



THE ROLE OF THE LIVER IN XENOBIOTIC BIOTRANSFORMATION.

PART II. XENOBIOTIC METABOLISM IN THE LIVER MEDIATED BY CYTOCHROME P450-DEPENDENT MONOOXYGENASES

Marcin KAMIŃSKI, Ryszard WIADERKIEWICZ

Chair of Morphology, Silesian Medical University, Katowice, Poland

Abstract

Cytochrome P450-dependent monooxygenases are the key enzymes of phase I reactions. They are especially abundant in the liver and play an important role in xenobiotic metabolism, especially in the case of lipophilic medications. In the hepatocytes, P450s are found in two different compartments, in which they have two different electron transfer chains. P450 enzymes that belong to different families also have different gene regulatory mechanisms. Many of these genes can be turned on or induced by a chemical signal, which is probably related to the role of P450 in detoxification. Some P450s can activate procarcinogens to carcinogens, so their induction may be a cancer risk. The activity and inducibility of particular P450 isoforms differ in particular zones of the hepatic acini. They are also dependent on many physiological factors, including the age and sex of an individual.

Key words

Cytochrome P450; Biotransformation; Detoxification; Xenobiotics.

Received 12 February 2008; accepted 7 March 2008

1. Introduction

The term “cytochrome P450-dependent monooxygenase system” (CYP-450) denotes a complex of integral proteins situated in the microsomal membrane, nuclear capsule, plasmalemma and mitochondria. It should be mentioned, however, that in the cells of prokaryotic organisms and in some fungi, the above-mentioned hemoprotein is a type of cytosol protein. The CYP-450 gene appeared in primitive, unicellular organisms approximately 2–3 billion years ago. Thus, it is a phylogenetically old group of genes that implements extremely important metabolic functions [10].

CYP-450 is classified as a cytochrome protein – which are single-electron transmitters operating in the oxidoreductive pathways of cells. This is possibly due

to the presence of the heme system in its catalytic center (protoporphyrin IX). Cells of all organisms, starting from bacteria, fungi, plants, animals and ending with humans, have developed complex mechanisms for metabolising accumulated exogenous and endogenous lipophilic compounds into compounds that are hydrophilic, polar and may be excreted with urine or bile. The mechanism is based on hydroxylation, oxidation or reduction of substrates and the activity itself is carried out by CYP-450 together with other collaborating enzymatic proteins in the so-called metabolic phase I [6]. In phase II, the resultant intermediate metabolites are conjugated with UDP-glucuronic acid, sulfates, glutathione or amino acids [17]. In both the aforementioned phases of xenobiotic and

endogenous compound metabolism, the liver plays a crucial role.

The equilibrium between biotransformation phase I and II depends on numerous factors, including gene polymorphism, age, sex, diet, hormones, the activity of inductors and inhibitors, interactions between various xenobiotics and between xenobiotics and endogenous substrates. Disturbing the equilibrium may lead to serious consequences, since the substrate activation that occurs in biotransformation phase I induces adverse effects, including mutagenic, carcinogenic and embryotoxic consequences [19]. The resultant reactive oxygen species (ROS) modify purine and pyrimidine bases, induce point mutations and DNA-chain breaks [21].

2. The CYP-450-dependent monooxygenase system

The monooxygenase system referred to in section 1 is composed of four basic elements. In addition to CYP450, the system includes proteins that supply electroreduction equivalents – NADPH CYP-450 reductase (1.6.4.2), NADH cytochrome- b_5 reductase (1.6.2.2) and cytochrome b_5 [16], while the optimum environment required for the reaction to occur is provided by phosphatidylcholine – a typical lipid component of biological membranes [15]. The active centre of CYP-450 situated at the C-terminal polypeptide chain contains protoporphyrin IX, the iron atom of which forms coordination bonds, sharing electrons with four nitrogen atoms of the pyrrole ring, as well as with a sulphur atom of the cysteine network originating from the hemoprotein protein chain. Under normal conditions, another, sixth ligand of the heme group is a water molecule [24]. When a carbon monoxide is substituted in place of the water molecule, a red shift of the Sorret peak occurs (450 nm). At the C-terminal of the protein there is also situated the substrate-binding site, a domain responsible for cooperation with NADPH-CYP-450 and NADPH-CYP- b_5 reductase, as well as antigen determinants. At the N-terminal, on the other hand, there is a hydrophobic anchor, which has an amino acid sequence similar to secretory proteins. The anchor extends as far as the luminal space of the endoplasmic reticulum. The N-terminal also accommodates the hydrophobic channel, which provides the only route for transporting metabolised substrates through the CYP-450 catalytic centre. The molecular weight of particular CYP-450 isoforms ranges from 43 000 to 60 000 Daltons [11].

An integral membrane protein that closely cooperates with CYP-450 is NADPH reductase with a molecular weight of 76,000–80,000. Its cytosol-facing catalytic section (C-terminal) contains domains that bind equimolar amounts of NADPH, FAD and FMN, as well as a domain that cooperates with CYP-450. Electrons captured from NADPH are transferred to FAD, FMN, and subsequently to CYP-450 heme iron. The electrons may also be donated to CYP-450 by NADH with NADH reductase being involved, although the K_m value of the latter is one order of magnitude higher as compared to NADPH reductase. In consequence, the process is much slower. The organisms have at their disposal solely one NADPH reductase gene. Despite the fact that the protein generated on the gene matrix does not appear in homologous forms, it must cooperate with numerous CYP-450 forms and participate in reduction of other electron acceptors [5].

Other redox partners for the cytochromes P-450 that are contained solely in the external membrane of the mitochondria are as follows: an iron-sulfide protein – the so-called adrenodoxin, and flavoprotein – adrenodoxin reductase. The mitochondria contain both the constitutive forms of CYP-450 and its inducible forms, the latter being capable of metabolising family I, II and III xenobiotics. The mitochondria are estimated to contain 10–15% of cellular hemoproteids that metabolise xenobiotics [1].

CYP-450s participate in various types of reactions, but their monooxygenase activity is of the greatest importance. As a consequence of this reaction, one atom of oxygen is incorporated into a substrate molecule, while another, following an NADPH-dependent reduction, forms water [20]. The above cycle of CYP-450 (Fe^{+3}) catalytic metabolism includes:

1. formation of the CYP-450-substrate ($\text{Fe}^{+3} \text{RH}$) complex, with iron reduction within the complex by an electron supplied by NADPH reductase ($\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$);
2. binding of molecular oxygen to heme at the 6 ligand position, with resultant formation of the oxy-cytochrome P-450-substrate complex ($\text{Fe}^{+2} \text{O}_2 \text{RH}$);
3. reduction of the thus formed three-component complex by an electron supplied by cytochrome b_5 (or NADPH CYP-450 reductase), hydrogenation and formation of the FeOOH-RH complex;
4. capture of the second proton, thus breaking the $\text{Fe}^{+2} \text{OOH}$ complex with formation of water and $(\text{FeO})^{+3}$. During the subsequent stage, an atom of oxygen is transferred from the reactive $(\text{FeO})^{+3}$ complex to the $(\text{Fe}^{+3} \text{-ROH})$ substrate. In the final

stage, a hydrophilic product of the monooxygenase reaction (ROH) is detached from CYP-450.

If the cycle of catalytic metabolism is interrupted at the stage where the first electron is transferred, oxygen is released as superoxide anion radical (O_2^-); when it is interrupted at the second electron stage, the released compound is hydrogen peroxide (H_2O_2).

