

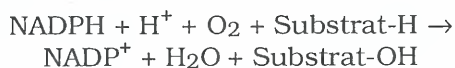
*Z wyrazami głębokiego szacunku, wdzięczności i sympatii Panu
Profesorowi Lechowi Wojtczakowi*

MAGDALENA WAŚNIEWSKA, BARBARA NIEWCZAS, JERZY DUSZYŃSKI
*Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

WYBRANE ZAGADNIENIA Z BIOCHEMII CYTOCHROMÓW P450

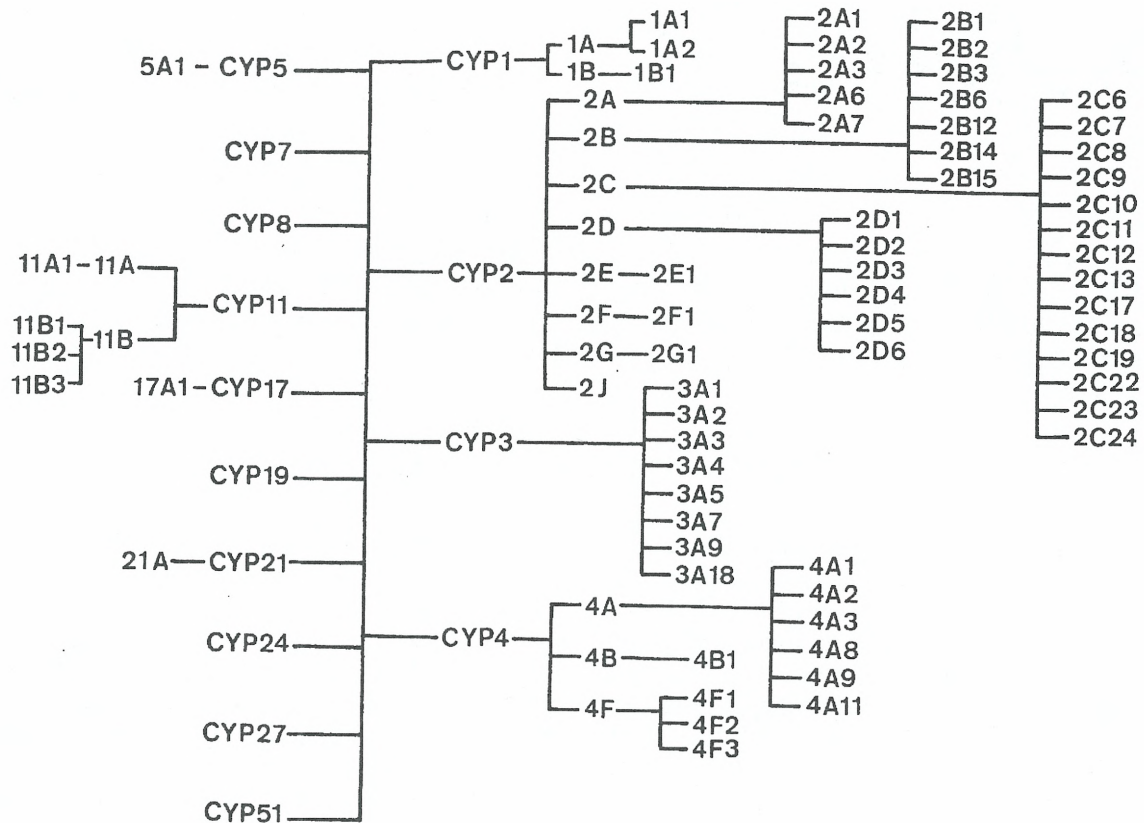
Cytochrom P450 to odkryty przed 50-ciu laty (ESTABROOK 1996) barwnik komórkowy, który w formie zredukowanej wiążąc się z tlenkiem węgla wykazuje maksimum absorpcji przy 450 nm (stąd P450 — pigment 450). Z charakterystycznego widma absorpcji wywnioskowano, że barwnik ten jest białkiem, które zawiera hemową grupę prostetyczną. Jest ono bardzo rozpowszechnione w świecie ożywionym, jego liczne odmiany można znaleźć u bakterii, roślin i zwierząt. Cytochromy P450 tworzą nadrodzinę — wielką grupę blisko spokrewnionych białek. U bakterii cytochromy P450 to rozpuszczalne białka cytosolowe. U ssaków cytochromy P450 są natomiast z reguły białkami błonowymi występującymi we wszystkich typach komórek z wyjątkiem czerwonych krwinek i mięśni szkieletowych.

