
13. Black, S.D., Coon, M.J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128, 82-89 (1985).
14. Poulos, T.L., Finzel, B.C., Gunsalus, I.C., Wagner, G.C., Kraut, J.: *J. Biol. Chem.* 260, 16122-16130 (1985).
15. Poulos, T.L., Finzel, B.C., Howard, A.J.: *Biochemistry* 25, 5314-5322 (1986).
16. Fujii-Kuriyama, Y., Kimura, H., Higashi, Y., Sogawa, K., Shimizu, T., Hatano, M., Gotoh, O.: *Xenobiotic Metabolism and Disposition* (szerk. Kato, R., Estabrook, R.W., Cayen, M.N.) Taylor & Francis, London, 11-19 (1989).
17. Uvarov, V.Yu., Degtyarenko, K.N., Sotnichenko, A.I., Vodovozova, E.L., Molotkovsky, Jul.G., Bergelson, L.D., Archakov, A.I., Stier, A., Krüger, V.: *Cytochrome P-450: Biochemistry and Biophysics* (szerk. Archakov, A.I., Bachmanova, G.I.) INCO-TNC., Moskva, 739-743 (1992).
18. Black, S.D.: *FASEB J.* 6, 680-685 (1992).
19. White, R.E., Coon, M.J.: *Ann. Rev. Biochem.* 49, 315-356 (1980).
20. Guengerich, F.P.: *J. Biol. Chem.* 266, 10019-10022 (1991).
21. Lewis, D.F.V.: *Drug Metab. Rev.* 17, 1-66 (1986).
22. Groves, J.T., Watanabe, Y.: *J. Am. Chem. Soc.* 108, 7834-7836 (1986).
23. Ortiz de Montellano, P.R.: *Cytochrome P-450: Structure, Mechanism and Biochemistry* (szerk. Ortiz de Montellano, P.R.) Plenum Press, New York, 217-271 (1986).
24. Hollenberg, P.F.: *FASEB J.* 6, 686-694 (1992).
25. Guengerich, F.P., MacDonald, T.L.: *FASEB J.* 4, 2453-2459 (1990).

26. Guengerich, F.P. Shimada, T.: Human Drug Metabolism (szerk. Jeffery, E.H.)  
CRC Press, Boca Raton, 5-12 (1993).
27. Remmer, H., Merker, H.J.: Science, 142, 1657-1658 (1963).
28. Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyereisen, R.,  
Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C.,  
Johnson, E.F., Loper, J.C., Sato, R., Waterman, M.R., Waxman, D.J.: DNA  
Cell Biol. 10, 1-14 (1991).
29. Gonzalez, F.J.: Pharmacol. Rev. 40, 243-288 (1989).
30. Waterman, M.R., John, M.E., Simpson, E.R.: Cytochrome P-450: Structure,  
Mechanism and Biochemistry (szerk. Ortiz de Montellano, P.R.) Plenum  
Press, London, 345-386 (1986).
31. MacKenzie, P.I.: Frontiers in Biotransformation (szerk. Ruckpaul, K., Rein, H.)  
vol. 2, Akademie-verlag, Berlin, 211-243 (1990).
32. Ketterer, B., Taylor, J.B.: Frontiers in Biotransformation (szerk. Ruckpaul, K.,  
Rein, H.) vol. 2, Akademie-Verlag, Berlin, 244-277 (1990).
33. Okey, A.B.: Pharmac. Ther. 45, 241-298 (1990).
34. Burke, M.D., Thompson, S., Elcombe, C.R., Halpert, J., Haaparanta, T., Mayer,  
R.T.: Biochem. Pharmacol. 34, 3337-3345 (1985).
35. Kamataki, T., Ando, M., Yamazoe, Y., Ishii, K., Kato, R.: Biochem.  
Pharmacol. 29, 1015-1022 (1980).
36. Denison, M.S., Vella, L.M., Okey, A.B.: J. Biol. Chem. 261, 3987-3995 (1986).
37. Perdew, G.H.: J. Biol. Chem. 263, 13802-13805 (1988).
38. Gonzalez, F.J., Tukey, R.H., Nebert, D.W.: Mol. Pharmacol. 26, 117-121  
(1984).