In the hepatic microsomes, the stoichiometry of the components of the CYP-450-dependent monooxygenase system is as follows: 10 to 20 CYP-450 molecules and 5 to 10 cytochrome b_5 molecules cooperate with a single NADPH reductase molecule [5]. These quantitative relations change when induction and inhibition are involved. Cytochrome b_5 , a low molecular weight protein found both on the mitochondrial external lamina and in microsomes, captures electrons from cytochrome b_5 NADH reductase (chain II).

3. The cytochrome P-450 superfamily

In humans, as well as in bacteria, protozoa, plants and animals, the cytochrome P-450 superfamily consists of approximately 2500 microsomal, mitochondrial and cytosol proteins [5, 11]. Particular CYP-450 isoforms significantly differ in their substrate specificity. The specificity is relatively low in isoforms that metabolise xenobiotics and much higher in isoforms associated with endogenous substrate metabolism. The former are characterized by considerable inducibility, which markedly affects the amount and quality of the generated intermediate metabolites. On the other hand, the latter either do not have this property or else exhibit residual inducibility.

CYP-450 was identified by Klingenberg and Garfinkel in 1958 [12]. Initially, the enzyme was called "pigment P", and when Sato performed its spectral analysis in 1960, it became known as "cytochrome P450". In 1983, the first complete hemoprotein sequence was described. Three years later, the number of known sequences was 67; to date, more than 7700 sequences have been described. In the eighties, the superfamily of proteins was classified based on the amino acid sequence homology. Thus, CYP-450 families (40% match) and subfamilies (55% match) were distinguished. Up to 2007, in humans, 18 families and 44 subfamilies were identified, encompassing 57 genes and 58 pseudogenes. The list is constantly being expanded (<http://drnelson.utmem.edu>).

4. Chemical induction of CYP-450

The isoforms belonging to the CYP-1, CYP-2, CYP-3 and to a lesser degree CYP-4 families are involved in xenobiotic metabolism. Their activity level results from gene polymorphism, gene duplication, induction of synthesis by xenobiotics or activation of the already synthesised cytochrome protein. Increased activity may also result from a different mechanism, namely modification of protein synthesis at the translation stage or its posttranslational modification. This is what occurs in the case of CYP-450 2E1.

"Induction" is understood here as a substrate dose-dependent increase of monooxygenase activity resulting from an increased number of synthesised *de novo* CYP-450 molecules. The process has serious consequences. In the case of pharmaceuticals, it may accelerate their biotransformation rate, change the clearance rate, decrease the time of their activity and cause formation of qualitatively different, toxic metabolites. Particular inducers often stimulate various CYP-450 isoforms.

Despite significant progress in recent years, the degree of understanding of molecular mechanisms of induction continues to be low, with the exception of the CYP-450 family 1. All the CYP-450 families involved in xenobiotic metabolism (families 1–4) implement the process thanks to intracellular receptors, which fulfil the role of ligand-dependent transcription factors.

Family 1 is induced by halogen derivatives of benzodioxans and benzophurans (e.g. TCDD), aromatic carbohydrates (methylchloranthrene, dimethylbenzanthracene, benzo(a)pyrene and flavones (–naphthoflavone)). Numerous data justify regarding the cytoplasmic receptor that binds to the above substrates as an orphan protein, which does not have a physiological ligand, although even here some doubts arise.

The Ah receptor, a product of a gene located in humans on chromosome 8, is a conservative protein that is present not only in vertebrates, but also in insects (*Drosophila melanogaster* – the fruit fly) or in protozoa (*Caenorhabditis elegans*). The protein is synthesised before chemical induction and stored in its inactive form in the cytoplasm as a complex formed with two molecules of heat shock proteins (Hsp-90) – XAP2 and p-23. The proteins protect the complex against ubiquitination and digestion by proteasomes. The presence of a ligand – e.g. TCDD – results in complex dissociation, receptor phosphorylation by tyrosine kinase and nuclear translocation of the AhR-ligand complex. There, the AhR-ligand heterodimerises with AhR nuclear translocator proteins and interacts with dioxin response element sequences (DRE)

located in the 5' terminal region of the CYP family 1 genes [2, 21]. The Ah receptor controls not only the family 1 cytochromes – 1A1 and 1A2, but also the metabolic phase II enzymes, including glutathione transferase, aldehyde dehydrogenase, DT-diaphorase and UDP-glucuronyltransferase. Control is also exercised over numerous proteins that participate in cell proliferation (TGF- β , IL-1, PAI-2), cell cycle regulation (p-27, jun-B) and apoptosis (Bax); possibly, the effect may encompass a more extensive group of genes, which is indicated by results of investigations carried out employing micromatrices [3, 14]. In the years 2000–2004, Brause et al. published a series of reports that indicated that β -naphthoflavone, methyl-chloranthrene and β -naphthoflavone interact with yet another cytoplasmic receptor, other than AhR, namely a protein characterised by a similar sequence of polypeptide chain, but a decidedly different sedimentation constant equaling 4S [4]. Evidence has accumulated that indicates the involvement of AhR in controlling the synthesis of β -naphthoflavone-binding protein. Moreover, the Ah receptor controls the AhRR repressor protein, which is an element of a negative feedback mechanism that ultimately determines the effects of its binding to the ligand.

Much less is known about the molecular background of CYP-450 family 2 induction by phenobarbital-type compounds or by numerous other xenobiotics, including such substances as cyclophosphamide, phenytoin, clotrimazole, carbamazepine, pesticides (dieldrin, metoxychlorine, γ -chlordane), solvents – acetone, polychlorinated biphenyls, acetaminofluorene or ethyl alcohol. Induction by the above compounds affects not only family 2 (subfamily 2A, 2C), but also family 3 (subfamily 3A), which is after all controlled by other inducers. The induction level of particular isoforms in rat microsomes is highly differentiated: from 2–4 for CYP-2C6 to 100 in the case of CYP2B1 and 2B2 [24].

The effects of induction in hepatic cells become visible within 30–60 minutes (the level of transcription increases), while after 10–20 hours, the hepatocytes exhibit a sudden increase in the area of the smooth endoplasmic reticulum, an increase in the activity of phase II enzymes, synthesis of heme and lipid metabolism. Most likely, activation affects approximately 50 different genes [5]. The phenobarbital-binding receptor is nuclear CAR (constitutive androstane receptor) protein, which is also a so-called orphan protein, and RXR (retinoic acid receptor) protein [4]. CAR heterodimerizes with RXR and the resultant heterodimer acts as a mediator in activating genes susceptible to retinoic acid through interacting with

RARE sequences in their promoter segments. In the proximal promoter region of rat CYP-2B genes, the following sequences are located: NF1, C/EBP, TATA box and guanine-enriched BTE, which are responsible for constitutive expression. The region is not, however, sufficient to initiate gene expression and requires cooperation of PBRU (phenobarbital responsive enhancer unit), which is a multi-component enhancer located in the distal promoter region. The role of a positive element in PB-dependent CYP2B1/B2 expression is fulfilled by nuclear factor 1 (NF1), which contains nuclear receptor binding sites for NR1 and NR2. In various animal species, the PBRU sequences are characterised by a considerable level of homology. Apart from the nucleotide sequence, selection of a receptor binding to NR1/2 is determined by location of repeats and introns [7, 8].

Another orphan protein that may possibly participate in PB induction is the pregnane x receptor (PRX), which is present in the hepatocytes and intestinal epithelial cells of fetuses and adult individuals.