Główną frakcją subkomórkową, w której stwierdzono występowanie P450 jest siateczka śródplazmatyczna. W przypadku niektórych tkanek stwierdzono też występowanie P450 we frakcji mitochondrialnej. P450 jest białkiem wykazującym aktywność enzymatyczną. Katalizuje ono reakcję:



Jest to reakcja monoooksygenacji, bowiem z cząsteczki tlenu do substratu zostaje wprowadzony pojedynczy atom. W wielu przypadkach powstaje wtedy grupa hydroksylowa, a wówczas reakcja ta jest nazywana hydroksylacją. Cytochromy P450 katalizują reakcje z licznymi substratami. Do podstawowych typów reakcji należą: hydroksylacja atomu węgla w grupie metylowej, wprowadzenie grupy -OH do węgla

metylenowego w alkanach, hydroksylację pierścienia aromatycznego i tworzenie fenoli, wprowadzenie atomu tlenu do podwójnego wiązania między atomami węgla i utworzenie grupy epoksydowej, która następnie może spontanicznie przeformować się w grupę alkoholową lub enzymatycznie przekształcić się w dwie sąsiadujące grupy alkoholowe. Tę ostatnią reakcję katalizuje hydroksylaza epoksydowa. Okazało się, że nawet w pojedynczej komórce istnieje wiele enzymów cytochromu P450. Różnią się one specyficznością substratową. Dziś w banku genów można znaleźć informacje o ponad 400 różnych cytochromach P450. W komórkach ssaków występuje około 50 rodzajów cytochromów P450. Wszystkie cytochromy P450 katalizują reakcję typu przedstawionego powyżej i mają podobną strukturę pierwszorzędową (GRAHAM-LORENCE i PETERSON 1996). Na podstawie analizy podobieństwa struktury genów cytochromów P450 (homologii sekwencji nukleotydowej) skonstruowano drzewo filogenetyczne (ryc. 1). Przyjęto ujednolicony sposób zapisu enzymów cytochromu P450. Nazwa cytochromu zaczyna się zawsze od CYP (skrót od: cytochrom P450), po nim następuje numer rodziny, a następnie oznaczone dużą literą oznakowanie podrodziny i w końcu liczbą jest oznaczony ściśle określony enzym. W obrębie rodzin homologia sekwencji aminokwasowych sięga co najmniej 40%, a w przypadku przedstawicieli tej samej podrodziny co najmniej 55%. Kursywą są pisane nazwy genów i cDNA, antykwa są zapisywane odnośne mRNA i białka. Dla przykładu CYP1A2 to określony enzym lub mRNA cytochromu P450 (to precyzuje 2 na końcu nazwy), z pierwszej rodziny i podrodziny A, zaś CYP2B8 to gen lub cDNA



Ryc. 1. Nadrodzina cytochromów P450 szczurzych i ludzkich.

ściśle określonego (ósmego) cytochromu P450 z rodziny 2 i podrodziny B.

Należy zwrócić uwagę, że reakcje monoooksygenacji i hydroksylacji mogą być również katalizowane przez zupełnie inne enzymy, na przykład monoooksygenazy flawoproteinowe. Jednak w trakcie ewolucji jedynie grupa cytochromów P450 rozwinęła się w tak liczną nadrodzinę (NELSON i współaut. 1993). Białka te biorą udział w metabolizmie dziesiątek tysięcy ksenobiotyków, czyli obcych substancji organicznych, które — a to w postaci leków, a to jako zanieczyszczenia środowiska czy żywności — trafiają do organizmu (GUEGERICH 1991). Najprawdopodobniej centrum aktywne cytochromu P450 miało w sobie wielką „elastyczność substratową, która została wykorzystana w trakcie ewolucji. Elastyczność tę dobrze ilustruje przypadek dwóch enzymów: CYP2A4 i CYP2A5. CYP2A4 jest 15- α -steroid hydrolaza, podczas gdy CYP2A5 jest hydroksylazą kumaryny. Te dwa enzymy różnią się między sobą zaledwie jedenastoma aminokwasami. Gdy w CYP2A5 zamieniono na pozycji 209 fenyloalaninę na leucynę, to tak punktowo zmutowane białko zaczęło przejawiać właściwą CYP2A4 zdolność do hydrolizy 15- α -steroidów przy zachowaniu, jednakże na znacznie niższym poziomie, właściwej CYP2A5 zdolności do hydroksylacji kuma-

ryny (LINDBERG i NEGISHI 1989). To, że *in vivo* może zachodzić podobna sytuacja, wykazano analizując tempo metabolizmu debryzokiny (TYNDALE i współaut. 1991). Enzymy odpowiedzialne za jej metabolizm u różnych przedstawicieli tego samego gatunku były różne. Stwierdzono, że u osobników z wolnym metabolizmem debryzokiny CYP2D6 miał delecję lizyny na pozycji 281. To była jedyna różnica pomiędzy nim a CYP2D6 osobników metabolizujących debryzokinę normalnie.