39. Fujii-Kuriyama, Y., Imataka, H., Sogawa, K., Yasumoto, K.-I., Kikuchi, Y.:  
FASEB J. 6, 706-710 (1992).
40. Nebert, D.W.: Cytochrome P-450: Biochemistry and Biophysics (szerk.  
Schuster, I.), Taylor & Francis, London, 484-490 (1989).
41. Elferink, C.J., Whitlock, J.P. Jr: J. Biol. Chem. 265, 5718-5722 (1990).
42. Bresnick, E.: Handbook of Experimental Pharmacology: Cytochrome P450, vol.  
105 (szerk. Schenkman, J.B., Greim, H.), Springer-Verlag, Berlin, 503-524  
(1993).
43. Pasco, D.S., Boyum, K.W., Merchant, S.N., Chalberg, S.C., Fagan, J.B.: J.  
Biol. Chem. 263, 8671-8676 (1988).
44. Adesnik, M., Bar-Nur, S., Mashio, F., Zunich, M., Lippman, A., Bard, E.: J.  
Biol. Chem. 256, 10340-10345 (1981).
45. Atchison, M., Adesnik, M.: J. Biol. Chem. 258, 11285-11295 (1983).
46. Kumar, A., Satyanarayana Rao, M.R., Padmanaban, G.: Biochem. J. 186, 81-87  
(1980).
47. Traber, P.G., Chianale, J., Florence, R., Kim, K., Wojcik, E., Gumcecio, J.J.: J.  
Biol. Chem. 263, 9449-9455 (1988).
48. Tierney, B., Bresnick, E.: Arch. Biochem. Biophys. 210, 729-739 (1981).
49. Waxman, D.J., Azaroff, L.: Biochem. J. 281, 577-592 (1992).
50. Yamazoe, Y., Shimada, M., Murayama, N., Kato, R.: J. Biol. Chem. 262, 7423-  
7428 (1987).
51. Terelius, Y., Ingelman-Sundberg, M.: Cytochrome P-450: Biochemistry and  
Biophysics (szerk. Schuster, I.) Taylor & Francis, London, 608-611 (1989).

52. Koop, D.R., Nordblom, G.D., Coon, M.J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 235, 228-238 (1984).
53. Morgan, E.T., Koop, D.R., Coon, M.J.: *J. Biol. Chem.* 257, 13951-13957 (1982).
54. Koop, D.R.: *FASEB J.* 6, 724-730 (1992).
55. Ryan, D.E., Ramanathan, L., Iida, S., Thomas, P.E., Haniu, M., Shively, J.E., Lieber, C.S., Levin, W.: *J. Biol. Chem.* 260, 6385-6393 (1985).
56. Koop, D.R., Coon, M.J.: *Mol. Pharmacol.* 25, 494-501 (1984).
57. Koop, D.R., Casazza, J.P.: *J. Biol. Chem.* 260, 13607-13612 (1985).
58. Umeno, M., Song, B.J., Kozak, C., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J.: *J. Biol. Chem.* 263, 4956-4962 (1988).
59. Song, B.-J., Gelboin, H.V., Park, S.S., Yang, C.S., Gonzalez, F.J.: *J. Biol. Chem.*, 261, 16689-16697 (1986).
60. Eliasson, E., Johansson, I., Ingelman-Sundberg, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 436-443 (1988).
61. Eliasson, I., Johansson, I., Ingelman-Sundberg, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3225-3229 (1990).
62. Taniguchi, H., Pyerin, W., Stier, A.: *Biochem. Pharmacol.* 34, 1835-1837 (1985).
63. Porter, T.D., Khani, S.C., Coon, M.J.: *Mol. Pharmacol.* 36, 61-65 (1989).
64. Johansson, I., Eliasson, E., Ingelman-Sundberg, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 37-42 (1991).
65. Hong, J., Pan, J., Gonzalez, F.J., Gelboin, H.V., Yang, C.S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 1077-1083 (1987).

66. Johansson, I., Ekström, G., Scholte, B., Puzycki, D., Jörnvall, H., Ingelman-Sundberg, M.: *Biochemistry* 27, 1925-1934 (1988).
67. Johansson, I., Lindros, K.O., Eriksson, H., Ingelman-Sundberg, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 331-338 (1990).
68. Bellward, G.D., Chang, T., Rodrigues, B., McNeil, J.H., Maines, S., Ryan, D.E., Levin, W., Thomas, P.E.: *Mol. Pharmacol.* 33, 140-143 (1988).
69. Song, B.J., Matsunaga, T., Hardwick, J.P., Park, S.S., Veech, R.L., Yang, C.S., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J.: *Mol. Endocrinol.* 8, 542-547 (1987).
70. Koop, D.R., Tierney, D.J.: *BioEssays* 12, 429-435 (1990).
71. Heuman, D.M., Gallagher, E.J., Barwick, J.L., Elshourbagy, N.A., Guzelian, P.S.: *Mol. Pharmacol.* 21, 753-760 (1982).
72. Wrighton, S.A., Maurel, P., Schuetz, E.G., Watkins, P.B., Young, B., Guzelian, P.S.: *Biochemistry* 24, 2171-2178 (1985).
73. Sartori, E., Delaforge, M., Mansuy, D., Beaune, P.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128, 1434-1439 (1985).
74. Schuetz, E.G., Wrighton, S.A., Safe, S.H., Guzelian, P.S.: *Biochemistry* 25, 1124-1133 (1986).
75. Hardwick, J.P., Gonzalez, F.J., Kasper, C.B.: *J. Biol. Chem.* 258, 10182-10186 (1983).
76. Simmons, D.L., McQuiddy, P., Kasper, C.B.: *J. Biol. Chem.* 262, 326-332 (1987).
77. Ribeiro, V.L., Lechner, M.C.: *Arch. Biochem. Biophys.* 293, 147-152 (1992).
78. Nagata, K., Gonzalez, F.J., Yamazoe, Y., Kato, R.: *J. Biochem.* 107, 718-725 (1990).