Initiation of CYP3A1/2 gene transcription occurs following the formation of the PXR and RXR heterodimer, which specifically binds to AGTTCA sequences separated by three-nucleotide spacers in the promoter segment. The finding that CAR and PXR may heterodimerize with RXR supports an association between processes involved in xenobiotic biotransformation and endogenous signal transduction. In turn, CYP-450 family 4 isoforms with lauric and arachidonic acid ω -hydroxylase activity are subject to induction by some hypolipidemic pharmaceuticals or TCA-type solvents, which is interesting and important from the toxicological viewpoint. In addition to P450 activity induction, the above-mentioned medications trigger proliferation of the smooth endoplasmic reticulum and peroxisomes in hepatocytes [9]. The activity of fatty acid ω -oxidation also increases. CYP4 induction is mediated by the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR), which is a member of a large family of hormonal receptors that – having bound to a particular ligand – bind to specific DNA sequences initiating gene transcription [9].

5. Location of CYP-450-dependent monooxygenases in the cell

Cytochromes P-450 and b_5 , as well as their collaborating NADPH and NADH reductases form a system that is located in several compartments in the hepatocytes. A special place is occupied by the smooth and rough endoplasmic reticulum, the lipoprotein mem-

branes of which are 10–15% composed of the above-mentioned proteins. The discussed system is distributed in a markedly uneven manner [10, 11]. Some microsomal vesicles, which constitute a biochemical equivalent of the endoplasmic reticulum obtained by ultrafiltration, contain a much greater number of monooxygenases than others. This uneven distribution of the monooxygenase system in the reticulum, which has been confirmed by biochemical and immunofluorescent methods, points to a special role of the phospholipid environment of the membranes that to a varying degree facilitates the processes of anchoring integral proteins in their structures and forming supercomplexes by cooperating reductases and cytochromes. Most likely the immediate lipid environment of the monooxygenase system ensures spatial fit of the multiplied cytochromes P450 and cytochromes b_5 to an NADPH-reductase molecule of cytochrome P-450 reductase and affects the accumulation, and then transfer of lipophilic substrates via the functional channel to the catalytic centres of hemoproteids contained in the supercomplex. Quantitative or qualitative modification of the phospholipid environment in the microsomal membranes significantly affects the degree of advancement of processes catalysed by CYP-450. Supercomplex breakage followed by introduction of CYP-450 monomers to synthetic lipoprotein membranes interrupts their previous organisation and hydroxylation ability.

Another hepatocyte compartment that contains both xenobiotic-metabolising CYP-450 and endogenous substrates is mitochondria. These organelles exhibit close structural and functional associations. More than 80% of mitochondria in the hepatocytes of rodents show an association with the endoplasmic reticulum in the form of direct membrane-membrane contacts or specialised bridges [11]. Such junctions are intensified when type I or II inducers are in operation, and restricted when the P-450 cytochrome is damaged by alkylating substances, certain pesticides and pharmaceuticals, including macrolide antibiotics. The structural and functional integration of these two large and undoubtedly key role-playing cell organelles takes place *via* cytochrome b_5 , which fulfils the function of a keystone situated both on the mitochondrial external membrane and in the microsomes. The coupling of the functions of the mitochondrial electron transport chain and microsomal CYP-450 monooxygenase complex is an expression of the initiation – in extraordinary situations – of additional compensatory mechanisms that minimise danger evoked for example by an intensified supply of xenobiotics. The associations of the mitochondria and the endoplasmic reticulum have yet an-

other background (basis), which results from the necessity to transport numerous proteins encoded by the nuclear genome, including components of the respiratory chain, to the mitochondrial external membrane.

Within mitochondria, there are located constitutive CYP-450 forms that metabolise such endogenous substrates as cholesterol, steroid hormones, vitamin D₃, and bile acids. The mitochondrial isoforms CYP11A1 and CYP11B1 participate in generation of pregnenolone and cortisol. It is estimated that 10–15% of xenobiotic-metabolising cellular cytochromes P450 are also situated in mitochondria. These are predominantly representatives of families 1 and 2, such as CYP1A2, CYP2B1 and CYP2B2, but also CYP3A1 and CYP3A2. In contrast to their microsomal counterparts, the aforementioned cytochromes are surface proteins that are linked with the mitochondrial internal lamina by mutual electrostatic interactions. They are synthesised on nuclear DNA and transported to the internal lamina through the above-mentioned bridges [11].

In the 1980's, the presence of inducible forms of CYP-450 was confirmed in two other hepatocyte structures, namely in the external membrane of the nuclear envelope and in the plasmalemma. In the external membrane of the nuclear envelope, which is united joined to the rough endoplasmic reticulum, the presence of TCDD, 3-methylcholantrene and -naphthoflavone-induced CYP45-family 1 were detected. In spite of the fact that the observed concentration values of family 1 cytochromes are very low as compared to microsomes, their location in the close vicinity of the nucleus may be associated with an increased risk of DNA damage by the generated active intermediate metabolites or by way of formation of reactive oxygen species. In the hepatocyte plasmalemma, the content of CYP-450 and the activity of CYP-450 reductase are minimal. Some investigators believe their presence to be an artifact resulting from the use of inappropriate isolation procedures. Isolated reports indicate the presence of hepatocytes CYP2E1, and possibly also CYP3A1 and CYP3A2 in the cellular membrane [10, 11].

The location of the CYP-450-dependent monooxygenase system in the liver confirms the morphological and functional heterogeneity of hepatocytes in particular acinar zones, described in Part I of the present article. Thus, NADPH CYP-450 reductase is preferentially located in several (4–5) hepatocyte layers surrounding the central veins, i.e. in zone III, and gradually reduces its activity in acinar zones II and I. Densitometric evaluation of the density of the product of reaction catalysed by the discussed reductase in rat hepatic acini confirms that in zone III, it is 1.6 to 2.2 times higher than in zone I. Also, the level of par-

ticular isoforms of CYP-450 families 1, 2 and 3 confirms the predomination of zone III over the remaining hepatocytes [3, 13]. Densitometric analyses of the distribution of products of immunofluorescence reaction on the above-mentioned cytochromes demonstrate that with prior induction by 3-methylcholanthrene, arochlorine 1201 or ethanol, not only is the amount of the reaction product significantly increased in the hepatocytes, but the said product also extends to the neighboring acinar zones II and I. This general rule is partially breached by the hepatic acini of the Holtzman rats, where CYP-450 family 2 is present in zone III and II, while family 3 extends over all the acinar zones, showing only a minimum predominance in zone III. Some differences in the location and activity of the CYP-450 family 1-4-dependent monooxygenase system in the acini also depend on the age of experimental animals, their sex, and also their diet, although the preferential location of the system in zone III is indisputable [18]. This phenomenon provides a perfect explanation for necrosis of central acinar segments, in other words in acinar zones III, observed in numerous cases of acute poisoning [23]. Unfortunately, to date, the causes of zonal CYP-450 location in the hepatic acini have not been determined, notwithstanding that all the hepatocytes and acinar zones are capable of effectively responding to the supplied inductors.

6. Age and expression of hepatic CYP-450

The initiation of biotransformation activity in rat liver cells occurs at the end of pregnancy, thus preceding the completion of structural and functional maturation of the organ [26]. The process extends until the animal achieves sexual maturity and then the liver ultimately takes over the responsibility for systemic xenobiotic metabolism. Numerous investigations suggest that constitutive expression of mRNA and CYP1A1, 1A2 and 2B1/2 proteins does not occur in fetal life, but becomes active one day prior to end of pregnancy and at that time is subject to 3-methylcholanthrene and polychlorinated biphenyl induction [25]. In rats, rabbits and hamsters, expression of mRNA and CYP2E1 protein in the liver is observed several hours or days after birth. In turn, CYP3A reveals its catalytic activity solely in extrafetal life. The provided examples confirm the fact that in the developing liver, the activity of particular CYP-450 isoforms arises at various points in time and exhibits divergent readiness for induction.