Wszystko wskazuje na to, że cytochromy P450 ssaków wywodzą się z jednego genu, który w ciągu ostatnich 5–50 milionów lat wielokrotnie ulegał duplikacji i mutacji. Hipotetyczny, pierwotny cytochrom P450 był odpowiedzialny za integralność błon biologicznych. Nadmierne gromadzenie się cholesterolu i kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych mogło je uszkadzać. Cytochrom P450 hydroksylował te endogenne substraty, sprawiał, że stawały się rozpuszczalne w fazie wodnej, przez co przeciwdziałał ich zaleganiu w błonach. Dopiero w trakcie ewolucji cytochromy P450 nabyły zdolności do katalizowania przemian substancji obcych organizmowi, ksenobiotyków. Substratami P450 są zwykle hydrofobowe związki organiczne. Zazwyczaj akumulują się one w błonach biologicznych. Zbyt wysoki poziom tych zwią-

ków zaburza strukturę błony i zakłóca funkcjonowanie komórki. Hydrofobowe związki nie mogą być łatwo wydalane z organizmu, są one bowiem niejako uwięzione w błonach. Dopiero wprowadzenie do nich na przykład grup hydroksylowych sprawia, że nabywają one charakteru hydrofilowego, a więc mogą przenikać do fazy wodnej i zostać usunięte z organizmu. Można zatem powiedzieć, że w filogenezie została zachowana podstawowa biologiczna funkcja cytochromów P450, że zawsze ich działanie jest związane z utrzymywaniem integralności błon biologicznych. Tym samym nie dziwi fakt, że cytochromy są zlokalizowane w najbardziej ilościowo rozwiniętych strukturach błonowych, czyli w siateczce śródplazmatycznej i w błonie mitochondrialnej. Przypomnijmy, że na przykład w komórce wątroby siateczka śródplazmatyczna stanowi 50%, a błony mitochondrialne 40% całkowitej powierzchni błon komórkowych.

Z analizy homologii sekwencji cytochromów P450 można, poza poznaniem filogenezy tej nadrodziny białek, wnioskować również o ich strukturze i związkach struktury z funkcją. Porównując liczne cytochromy P450 stwierdzono, że w ich genach można wyodrębnić fragmenty prawie niezmiennie, czyli regiony o wysoce konserwatywnej sekwencji. Z drugiej strony występują również regiony o podwyższonej zmienności. Jest zrozumiałym, z punktu widzenia tak olbrzymiej liczby substratów cytochromów P450, że obszary o wysokiej zmienności odpowiadają fragmentom cząsteczki odgrywającym główną rolę w przyłączaniu, transporcie do centrum aktywnego i stereochemicznym orientowaniu cząsteczki substratu w stosunku

do centrum aktywnego. Wyodrębniono 6 regionów o podwyższonej zmienności zasad w sekwencji genów cytochromów P450 i nazwano je miejscami rozpoznania substratu — SRS (substrat recognition site) (GOTOH 1992). Miejsca te nie są związane bezpośrednio z podstawowymi motywami struktury cząsteczki i zmiany w nich zachodzące nie zaburzają charakterystycznej dla cytochromów P450 struktury przestrzennej.

Z drugiej strony regiony silnie konserwatywne w genach cytochromów P450 są związane z centrum aktywnym i z podstawowymi motywami struktury trzeciorzędowej cząsteczki enzymu. Przyjmuje się, że podstawowa zasada budowy wszystkich białek nadrodziny jest taka sama. W przypadku cytochromów P450 tę zasadę potwierdzają podobne dla wszystkich enzymów profile hydrofobowości, a więc rozmieszczenia w liniowej strukturze białka regionów hydrofilowych i hydrofobowych. Regiony rozpoznawania substratów są też, co stwierdzono za pomocą mutacji punktowych, podobnie rozmieszczone w liniowej strukturze enzymów. Najważniejszym argumentem przemawiającym za podobieństwem struktury wszystkich enzymów należących do nadrodziny białek P450 jest to, że po skryształizowaniu i oznaczeniu rentgenograficznym struktury przestrzennej już u kilku z nich stwierdzono niezwykle podobieństwo ich struktur przestrzennych (GRAHAM-LORENCE i PETERSON 1996). Wszystkie geny cytochromów P450 mają jeden silnie konserwatywny region kodujący domenę odpowiedzialną za wiązanie tlenu oraz trzy obszary kodujące domeny, które odgrywają istotną rolę w odpowiednim utrzymaniu hemu w cząsteczce enzymu.

UDZIAŁ CYTOCHROMÓW P450 W METABOLIZMIE ENDOGENNYCH SUBSTRATÓW

Cytochromy P450 biorą udział w metabolizmie licznych związków endogennych, na przykład cholesterolu, hormonów sterydowych,

kwasów tłuszczowych, prostaglandyn, leukotrienów, amin biogennych, bilirubiny, hemu czy prekursorów witaminy D₃.

UDZIAŁ CYTOCHROMÓW P450 W METABOLIZMIE CHOLESTEROLU

Jak już wspomniano wyżej, metabolizm cholesterolu był jedną z pierwotnych funkcji cytochromu P450. Cholesterol jest substratem szlaku syntezy hormonów sterydowych: kortyzolu i aldosteronu powstających w nadnerczach, testosteronu produkowanego w jądrach, czy estradiolu wytwarzanego w jajnikach. Ponadto w wątrobie cytochromy P450 biorą udział w syntezie kwasów żółciowych. Z cholesterolu powstaje również prowitamina D₃ (OKUDA 1994).