79. Pereira, T., Lechner, M.C.: Cytochrome P450 (szerk. Lechner, M.C.) John Libbey Eurotext, Párizs, 837-840 (1994).
80. Schuetz, E.G., Wrighton, S.A., Barwick, J.L., Guzelian, P.S.: J. Biol. Chem. 259, 1999-2006 (1984).
81. Schuetz, E.G., Guzelian, P.S.: J. Biol. Chem. 259, 2007-2012 (1984).
82. Burger, H.-J., Schutz, D.J., Schuetz, E.G., Guzelian, P.S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 2145-2149 (1992).
83. Perlmann, T.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 3884-3888 (1992).
84. Namkung, M.J., Yang, H.L., Hulla, J.E. Juchau, M.R.: Mol. Pharmacol. 34, 628-637 (1988).
85. Parke, D.V.: Frontiers in Biotransformation: Principles, Mechanism and Biological Consequences of Induction (szerk. Ruckpaul, K., Rein, H.) Akademie-Verlag, Berlin, vol. 2. 1-34 (1990).
86. Rettie, A.E., Rettenmeier, A.W., Howald, W.N., Baillie, T.A.: Science 235, 890-893 (1987).
87. Ioannides, C., Parke, D.V.: Biochem. Pharmacol. 36, 4197-4207 (1987).
88. Ioannides, C.: Biochem. Soc. Transact. 18, 32-34 (1990).
89. Guengerich, F.P., Kim, D.-H., Iwasaki, M.: Chem. Res. Toxicol. 4, 168-179 (1991).
90. Manchester, D.K.: Biochem. Pharmacol. 30, 756-762 (1981).
91. Bendzko, P., Vereczkey, L., Friedrich, J., Schwarze, W., Ruckpaul, K.: Cytochrome P-450, Biochemistry, Biophysics and Induction (szerk. Vereczkey, L., Magyar, K.) Akadémiai Kiadó, Budapest, 261-268 (1985).

92. Gachályi, B.: Cytochrome P-450, Biochemistry, Biophysics and Induction (szerk. Vereczkey, L., Magyar, K.) Akadémiai Kiadó, Budapest 269-271 (1985).
93. Sotaniemi, E.A., Lahtela, J.T., Stengard, J.: Enzyme Induction in Man (szerk. Sotaniemi, E.A., Pelkonen, O.) Taylor & Francis, London, 219-230 (1987).
94. Luoma, P.V.: Enzyme Induction in Man (szerk. Sotaniemi, E.A., Pelkonen, O.) Taylor & Francis, London, 231-242 (1987).
95. van der Hoeven, T.A., Coon, M.J.: J. Biol. Chem. 249, 6302-6310 (1974).
96. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).
97. Reinke, L.A., Moyer, M.J.: Drug Metab. Dispos. 13, 548-552 (1985).
98. Nash, T.: Biochem. J. 55, 416-421 (1953).
99. Fujita, T., Mannering, G.J.: J. Biol. Chem. 248, 8150-8156 (1973).
100. Laemmli, U.K.: Nature 227, 680-685 (1970).
101. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354 (1979).
102. Koop, D.R., Laethem, C.L., Tierney, D.J.: Drug Metab. Rev. 20, 541-551 (1989).
103. Levin, W., Thomas, P.E., Oldfield, N., Ryan, D.E.: Arch. Biochem. Biophys. 248, 158-165 (1986).
104. Koop, D.R.: Chem. Res. Toxicol. 3, 377-383 (1990).

### Köszönetnyilvánítás

A doktori értekezést az MTA Központi Kémiai Kutató Intézetében készítettem.

Ezúton mondok köszönetet az Intézet Igazgatóságának, hogy munkámat lehetővé tette.

Köszönettel tartozom dr. Vereczkey László témavezetőnek, aki mind szakmai segítségével, mind gyakorlati útmutatásaival nagyban hozzájárult a disszertáció elkészültéhez.

Szeretnék köszönetet mondani Magnus Ingelman-Sundbergnek (Karolinska Institutet, Stockholm, Svédország), hogy rendelkezésemre bocsátotta az anti CYP2E1 ellenanyagot.

A *Western blot* analízist az Eötvös Loránd Tudományegyetem Immunológiai tanszékén végeztem, köszönettel tartozom dr. Erdei Annának, aki a készüléket rendelkezésemre bocsátotta és lehetővé tette, hogy a módszert elsajátítsam.

A dolgozat megszületéséhez dr. Meisel Tiborné, Grényi Imréné és Csurja Sándorné nyújtott segítséget, köszönöm lelkiismeretes munkájukat.

Szeretnék köszönetet mondani Tóth Zoltánnak a fényképek és az ábrák elkészítésében nyújtott technikai segítségért.

Köszönettel tartozom a "Magyar Tudományért" Alapítványnak, hogy az értekezés alapjául szolgáló munkát anyagilag támogatta.