When sexual maturity is achieved, the activity of the CYP-450-dependent monooxygenase system is gradually decreased or stabilised at a low level. In-

ducibility also diminishes – in the case of rats CYP2B1 and 2B2, this happens after the animal is more than 12 months old. At that time, in rodents, functional feminisation of the liver occurs, consisting in a decrease in the activity of sex-dependent xenobiotic metabolising enzymes. In elderly male rats, the mentioned activity approximates that observed in females [22].

References

1. Anandatheerthavarada H. K., Addya S., Dwivedi R. S. [et al.], Localization of multiple forms of inducible cytochromes P-450 in rat liver mitochondria: Immunological characteristics and patterns of xenobiotic substrate metabolism, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1997, 1, 136–150.
2. Boutros P. C., Moffatt I. D., Franc M. A. [et al.], Dioxin-responsive AHRE II gene battery: Identification by phylogenetic footprinting, *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2004, 301, 707–715.
3. Buchler R., Lindros K. O., Nordling A. [et al.], Zonation of cytochrome P450 isoenzyme expression and induction in rat liver, *European Journal of Biochemistry* 1992, 204, 407–412.
4. Brauze U. D., Malejka-Giganti D., A novel 4s/3H/B-naftoflavone binding protein in liver cytosol of female Sprague – Dawley rats treated with aryl hydrocarbon receptor agonists, *Biochemical Journal* 2000, 347, 787–795.
5. Czekaj P., Potencjał i fazy przemian ksenobiotyków w prawidłowej i regeneracyjnej wątrobie szczurów w różnym wieku, Śląska Akademia Medyczna, Katowice 2005 [rozprawa habilitacyjna].
6. Guengerich F., Human cytochrome P-450 [in:] *Cytochrome P450: structure, mechanisms and biochemistry*, Plenum Press, New York 1995.
7. Honkakoski P., Zelko I., Sueyoshi T. [et al.], The nuclear orphan receptor car-retinoid x receptor heterodimer activates the phenobarbital enhancer module of the CYP2B gene, *Molecular and Cell Biology* 1998, 18, 5625–5658.
8. Honkakoski P., Moore R., Washburn K. [et al.], Activation by diverse xenochemicals of the 51 base pair phenobarbital – responsive enhancer module in the CYP2b10 gene, *Molecular Pharmacology* 1998, 53, 597–601.
9. Johnson E. F., Palmer C. N. A., Griffin K. J. [et al.], Role of the peroxisome proliferator – activated receptor cytochrome P-450 4A gene regulations, *FASEB Journal* 1996, 10, 1241–1248.
10. Kamiński M., Ustrojowa lokalizacja oksydaz o funkcji mieszanej, *Folia Medica Cracoviensa* 1990, 3, 97–120.
11. Kamiński M., Wiaderkiewicz R., Orschulik M., Układ monooksygenaz zależnych od cytochromu P-450 w meta-

- bolizacji ksenobiotyków i endogennych produktów przemian, *Medycyna Pracy* 2001, 52, 19–26.
12. Klingenberg M., Pigments of rat microsomes, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1958, 75, 376–386.
 13. McKinnon R. A., McManus M. F., Localization of cytochrome P-450 in human tissues: implications for chemical toxicity, *Pathology* 1996, 28, 148–155.
 14. Nebert D. W., Roe A. L., Dieter M. Z. [et al.], Role of aromatic hydrocarbon receptor and (Ah) gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control and apoptosis, *Biochemical Pharmacology* 2000, 59, 65–85.
 15. Negishi M., Uno T., Darden T. A., Structural flexibility and functional versatility of mammalian P450 enzymes, *FASEB Journal* 1996, 10, 683–689.
 16. Omuka T., Forty years of cytochrome P-450, *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1999, 266, 690–698.
 17. Paulson G. D., Caldwell J., Hutson D. H. [et al.], Xenobiotic conjugation chemistry, American Chemical Society, Washington 1986.
 18. Raza H., Joan A., Lakhani M., Multiplicity and tissue specific expression of camel cytochrome P450, *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 1998, 121, 205–211.
 19. Shweitz S., Drug metabolizing enzyme: mechanism and function, *Current Drug Metabolism* 2000, 1, 107–132.
 20. Schlichting J., Berendzen J., Chu K., The catalytic pathway of cytochrome P-450 cam at atomic resolution, *Science* 2000, 287, 1615–1622.
 21. Villard P. H., Seree E. M., Re J. L., Effects of tobacco smoke on the gene expression of the Cyp1a, Cyp2b, Cyp2e and Cyp3a subfamilies in mouse liver and lung: Relation to single strand breaks of DNA, *Toxicology and Applied Pharmacology* 1998, 148, 195–204.
 22. Warrington J. S., Poku J. W., von Moltke L. L., Effects of age on in vitro midazolam biotransformation in male CD-1 mouse liver microsomes, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2000, 29, 1024–1031.
 23. Watanabe J., Mondo H., Takamori Y., Effect of phenobarbital on intralobular expression of CYP2B1/2 in liver of rats: difference in expression between single and repetitive administrations, *Biochemical Pharmacology* 2000, 60, 285–291.
 24. Wiaderkiewicz R., Potencjał biotransformacyjny wątroby w uszkodzeniu niedokrwiennie-reperfuzyjnym, Śląska Akademia Medyczna, Katowice 2002 [rozprawa habilitacyjna].
 25. Wu D., Cederbaum A., Induction of liver cytochrome P4502E1 by pyrazole and 4-methylpyrazole in neonatal rats, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1993, 264, 1468–1473.
 26. Yang H., Namkung M., Juchan M., Immunodetection, immunoinhibition, immunoquantitation and biochemical analysis of cytochrome P4501A1 in Tissue of the rat during the progression of organogenesis, *Biochemical Pharmacology* 1989, 38, 4027–4036.

Corresponding author:

Marcin Kamiński
Katedra Morfologii Śląskiego Uniwersytetu
Medycznego
ul. Medyków 18
PL 40-752 Katowice
e-mail: sekhistemb@sum.katowice.pl

APPENDIX 1. LIST OF ABBREVIATIONS

Ah	aryl hydrocarbon
AhR	Ah receptor
AhRR	AhR repressor
Bax	proapoptotic protein
BTE	basic transcription element
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CAR	constitutive androstane receptor
CYP-450	cytochrome P450
DNA	deoxyribonucleic acid
FAD	flavin adenine dinucleotide
FMN	flavin mononucleotide
Hsp-90	heat shock protein
IL-1	interleukin 1
mRNA	messenger ribonucleic acid
NADH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase
NF1 and NF2	nuclear factor 1 and 2
NR1 and NR2	nuclear factor 1 and 2 receptors
PAI-2	plasminogen activator inhibitor type 2
PB	phenobarbital
PBRU	phenobarbital responsive enhancer unit
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
PXR	pregnane x receptor
RARE	retinoic acid responsive element
ROS	reactive oxygen species RXR – retinoid x receptor
TATA box	regulatory sequence
TCA	tetrachloroacetic acid
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin
TGF-	transforming growth factor/tumor necrosis factor

ROLA WĄTROBY W PROCESIE BIOTRANSFORMACJI KSENOBIOTYKÓW.