Utrzymanie odpowiedniego poziomu cholesterolu jest możliwe dzięki, między innymi, przekształcaniu cholesterolu w hormony sterydowe i kwasy żółciowe (RUSSELL i SETCHELL 1992). Synteza kwasów żółciowych jest główną drogą przekształcania cholesterolu, a kluczową reakcją tego procesu jest 7 α -hydroksylacja cholesterolu, katalizowana przez występujący w błonie siateczki śródplazmatycznej wątroby CYP7A (CRESTANI i współaut. 1993). Innym en-

zymem P450 odgrywającym ważną rolę w metabolizmie kwasów żółciowych jest CYP3A10 (CHANG i współaut. 1993).

Podstawowym etapem syntezy hormonów sterydowych z cholesterolu jest eliminacja bocznego łańcucha węglowodorowego. Reakcja ta jest katalizowana przez związany z błoną mitochondrialną enzym z podrodziny CYP11A zwany powszechnie P450_{SCC} (side chain cleavage P450) (YOSHIKI i OSAMU 1995). W wyniku tej reakcji powstaje pregnenolon, który po przeniesieniu do siateczki śródplazmatycznej może być utleniany do progesteronu lub w obecności enzymu CYP17A1 do 17-OH pregnenolonu. Z kolei progesteron ulega hydroksylacji przy współudziale CYP21A, w wyniku czego powstaje dezokskortykosteron, który jest transportowany do mitochondrium. Tam ulega on hydroksylacji do aldosteronu, a reakcję tę przeprowadza CYP11B2 (PASCOE i współaut. 1992). Synteza kortyzolu może rozpocząć się od 17-OH pregnenolonu lub 17-OH progesteronu, który to związek powstaje na skutek hydroksylacji progesteronu przez enzym CYP17A1. W następnym etapie biorą

udział CYP21A oraz CYP11B1, a produktami reakcji są kolejno 11-dezokskortyzol i kortyzol.

Cytochromy P450 biorą również udział w syntezie hormonów płciowych: męskiego testosteronu i żeńskiego estradiolu. W proces metabolizmu testosteronu jest zaangażowany CYP-2C11 katalizujący 2 α -hydroksylację. Badania SONDERFANA i współautorów (1987) wykazały korelację pomiędzy poziomem CYP3A1 a 2 α -, 6 α -, 15 α - i 18 α -hydroksylacją testosteronu oraz aktywnością 17 α -hydroksylazy testosteronu a poziomem CYP2A1, zaś poziom CYP2B1 ma wpływ na intensywność 16 α -hydroksylacji tego hormonu. Wiadomo również, że CYP19A zwany zwyczajowo aromatazą jest zaangażowany w syntezę estrogenów. Katalizuje on trzy kolejne reakcje utleniania pierścienia cykloheksenowego, w wyniku czego powstaje układ aromatyczny występujący między innymi w estradiolu i estriolu.

Mitochondrialne cytochromy 24A i 27A biorą udział w metabolizmie witaminy D₃ (OKUDA 1994, AXEN i współaut. 1994, DILWORTH i współaut. 1995).

KONSTITUTYWNA I INDUKOWANA EKSPRESJA GENÓW RÓŻNYCH KLAS CYTOCHROMÓW P450

Niektóre enzymy P450 są stale obecne w określonych tkankach, inne zaś pojawiają się w tkankach wyłącznie w odpowiedzi na obecność induktora. W pierwszym przypadku mówi się o konstytutywnej ekspresji genów, w drugim — o ekspresji indukowanej. Gen stale ulegający ekspresji również może być indukowany, co oznacza wzrost poziomu jego ekspresji. Czasami nawet blisko spokrewnione enzymy P450, o wysokiej homologii i nakładających się specyficznościach substratowych, mogą w różny sposób ulegać indukcji. Taką sytuację obserwuje się u cytochromów CYP1A1 i CYP1A2. Oba te enzymy mogą hydroksylować policykliczne węglowodory aromatyczne, przy czym CYP1A2 może również hydroksylować aminy aromatyczne. Wydaje się, że w pierwotnych kulturach hepatocytów tylko CYP1A2 jest stale wyrażany (GONZALEZ i LEE 1996), zaś CYP1A1 może być indukowany przez tetrachlorodibenzodioxynę (TCDD), 3-metylocholanren (3MC) i β -naftoflawnon (β NF) (NEBERT i GONZALEZ 1987).