CZĘŚĆ II. METABOLIZM KSENOBIOTYKÓW W WĄTROBIE Z UDZIAŁEM UKŁADU MONOOKSYGENAZ ZALEŻNYCH OD CYTOCHROMU P450

1. Wprowadzenie

Mianem układu monooksygenaz zależnych od cytochromu P450 (CYP-450) określa się kompleks białek integralnych zlokalizowanych w błonach mikrosomalnych, otoczące jądrowej, plazmolemie oraz mitochondriach. Należy jednak wspomnieć, iż w komórkach organizmów prokariotycznych oraz u niektórych grzybów wspomniany hemoproteid reprezentuje typ białka cytozolowego. Gen CYP-450 pojawił się w prymitywnych, jednokomórkowych organizmach około 2–3 miliardy lat temu. Jest to więc stara filogenetycznie grupa genów, realizująca niezwykle ważne funkcje metaboliczne [10].

CYP-450 należy do białek cytochromowych będących jednoelektronowymi przenośnikami w szlakach oksydoredukcyjnych komórek. Czyni to dzięki obecności w swoim centrum katalitycznym układu hemowego (protoporfiryna IX). Komórki wszystkich organizmów, począwszy od bakterii, grzybów, roślin, zwierząt, aż po człowieka, wykształciły złożone mechanizmy metabolizacji kumulujących się związków lipofilnych pochodzenia zewnętrznego i endogennego do związków hydrofilnych, polarnych, możliwych do usunięcia z moczem lub żółcią. Mechanizm ten, oparty na hydroksylacji, utlenianiu lub redukcji substratów, przeprowadza CYP-450 wraz z innymi współpracującymi białkami enzymatycznymi w tzw. I fazie przemian [6]. W fazie II powstałe metabolity pośrednie są sprzęgane z kwasem UDP-glukuronowym, siarczanami, glutationem lub aminokwasami [17]. Wątroba w obu wymienionych fazach przemian ksenobiotyków oraz związków endogennych odgrywa rolę zasadniczą.

Równowaga pomiędzy I i II fazą biotransformacji zależy od wielu czynników, w tym: polimorfizmu genów, wieku, płci, diety, hormonów, oddziaływania induktorów i inhibitorów, wzajemnej interakcji pomiędzy ksenobiotykami oraz ksenobiotykami i endogennymi substratami. Naruszenie owej równowagi może prowadzić do poważnych konsekwencji, bowiem dokonująca się w I fazie przemian aktywacja substratów wzbudza niepożądane efekty, w tym mutagenne, kancerogenne, embriotoksyczne [19]. Powstające reaktywne formy tlenu (RFT) modyfikują zasady purynowe i pirymidynowe, indukują mutacje punktowe i pęknięcia łańcucha DNA [21].

2. Układ monooksygenaz zależnych od CYP-450

Na wspomniany w rozdziale 1. układ monooksygenaz składają się cztery podstawowe składowe. Obok CYP450 uczestniczą w nim białka dostarczające równoważników elektroredukcyjnych – reduktaza NADPH CYP-450 (1.6.4.2), reduktaza NADH cytochrom- b_5 (1.6.2.2) oraz cytochrom b_5 [16]. Natomiast optymalne środowisko wymagane do przebiegu reakcji stwarza fosfatydylocholina – typowy składnik lipidowy błon biologicznych [15]. W centrum aktywnym CYP-450 ulokowanym w C-końcu łańcucha polipeptydowego zawarta jest protoporfiryna IX, a jej żelazo tworzy wiązania koordynacyjne, dzieląc elektrony z czterema atomami azotu pierścienia pirowego, a także z atomem siatki cysteiny pochodzącej z łańcucha białkowego hemoproteiny. Kolejnym, szóstym ligandem grupy hemowej w warunkach prawidłowych, jest cząsteczka wody [24]. Podstawienie jej tlenkiem węgla doprowadza do przesunięcia piku Sorreta w kierunku fal czerwonych (450 nm). Na C-końcu białka lokuje się także miejsce wiązania substratu, domeny odpowiedzialne za współdziałanie z NADPH reduktazą CYP-450 i CYP- b_5 , a także determinanty antygenowe. Na N-końcu znajduje się natomiast kotwica hydrofobowa dysponująca sekwencją aminokwasową podobną do białek sekrecyjnych. Siega ona aż do przestrzeni lumenalnej siateczki śródplazmatycznej. Tam też znajduje się hydrofobowy kanał stanowiący jedyną drogę transportu substratów metabolizowanych przez centrum katalityczne CYP-450. Masa cząsteczkowa poszczególnych izoform CYP-450 waha się od 43 000 do 60 000 daltonów [11].

Integralnym białkiem błonowym, ściśle współpracującym z CYP-450, jest NADPH reduktaza o masie cząsteczkowej 76 000–80 000. W jej części katalitycznej zwróconej do cytozolu (fragment C-końcowy) znajdują się domeny wiążące w równomolarnych ilościach NADPH, FAD i FMN oraz domena współpracująca z CYP-450. Elektrony pobierane z NADPH przenoszone są na FAD, FMN, a następnie żelazo hemowe CYP-450. Elektrony mogą także płynąć do CYP-450 z NADH przy udziale NADH reduktazy, aczkolwiek jej K_m jest o rząd wielkości większe niż w wypadku reduktazy NADPH. W konsekwencji ów proces jest znacznie wolniejszy. Organizmy dysponują wyłącznie jednym genem reduktazy

NADPH. Pomimo, iż powstające na jego matrycy białko nie występuje w formach homologicznych, to musi współpracować z wieloma izoformami CYP-450 oraz uczestniczyć w redukcji innych akceptorów elektronów [5].

Kolejnym partnerem redoks dla cytochromów P-450 zawartym wyłącznie w błonie wewnętrznej mitochondriów są: białko żelazo-siarczkowe zwane adrenodoksyną oraz flawoproteina – reduktaza adrenodoksyny. Mitochondria zawierają zarówno formy konstytutywne CYP-450, jak i indukowalne, metabolizujące ksenobiotyki, w tym z rodziny I, II oraz III. Szacuje się, iż w mitochondriach zlokalizowane jest 10–15% komórkowych hemoproteidów metabolizujących ksenobiotyki [1].

CYP-450 uczestniczą w różnych typach reakcji, chociaż aktywność monooksygenazowa ma największe znaczenie. W jej rezultacie jeden atom tlenu zostaje wbudowany do cząsteczki substratu, natomiast drugi, po redukcji z udziałem NADPH, tworzy wodę [20]. Powyższy cykl przemian katalitycznych CYP-450 (Fe^{+3}) obejmuje:

1. utworzenie kompleksu CYP-450-substrat (Fe^{+3}RH) z redukcją żelaza w kompleksie przez elektron dostarczony przez NADPH reduktazę ($\text{Fe}^{+3}\text{-Fe}^{+2}$);
2. związanie tlenu cząsteczkowego z hemem w 6 pozycji ligandowej, w wyniku czego powstaje kompleks oksycytochrom P-450-substrat ($\text{Fe}^{+2}\text{O}_2\text{RH}$);
3. redukcję powstałego trójskładnikowego kompleksu przez elektron dostarczany z cytochromu b_5 (lub reduktazy NADPH CYP-450), uwodornienie i utworzenie kompleksu FeOOH-RH ;
4. przejście drugiego protonu oznaczające rozbitcie kompleksu Fe^{+2}OOH oraz powstanie wody i (FeO) $^{+3}$. W kolejnym etapie dokonuje się przeniesienie atomu tlenu z reaktywnego kompleksu (FeO) $^{+3}$ do substratu ($\text{Fe}^{+3}\text{-ROH}$). Na etapie końcowym od CYP-450 odłącza się hydrofilny produkt reakcji monooksygenazowej (ROH).

Jeżeli cykl przemian katalitycznych zostanie przerwany na etapie przekazania pierwszego elektronu, to tlen zostanie uwolniony w postaci anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-), a gdy na etapie drugiego elektronu, to uwalniany będzie nadtlenek wodoru (H_2O_2).

W mikrosomach wątrobowych stechiometria składników układu monooksygenaz zależnych od CYP-450 kształtuje się następująco: z jedną reduktazą NADPH współpracuje 10–20 cząsteczek CYP-450 oraz od 5 do 10 cząsteczek cytochromu b_5 [5]. Owe stosunki ilościowe zmieniają się w warunkach indukcji lub inhibicji. Cytochrom b_5 będący małym białkiem obecnym zarówno na blaszce zewnętrznej mitochondriów, jak i w mikrosomach, przejmuje elektrony z NADH reduktazy cytochromu b_5 (łańcuch II).

3. Nadrodzina cytochromu P-450

Na wspomnianą w tytule nadrodzinę składa się ok. 2500 białek mikrosomalnych, mitochondrialnych, cytozolowych, zarówno u ludzi, jak i u bakterii, pierwotniaków, roślin i zwierząt [5, 11]. Poszczególne izoformy CYP-450 istotnie różnią się specyficznością substratową. Jest ona stosunkowo niewielka w przypadku izoform metabolizujących ksenobiotyki, natomiast znacznie większa dla związanych z przemianą substratów endogennych. Pierwsze z wymienionych cechują się znaczną indukcyjnością, wpływającą zasadniczo na ilość i jakość powstających metabolitów pośrednich. Drugie natomiast tej cechy nie posiadają lub też reprezentują ją w formie szczątkowej.

CYP-450 został zidentyfikowany w 1958 r. przez Klingenberga i Garfinkla [12]. Początkowo enzym nazwano pigmentem P, a po dokonanej przez Sato w 1960 r. charakterystyce widmowej cytochromem P450. W 1983 r. poznano pierwszą pełną sekwencję hemoproteiny. W trzy lata później liczba rozpoznanych sekwencji wynosiła 67, a do chwili obecnej opublikowano ich ponad 7700. W latach osiemdziesiątych omawianą nadrodzinę białek sklasyfikowano na podstawie homologii sekwencji aminokwasowej. I tak wyodrębniono rodziny CYP-450 (cechujące się 40% zgodnością) oraz podrodziny (55% zgodnością). Do roku 2007 u człowieka wyodrębniono 18 rodzin i 44 podrodziny obejmujące 57 genów i 58 pseudogenów. Wymieniona lista jest systematycznie uzupełniana (<http://drnelson.utmem.edu>).

4. Indukcja chemiczna CYP-450

Izoformy rodziny CYP-1, CYP-2, CYP-3, i w mniejszym stopniu CYP-4, są zaangażowane w przemiany ksenobiotyków. Poziom ich aktywności wynika z polimorfizmu genów, ich duplikacji, indukcji syntezy przez ksenobiotyki lub aktywacji wysyntetyzowanego już białka cytochromu. Ów wzrost może mieć i inne podłoże, a mianowicie wynikać z modyfikacji syntezy białka na etapie translacji lub jego modyfikacji potranslacyjnej. Tak się między innymi dzieje w wypadku CYP-450 2E1.

Przez indukcję rozumiemy zależny od dawki substratu wzrost aktywności monooksygenazowej wynikający z pomnożenia powstałych *de novo* cząsteczek CYP-450. Proces ten pociąga za sobą poważne konsekwencje. W wypadku leków może doprowadzić do przyspieszenia ich metabolizacji, zmiany klirensu, skrócenia czasu działania oraz tworzenia jakościowo odmiennych, toksycznych metabolitów. Poszczególne induktory niejednokrotnie stymulują różne izoformy CYP-450.

Znajomość molekularnych mechanizmów indukcji mimo znacznych postępów dokonanych w ostatnich latach jest nadal słaba z wyłączeniem rodziny 1 CYP-450.

Wszystkie rodziny CYP-450 zaangażowane w metabolizm ksenobiotyków (rodziny 1–4) ów proces realizują dzięki receptorom wewnątrzkomórkowym pełniącym rolę czynników transkrypcyjnych zależnych od ligandu.

Rodzinę 1 indukują chlorowcowe pochodne benzo-dioksanów i benzofuranów (np. TCDD), węglowodory aromatyczne (metylocholanren, dimetylobenzoatracen, benzo(a)piren oraz flawony (-naftoflawon). Szereg danych upoważnia do uznania receptora cytoplazmatycznego wiążącego powyższe substraty za białko sieroce nieposiadające fizjologicznego ligandu, chociaż i tu pojawiają się wątpliwości.

Receptor Ah, produkt genu zlokalizowanego u człowieka w chromosomie 8, jest białkiem konserwatywnym obecnym nie tylko u kręgowców, lecz także w świecie owadów (muszka owocowa) czy pierwotniaków (*Caenorhabditis elegans*). Jest syntetyzowany przed indukcją chemiczną i magazynowany w postaci nieaktywnej w cytoplazmie komórek w formie kompleksu z dwoma częściami białka szoku termicznego Hsp-90 – XAP2 i p-23. Wspomniane białka zabezpieczają go przed ubiquitynacją i strawieniem w proteosomach. Pojawienie się ligandu np. TCDD powoduje dysocjację kompleksu, fosforylację receptora przez kinazę tyrozynową oraz translokację zespołu AhR-ligand do jądra komórkowego. Tam AhR-ligand łączy się z białkami Arnt w heterodimer (ang. AhR nuclear translocator protein) i oddziałuje z sekwencjami DRE (ang. dioxin response element) zawartymi w rejonie 5' końcowym genów CYP z rodziny 1 [2, 21]. Pod kontrolą receptora Ah znajdują się nie tylko cytochromy rodziny 1 – 1A1 i 1A2, lecz także enzymy II fazy przemian, w tym transferaza glutationu, dehydrogenaza aldehydowa, DT-diaforaza i UDP-glukuronylotransferaza. Ów wpływ obejmuje także szereg białek uczestniczących w proliferacji komórek (TGF- β , IL-1, PAI-2), regulacji cyklu komórkowego – (p-27, jun-B) oraz apoptozie – (Bax), a być może jeszcze szerszej grupy genów, na co wskazują wyniki badań z użyciem mikromacierzy [3, 14]. W latach 2000–2004 ukazało się szereg publikacji Brausego i współpracowników wskazujących, iż -naftoflawon, metylocholanren i -naftoflawon oddziałują także z innym receptorem cytoplazmatycznym niż AhR, a mianowicie białkiem o podobnej sekwencji łańcucha polipeptydowego, lecz zdecydowanie różnej stałej sedymentacji wynoszącej 4S [4]. Zgromadzono również szereg przesłanek świadczących o zaangażowaniu AhR w kontrolę syntezy białka wiążącego -naftoflawon. Receptor Ah kontroluje ponadto białko represorowe AhRR stanowiące element ujemnego sprzężenia zwrotnego kształtującego ostateczne efekty jego wiązania z ligandem.

Zdecydowanie mniej wiadomo o podłożu molekularnym indukcji CYP-450 rodziny 2 dokonywanej przez związki typu fenobarbital, a także przez wiele innych ksenobiotyków, wśród których są między innymi: cy-

klofosfamid, fenytoina, klotrimazol, karbamazepina, pestycydy (dieldrin, metoksychlor, -chlordan), rozpuszczalniki: aceton, polichlorowane bifenyle, acetaminofluoren czy alkohol etylowy. Indukcja przez powyższe związki dotyczy nie tylko rodziny 2 (podrodziny 2A, 2C), lecz i rodziny 3 (podrodzina 3A), która znajduje się przecież pod kontrolą innych induktorów. Poziom indukcji poszczególnych izoform w mikrosomach szczura jest wysoce zróżnicowany: od 2–4 dla CYP-2C6 do 100 w wypadku CYP2B1 i 2B2 [24].