Z kolei wyniki badań dotyczących poziomu mRNA i białka CYP1A2 w wątrobie nie potwierdzają stałej ekspresji CYP1A2, ale potwierdzają zdecydowany wzrost ekspresji obu genów po zastosowaniu induktorów (MORRIS i DAVILA 1996). SWANSON i BARFIELD w 1993 roku opisali mechanizm indukcji tych genów przez receptor węglowodorów aromatycznych — AHR (aryl hy-

drocarbon receptor). AHR jest białkiem cytosolowym, które po związaniu z induktorem — ligandem wiąże się z białkiem ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). Powstały kompleks przechodzi do jądra, gdzie łączy się z elementami regulatorowymi genu CYP1A1 i działa jako czynnik transkrypcyjny. Przyłączenie kompleksu AHR/ARNT do elementu regulatorowego zachodzi wyłącznie w obecności induktora-ligandu, co może sugerować, że głównie indukowalny CYP1A1 wykorzystuje tę drogę przekazywania informacji. Jednak wyniki doświadczeń FERNANDEZ-SALQUERO i współautorów (1995) przeprowadzonych na myszach pozbawionych genu AHR dowodzą, że jego aktywność wpływa także na konstytutywną ekspresję genu CYP1A2. Poziom mRNA CYP1A2 u tych zwierząt był znacznie niższy w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Do dzisiaj nie jest znany mechanizm działania białka AHR w nieobecności ligandu. Przypuszcza się, że istnieje endogenne ligand dla tego receptora, który powoduje, że heterodimer AHR/ARNT wybiórczo wiąże się do elementów regulatorowych genów podrodziny CYP1A.

QUATTROCHI i współpracownicy opisali w 1994 roku sposób oddziaływania 3MC na transkrypcję genu CYP1A2. Zidentyfikowali oni dwa elementy regulatorowe przy 5' końcu genu. Jeden z nich nazywany XRE (xenobiotic-respon-

sive element) jest bardziej odsunięty od genu i odpowiada za jego aktywację przez kompleks AHR/ARNT. Delecja tego obszaru powoduje osłabienie indukcji przez 3-metylocholanren. U wszystkich przebadanych ssaków (myszy, szczura, królika i człowieka) jest zachowana sekwencja i położenie tego elementu. Druga sekwencja regulatorowa nie oddziałuje z kompleksem AHR/ARNT.

CYP2E1 jest stale wyrażany w wątrobie, podczas gdy w innych tkankach może być wyrażany w stanach cukrzycy wywołanej allokksanem lub pod wpływem długotrwałego działania etanolu czy acetonu. Ilość *CYP2E1* w mikrosomach wątroby wzrasta czterokrotnie po indukcji pyrazolem, 4-metylopyrazolem czy acetonem. SONG i współpracownicy (1986) wykazali też, że 4-metylopyrazol i aceton zwiększają stabilność białka. W przypadku długotrwałego oddziaływania etanolu lub acetonu wzrost poziomu białka *CYP2E1* jest głównie spowodowany zwiększeniem jego stabilności, nie zaś aktywacją transkrypcji (SONG i współaut. 1988). Transkrypcja *CYP2E1* u szczura rozpoczyna się w wątrobie w kilka godzin po urodzeniu i osiąga najwyższy poziom po 20 dniach (SONG i współaut. 1986). Badania nad aktywacją transkrypcji sugerują, że w ten proces jest zaangażowany czynnik HNF-1a (HNF — hepatocyte nuclear factor), (UENO i GONZALEZ 1990). Brak ekspresji *CYP2E1* u płodu może być związany z istnieniem inhibitora transkrypcji, brakiem odpowiedniego czynnika transkrypcyjnego lub niezdolnością chromatyny do wiązania tego czyn-

nika. Tę ostatnią hipotezę potwierdzają wyniki badań nad zmianami struktury chromatyny przed i po urodzeniu (LIU i GONZALEZ 1995).

Cytochromy P450 2D3 i 2D5 są aktywne w wątrobie i nerkach. Ekspresja genów dla tych cytochromów rozpoczyna się pierwszego dnia po urodzeniu, przy czym *CYP2D5* jest aktywowany wcześniej. Jego transkrypcja pozostaje pod kontrolą czynników C/EBP α (C/EBP — CCAAT binding/enhancer binding protein) i Sp1. Miejsca wiązania tych białek leżą przed promotorem genu. Do aktywacji transkrypcji konieczne jest związanie obu czynników, gdyż powinowactwo C/EBP α do DNA jest w nieobecności Sp1 bardzo słabe, a związanie białka Sp1 przy braku C/EBP α nie aktywuje procesu transkrypcji (GONZALEZ i LEE 1996).

CYP2D9 w nerce i wątrobie u myszy jest aktywny tylko u osobników płci męskiej. Sekwencja odpowiedzialna za aktywację jego genu nosi nazwę SDI (sex difference information) i zawiera miejsce CpG (obszar bogaty w cytozyny i guaniny), które ulega demetylacji tylko u samców. Z rejonem SDI oddziałuje, między innymi, białko GABP α/β (GA binding protein), przy czym warunkiem związania tego białka z genem *CYP2D9* w rejonie SDI jest niezdemetylowana cytozyna w miejscu CpG. Podobna sytuacja występuje w przypadku *CYP2A4* z tym, że obszar CpG jest demetylowany u samic (YOKOMORI i współaut. 1995). Innym enzymem, którego obecność jest zależna od płci jest *CYP3A10*. Gen *CYP3A10* ulega ekspresji wyłącznie w wątrobie osobników płci męskiej (CHANG i współaut. 1993).