Efekty indukcji w komórkach wątrobowych stają się widoczne już po upływie 30–60 min (wzrasta poziom transkrypcji), natomiast po kilkunastu godzinach następuje w hepatocytach gwałtowne pomnożenie powierzchni siateczki śródplazmatycznej gładkiej, rośnie aktywność enzymów II fazy, syntezy hemu i metabolizmu lipidów. Przypuszczalnie aktywacja obejmuje blisko 50 różnych genów [5]. Receptorem wiążącym fenobarbital jest białko jądrowe CAR (ang. constitutive androstane receptor) również należące do tzw. białek sierocych oraz białko RXR (ang. retinoic acid receptor) [4]. Po połączeniu tworzą one heterodimer pośredniczący w aktywacji genów wrażliwych na kwas retinowy poprzez oddziaływanie z sekwencjami RARE w ich odcinkach promotorowych. W proksymalnym rejonie promotorów szeregu genów CYP-2B występują sekwencje NF1, C/EBP, TATA box oraz BTE wzbogacony w guaninę, odpowiadające za ekspresję konstytutywną. Rejon ten nie jest jednak wystarczający dla uruchomienia ekspresji genu i wymaga współdziałania sekwencji PBRU (ang. phenobarbital responsive enhancer unit) będącej wielokomponentowym wzmocniaczem zlokalizowanym w dystalnym regionie promotorowym. Rolę elementu pozytywnego w ekspresji CYP2B1/B2 zależnej od PB odgrywa NF1 (ang. nuclear factor 1) zawierający miejsca wiązania dla NR1 i NR2 (ang. nuclear receptor binding sites). Sekwencje PBRU cechuje znaczny poziom homologii u różnych gatunków zwierząt. O wyborze receptora wiążącego się z NR1/2 obok sekwencji nukleotydowej, decyduje posadowienie motywów powtórzonych oraz sekwencji oddzielających [7, 8].

Innym białkiem sierocym, które być może bierze udział w indukcji PB jest PXR (ang. pregnane x receptor) obecny w hepatocytach oraz komórkach nabłonkowych jelit płodów oraz osobników dorosłych.

Inicjacja transkrypcji genów CYP3A1/2 następuje po utworzeniu heterodimeru między białkami PXR i RXR, który łączy się specyficznie z sekwencjami AGTTCA poprzedzielanych trójnukleotydowymi przerywnikami w odcinku promotorowym. Obserwacja, iż białka CAR i PXR mogą tworzyć heterodimery z RXR, świadczy o związkach pomiędzy procesami metabolizmu ksenobiotyków a transdukcją sygnałów endogennych. Z kolei izoformy CYP-450 rodziny 4 o aktywności -hydroksylazy kwasu laurowego i arachidonowego podlegają interesującej

i ważnej z punktu widzenia toksykologii indukcji ze strony niektórych leków hypolipidemicznych lub rozpuszczalników typu TCA. Wspomniane leki, obok indukcji aktywności P450, wywołują w hepatocytach proliferację siateczki śródplazmatycznej gładkiej i peroksysomów [9]. Wzrasta także aktywność -oksydacji kwasów tłuszczowych. Indukcja CYP4 odbywa się za pośrednictwem receptora jądrowego PPAR (ang. peroxysome proliferator activated receptor) należącego do dużej rodziny receptorów hormonalnych, które po powiązaniu się z określonym ligandem, łączą się z specyficznymi sekwencjami DNA, uruchamiając transkrypcję genów [9].

5. Lokalizacja komórkowa monooksygenaz zależnych od CYP-450

Cytochromy P-450 i b_5 oraz współpracujące z nimi reduktazy NADPH i NADH tworzą system zlokalizowany w hepatocytach w kilku kompartmentach. Wśród nich pozycję szczególną zajmuje siateczka śródplazmatyczna gładka i szorstka, których błony lipoproteinowe w 10–15% zbudowane są ze wspomnianych białek. W błonach siateczki śródplazmatycznej omawiany system rozmieszczony jest wyjątkowo nierównomiernie [10, 11]. Niektóre pęcherzyki mikrosomalne, które stanowią ekwiwalent biochemiczny siateczki śródplazmatycznej uzyskiwany w drodze ultrawirowania, zawierają znacznie więcej monooksygenaz niż inne. To potwierdzone metodami biochemicznymi i immunofluorescencyjnymi nierównomierne rozmieszczenie układu monooksygenaz w siateczce wskazuje na szczególną rolę otoczenia fosfolipidowego błon, które w różnym stopniu sprzyja procesom zakotwiczenia białek integralnych w ich strukturze oraz tworzenia superkompleksów przez współdziałające reduktazy i cytochromy. Prawdopodobnie bezpośrednio lipidowe otoczenie układu monooksygenaz zapewnia przestrzenne dopasowanie się zmultiplikowanych cytochromów P450 i cytochromów b_5 do cząsteczki NADPH-reduktazy cytochromu P-450 oraz wpływa na akumulację, a następnie przekazywanie lipofilnych substratów przez kanał funkcjonalny do części katalitycznej hemoproteidów zawartych w superkompleksie. Modyfikacja ilościowa lub jakościowa otoczenia fosfolipidowego w błonach mikrosomalnych w poważnym stopniu wpływa na zaawansowanie procesów katalizowanych przez CYP-450. Rozbicie superkompleksów, a następnie wprowadzenie CYP-450 w formie monomerów do syntetycznych błon lipoproteinowych, przerywa poprzednią ich organizację i zdolność do hydroksylacji.

Kolejnym kompartmentem hepatocytów, w których zawarte są zarówno CYP-450 metabolizujące ksenobiotyki, jak i substraty endogenne, są mitochondria. Pomiędzy wymienionymi organellami można zaobserwować ścisłe powiązania strukturalne oraz funkcjonalne. Ponad

80% mitochondriów w hepatocytach gryzoni wykazuje powiązania z siateczką śródplazmatyczną w formie bezpośrednich kontaktów typu błona-błona lub wyspecjalizowanych mostków [11]. Owe połączenia ulegają intensyfikacji w warunkach działania induktorów typu I lub II, a ograniczeniu po uszkodzeniu cytochromu P-450 poprzez substancje alkilujące, niektóre pestycydy oraz leki, w tym antybiotyki makrolidowe. Integracja strukturalna i funkcjonalna tych dwóch dużych i bez wątpienia kluczowych organelli komórkowych dokonuje się poprzez cytochrom b_5 odgrywający rolę zwornika umiejscowionego zarówno na blaszce zewnętrznej mitochondriów, jak i w mikrosomach. Sprzęgnięcie funkcji mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów z mikrosomalnym kompleksem monooksygenaz zależnych od CYP-450 jest wyrazem uruchamiania w komórkach w nadzwyczajnych okolicznościach dodatkowych mechanizmów kompensacyjnych, minimalizujących zagrożenia wywołane np. wzmożonym napływem ksenobiotyków. Związki mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej mają także inne podłoże wynikające z konieczności transportu wielu białek kodowanych przez genom jądrowy, w tym wchodzących w skład łańcucha oddechowego, do blaszki wewnętrznej mitochondriów.