CHOROBY ZWIĄZANE Z ZABURZENIAMI METABOLIZMU REGULOWANEGO PRZEZ P450

Różnorodne zaburzenia w funkcjonowaniu cytochromów P450 mogą prowadzić do mniej lub bardziej poważnych chorób. Posłużmy się dwoma przykładami chorób genetycznych.

Wrodzona hiperplazja nadnerczy (CAH), choroba rozpoczynająca się już w okresie prenatalnym jest związana z nadmierną aktywnością tych gruczołów. Etiologia tej choroby jest związana z uszkodzeniem genu *CYP21A*. Zbyt niskie stężenie *CYP21A* powoduje upośledzenie hydroksylacji 17 α -hydroksyprogesteronu do 11-dezoksykortyzolu. W związku z tym powstaje niedobór kortyzolu, co powoduje zwiększoną sekrecję hormonu przysadki — ACTH (hormon adrenokortykotropowy). Długotrwały wpływ wysokiego stężenia ACTH powoduje wzrost aktywności nadnerczy w kierunku produkcji sterydów androgennych, co nie wymaga udziału *CYP21A*. Choroba objawia się u noworodków

żeńskich niedorozwojem narządów rozrodczych, zaś u chłopców zewnętrzne oznaki choroby obserwuje się podczas rozwoju. Są nimi: przedwczesne zatrzymanie wzrostu połączone z silną maskulinizacją.

Cerebrotendinous xanthomatosis (CTX), to choroba związana ze wzrostem poziomu cholesterolu i cholestanolu w tkankach. Zbyt wysokie stężenia tych substancji są skutkiem niskiej aktywności *CYP27A*. U podstaw tego rzadkiego schorzenia — allel typu dzikiego jest dominujący — leży mutacja punktowa w genie *CYP27A*, która polega na tym, że Arg na pozycji 104 (CGG) została zastąpiona przez Trp (TGG) (NAKASHIMA i współaut. 1994). Kliniczne objawy choroby to zwapnienie naczyń krwionośnych, zaburzenia funkcjonowania układu nerwowego prowadzące do demencji i upośledzenia ruchowego.

ROLA CYTOCHROMÓW P450 W METABOLIZMIE LEKÓW

Metabolizm leków jest sumą procesów, jakim ulegają one w organizmie. W przemianach, którym podlegają leki można wyróżnić dwie fazy. Faza pierwsza, to reakcje utleniania, redukcji i hydrolizy, prowadzące do powstania w cząsteczce leku nowych grup funkcyjnych (na przykład grup hydroksylowych w pierścieniach aromatycznych i w alkilowych łańcuchach bocznych) lub modyfikacji grup już istniejących (na przykład oksydacyjna deaminacja). Natomiast faza druga, to reakcje sprzęgania przetworzonych w pierwszej fazie ksenobiotyków z odpowiednimi endogennymi związkami (na przykład z kwasem glukuronowym lub glutationem). Powstałe w ten sposób koniugaty są usuwane z komórki przez nośniki błonowe, znane również pod nazwą białek wielolekowej oporności — MDR (multidrug resistance protein). Układy enzymatyczne katalizujące reakcje pierwszej fazy są umiejscowione w siateczce śródplazmatycznej, natomiast faza druga zachodzi głównie w cytosolu.

Spośród 27 rodzin cytochromów P450 występujących w ludzkiej wątrobie, tylko trzy: CYP1, CYP2 i CYP3 są odpowiedzialne za metabolizm leków (WRIGHTON i STEVENS 1992). Enzymy cytochromu P450 biorące udział w metabolizmie leków odznaczają się różną specyficznością substratową. Przekształcanie poszczególnych leków może być przeprowadzane z udziałem jednego lub wielu, niekoniecznie nawet należących do tej samej rodziny, cytochromów P450. Przykładami mogą być: katalizowana wyłącznie przez CYP2E1 hydroksylacja chlorzoksazonu (PETER i współaut. 1990) oraz katalizowana zarówno przez CYP1A2, jak i CYP2E1 O-deetylowanie 7-etoksykumaryny (YAMAZAKI i współaut. 1996). Z odwrotną sytuacją mamy do czynienia wówczas, gdy pojedynczy enzym przekształca więcej niż jeden substrat. Dzieje się tak w przypadku CYP1A2 katalizującego reakcję N-demetylowania kofeiny, jak również i teofiliny (RATANASAVANH i współaut. 1990).

Często różnice we wrażliwości pacjentów na leki wynikają z genetycznego polimorfizmu cytochromów P450. U osób przyjmujących lek nasenny midazolam, obserwowano dziesięciokrotne różnice w aktywności CYP3A4 metabolizującego ten lek (LOWN i współaut. 1995). Pacjenci z niską aktywnością tego enzymu bardziej odczuwali toksyczne działanie leku.

Omawiając rolę cytochromu P450 w metabolizmie leków nie można pominąć interakcji lekowych, tematu szczególnie aktualnego obecnie, kiedy powszechnie stosuje się wielolekowe

leczenie skojarzone. Działanie podanych równocześnie leków, będących substratami tego samego cytochromu P450, zależy między innymi od ich powinowactwa do enzymu, stężenia osiągniętego w siateczce śródplazmatycznej i od wskaźnika terapeutycznego (stosunku dawki wywołującej objawy toksyczne do dawki działającej leczniczo). U pacjentów przyjmujących jednocześnie cyklosporynę i erytromycynę, substraty CYP3A4, obserwowano wzmocnienie efektu farmakologicznego pierwszego z wymienionych leków (PTACHCINSKI i współaut. 1985). Niektóre leki bezpośrednio oddziałują z jonem żelaza ugrupowania hemowego enzymu. Cymetydyna i inni antagoniści receptora H₂, hamujący aktywność enzymu z podrodziny CYP3A, działają według tego mechanizmu (RENDIC i współaut. 1983).

Osobną grupę stanowią leki indukujące cytochromy P450. Rifampicyna indukując CYP-3A4 może przyspieszyć metabolizm jego dwóch ewentualnych substratów — cyklosporyny i prednizonu (LANGHOF i MADSEN 1983, PICHARD i współaut. 1996).

W populacji ludzkiej można wyróżnić grupę osób o zwiększonej wrażliwości na niektóre leki. U tych osób lek podany w dawce terapeutycznej lub subterapeutycznej może mieć silne działania uboczne. Taka reakcja na lek nazywana jest idiosynkrazją. Udział cytochromów P450 w hepatotoksyczności idiosynkratycznej został potwierdzony przy okazji badania kaptoprilu i enalaprilu. Podanie szczyrom pregnenolonu-16- α -karbonitrilu, induktora CYP3A1, powodowało zwiększenie cytotoksyczności quinaprilu, fosinoprilu i enalaprilu, pozostając bez wpływu na cytotoksyczność kaptoprilu. Natomiast inhibitory cytochromów P450, takie jak SKF525-A i troleandomycyna osłabiały hepatotoksyczność tych leków (JURIMA-ROMET i HUNANG 1993). Hepatotoksyczność idiosynkratyczna może wynikać ze zwiększonej aktywności cytochromów P450 uczestniczących w tworzeniu toksycznych metabolitów lub obniżonej aktywności enzymów cytochromu P450, biorących udział w ich detoksykacji i eliminacji.

Poznanie skomplikowanych mechanizmów regulujących aktywność cytochromów P450 jest istotne dla bezpiecznego stosowania leków. Znajomość osobniczego profilu genów CYP można wykorzystać do określania dawek leków dla indywidualnych pacjentów. Znając pewne osobnicze anomalie profilu cytochromów P450 można określić prawdopodobieństwo idiosynkrazji u pacjenta.

SELECTED TOPICS CONCERNING THE BIOCHEMISTRY OF CYTOCHROMES P450

Summary

Cytochromes P450 are a superfamily of enzymes involved in the metabolism of numerous endogenous compounds such as steroids, bile acids, fatty acids, prostaglandins and biogenic amines. Thousands of foreign chemicals (natural plant products, drugs, environmental

pollutants, alcohols) are also metabolized by cytochromes P450. Recent advances in understanding of structures, functions and physiological roles of cytochromes P450 enzymes are presented.