W mitochondriach zlokalizowane są przede wszystkim konstytutywne formy CYP-450 metabolizujące substraty endogenne typu: cholesterol, hormony sterydowe, witamina D_3 , kwasy żółciowe. Mitochondrialne izoformy CYP11A1 i CYP11B1 uczestniczą między innymi w powstawaniu pregnenolonu i kortyzolu. Szacuje się, iż lokalizacją mitochondrialną dysponuje również 10–15% komórkowych cytochromów P450 metabolizujących ksenobiotyki. Są to głównie cytochromy rodziny 1 i 2, jak CYP1A2, CYP2B1 i CYP2B2, ale także CYP3A1 i CYP3A2. Wspomniane cytochromy w odróżnieniu od ich odpowiedników mikrosomalnych są białkami powierzchniowymi powiązanymi z blaszką wewnętrzną poprzez wzajemne oddziaływania elektrostatyczne. Są syntetyzowane na jądrowym DNA i przekazywane do blaszki wewnętrznej poprzez wspomniane powyżej mostki [11].

W latach osiemdziesiątych 20. wieku potwierdzono obecność indukowalnych form CYP-450 w dwóch kolejnych strukturach hepatocytów, a mianowicie blaszce zewnętrznej otoczki jądrowej oraz plazmolemie. W blaszce zewnętrznej otoczki jądrowej zespolonej z siateczką śródplazmatyczną szorstką zlokalizowano CYP450 rodziny 1 indukowane przez TCDD, 3-metylocholanren i -naftoflawon. Mimo, iż obserwowane stężenia cytochromów rodziny 1 są w porównaniu do mikrosomów niewielkie, to jednak ich umiejscowienie w pobliżu jądra komórkowego może się wiązać z nasilonym ryzykiem uszkodzenia DNA przez generowane aktywne metabolity pośrednie lub tworzenie reaktywnych form tlenu. W plazmolemie hepatocytów zawartość CYP-450 oraz aktywności jego reduktazy są minimalne. Część badaczy

sądzi, iż jest to raczej artefakt wynikający ze złych procedur izolacyjnych. W pojedynczych doniesieniach wskazywano na obecność w błonie komórkowej hepatocytów CYP2E1, a być może także CYP3A1 i CYP3A2 [10, 11].

Lokalizacja układu monooksygenaz zależnych od CYP-450 w wątrobie potwierdza opisaną w części I artykułu heterogenność morfologiczną i funkcjonalną hepatocytów w poszczególnych strefach gronek. I tak reduktaza NADPH CYP-450 preferencyjnie lokalizuje się kilku (4–5) pokładach hepatocytów otaczających żyły centralne, a więc w strefach III i stopniowo redukuje swą aktywność w strefach II i I gronek. Densytometryczne oceny gęstości produktu reakcji na omawianą reduktazę w gronkach wątrobowych szczura potwierdzają, iż w strefie III jest ona 1,6 do 2,2-krotnie większa niż w strefie I. Również zawartość poszczególnych izoform CYP-450 rodziny 1, 2 i 3 potwierdza dominację hepatocytów stref III nad pozostałymi [3, 13]. Analizy densytometryczne rozkładu produktów reakcji immunofluorescencyjnej na wymienione powyżej cytochromy wykazują, iż w warunkach uprzedniej indukcji 3-metylocholanem, alochlorem 1201 lub etanolem, następuje nie tylko istotne pomnożenie ilości produktu w hepatocytach, lecz i objęcie nim sąsiednich stref II i I gronek. Z tej generalnej prawidłowości częściowo wyłamują się gronka wątrobowe szczurów rasy Holtzman, gdzie CYP-450 rodziny 2 występują w strefie 3 i 2, natomiast rodzina 3 obejmuje wszystkie strefy gronek z minimalną tylko przewagą w strefie III. Pewne różnice w lokalizacji i aktywności układu monooksygenaz zależnych od CYP450 rodzin 1–4 w gronkach zależą także od wieku badanych zwierząt, płci, a także zastosowanej diety, chociaż preferencyjna lokalizacja układu w strefach III nie ulega wątpliwości [18]. Doskonale tłumaczy to obserwowaną w wielu ostrych zatruciach martwicę części centralnych zrazików, czyli stref III gronek [23]. Do chwili obecnej nie zdołano niestety ustalić, jakie są rzeczywiste przyczyny strefowej lokalizacji CYP-450 w gronkach wątrobowych, mimo iż wszystkie hepatocyty i strefy gronek są zdolne do efektywnej odpowiedzi na podane induktory.

6. Wiek i ekspresja CYP-450 zawartych w wątrobie

Zapoczątkowanie aktywności biotransformacyjnej w komórkach wątrobowych szczura następuje pod koniec ciąży, a więc wyprzedza zakończenie dojrzewania strukturalnego i funkcjonalnego narządu [26]. Trwa do osiągnięcia dojrzałości płciowej, gdy ostatecznie wątroba przejmuje główną rolę w ustrojowych przemianach ksenobiotyków. Szereg badań sugeruje, iż ekspresja konstytucyjna mRNA i białka CYP1A1, 1A2 i 2B1/2 nie występuje w życiu płodowym, ujawnia się natomiast na jeden

dzień przed końcem ciąży i podlega wówczas indukcji 3-metylocholanem oraz polichlorowanymi bifenylami [25]. U szczura, królika i chomika ekspresję mRNA i białka CYP2E1 w wątrobie obserwuje się po kilku godzinach lub dniach po urodzeniu. Z kolei CYP3A ujawnia swą aktywność katalityczną wyłącznie w życiu pozapłodowym. Podane przykłady potwierdzają, że w rozwijającej się wątrobie aktywność poszczególnych izoform CYP-450 pojawia się w różnym czasie i wykazuje odmienną gotowość do indukcji.

Po osiągnięciu dojrzałości płciowej aktywność układu monooksygenaz zależnych od CYP450 ulega stopniowemu obniżeniu lub stabilizuje się na niskim poziomie. Maleje także ich indukcyjność, co w przypadku szczurzych CYP2B1 i 2B2 ma miejsce po 12 miesiącach życia. Opisuje się także występującą wówczas feminizację funkcjonalną wątroby gryzoni polegającą na obniżaniu aktywności enzymów metabolizujących ksenobiotyki, a zależnych od płci. U starych samców szczurów wspomniana aktywność zbliża się do obserwowanej u samicy [22].

ZAŁĄCZNIK 1. SKOROWIDZ SKRÓTÓW

Ah	węglowodory aromatyczne
AhR	receptor Ah
AhRR	represor AhR
Bax	białko proapoptotyczne
BTE	promotorowa sekwencja regulatorowa
C/EBP	czynnik transkrypcyjny
CAR	jądrowy receptor sierocy
CYP-450	cytochrom P450
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe
FAD	dinukleotyd flawinoadeninowy
FMN	mononukleotyd flawinowy
Hsp-90	białko szoku cieplnego
IL-1	interleukina 1
mRNA	informacyjny kwas rybonukleinowy
NADH	zredukowany dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
NADPH	zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego
NF1 i NF2	czynniki jądrowe 1 i 2
NR1 i NR2	receptory dla czynników jądrowych 1 i 2
PAI-2	inhibitor aktywatora plazminogenu typ 2
PB	fenobarbital
PBRU	sekwencja wzmacniająca wrażliwa na fenobarbital
PPAR	receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów
PXR	receptor dla pregnanu
RARE	sekwencja wrażliwa na kwas retinowy
ROS	reaktywne formy tlenu
TATA box	sekwencja regulatorowa
TCA	kwasy tetrachlorooctowe
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzodoksyna
TGF-	czynnik martwicy nowotworów