LITERATURA

- AXÉN E., POSTLIND H., SJÖBERG H., WIKVALL K., 1994. *Liver mitochondrial cytochrome P450 CYP27 and recombinant-expressed human CYP27 catalyze 1 α -hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 10014-10018.
- CHANG T. K. H., TEIXEIRA J., GIL G., WAXMAN D. J., 1993. *The lithocholic acid 6 β -hydroxylase cytochrome P-450, CYP3A10, is an active catalyst of steroid-hormone 6 β -hydroxylation*. Biochem. Journ. 291, 429-434.
- CRESTANI M., GALLI G., CHIANG J. Y. L., 1993. *Genomic cloning, sequencing and analysis of the hamster cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7)*. Arch. Bioch. Bioph. 306 (2), 451-460.
- DILWORTH F. J., SCOTT I., GREEN A., STRUGNELL S., GUO Y. -D., ROBERTS E. A., KREMER R., CALVERLEY M. J., MAKIN H. L. J., JONES G., 1995. *Different mechanisms of hydroxylation site selection by liver and kidney cytochrome P450 species (CYP27 and CYP24) involved in vitamin D metabolism*. Journ. Biol. Chem. 270, 16766-16774.
- ESTABROOK R. W., 1996. *The remarkable P450s: a historical overview of these versatile hemoprotein catalysts*. FASEB Journal 10, 202-205.
- FERNANDEZ-SALQUERO P., PINEAU T., HILBERT D. M., MCPHAIL T., LEE S. S. T., KIMURA S., NEBERT D. W., RUDIKOFF S., WARD J., GONZALEZ F. J., 1995. *Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor*. Science 268, 722-726.
- GONZALEZ F. J., LEE Y-H., 1996. *Constitutive expression of hepatic cytochrome P450 genes*. FASEB J. 10, 1112-1117.
- GOTOH O., 1992. *Substrate recognition sites in cytochrome P-450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acids and coding nucleotide sequences*. J. Biol. Chem. 267, 83-90.
- GRAHAM-LORENCE S. I., PETERSON J. A., 1996. *P450s: Structural similarities and functional differences*. FASEB J. 10, 206-214.
- GUEGERICH F. J., 1991. *Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes*. J. Biol. Chem., 266, 10019-10024.
- JURIMA-ROMET M., HUANG H. S., 1993. *Comparative cytotoxicity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cultured rat hepatocytes*. Biochem. Pharmacol. 46, 2163-2170.
- LANGHOFF E., MADSEN S., 1983. *Rapid metabolism of cyclosporin and prednisone in kidney transplant patient receiving tuberculostatic treatment*. Lancet 2, 1031-1037.
- LINDBERG R. L. P. I NEGISHI M., 1989. *Alteration of mouse cytochrome P450c α substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue*. Nature 339, 632-634.
- LIU S. Y., GONZALEZ F. J., 1995. *Role of the liver-enriched transcription factor HNF-1 alpha in expression of the CYP2E1 gene*. DNA Cell. Biol. 14, 285-293.
- LOWN K. S., THUMMEL K. E., BENEDICT P. E., SHEN D. D., TURGEON D. K., BERENT S., WATKINS P. B., 1995. *The erythromycin breath test predicts the clearance of midazolam*. Clin. Pharmacol. Ther. 57, 16-24.
- MORRIS D. L., DAVILA J. C., 1996. *Analysis of rat cytochrome P450 isoenzyme expression using semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)*. Biochem. Pharmacol. 52, 781-792.
- NAKASHIMA N., SAKAI Y., SAKAI H., YANASE T., HAJI M., UMEDA F., KOGA S., HOSHITA T., NAWATA H., 1994. *A point mutation in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase in a family with cerebrotendinous xanthomatosis*. Journ. Lip. Res. 35, 663-668.
- NEBERT D. W., GONZALEZ F. J., 1987. *P450 genes: structure, evolution and regulation*. A. Rev. Bioch. 56, 945-993.
- NELSON D. R., KAMATAKI T., WAXMAN D. J., GUEGERICH F. P., ESTABROOK R. W., FEREREISEN R., GONZALEZ F. J., COON M. J., GUNSAUS I. C., GOTOH O., OKUDA K. I., NEBERT D. W., 1993. *The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature*. DNA Cell Biology, 12, 1-51.
- OKUDA K.-I., 1994. *Liver mitochondrial P450 involved in cholesterol catabolism and vitamin D activation*. Journ. Lip. Res. 35, 361-372.
- PASCOE L., CURNOV K. M., SLUTSKER L., RÖSLER A., WHITE P. C., 1992. *Mutations in the human CYP11B2 (aldosterone synthase) gene causing corticosterone methyloxidase II deficiency*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 4996-5000.
- PETER R., BOCKER R., BEAUNE P. H., IWASAKI M., GUEGERICH F. P., YANG C. S., 1990. *Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P450III₁*. Chem. Res. Toxicol. 3, 566-571.
- PICHARD L., DOMERGUE J., FOURTANIER G., KOCH P., SCHRAN H. F., MAUREL P., 1996. *Metabolism of the new immunosuppressor cyclosporin G by human liver cytochromes P450*. Biochem. Pharmacol. 51, 591-598.
- PTACHINSKI R. J., CARPENTER B. J., BURCKART G. J., VENKATATAMANAN R., 1985. *Effect of erythromycin on cyclosporine levels*. N. Engl. J. Med. 313, 1416-1417.
- QUATTROCHI L.C., VU T., TUKEY R. H., 1994. *The human CYP1A2 gene and induction by 3-methylcholanthrene*. J. Biol. Chem. 269 (9), 6949-6954.
- RATANASAVANH D., BERTHOUS F., DREANO Y., 1990. *Methylcholanthrene but not phenobarbital enhances caffeine and theophylline metabolism in cultured adult human hepatocytes*. Biochem. Pharmacol. 39, 85-94.
- RENDIC S., KAJFEZ F., RUF H. H., 1983. *Characterization of cimetidine, ranitidine, and related structures interaction with cytochrome P450*. Drug. Metab. Dispos. 11, 137-142.
- RUSSELL D. W., SETCHELL K. D. R., 1992. *Bile acid synthesis*. Biochemistry 31, 4737-4749.
- SONDERFAN A. J., ARLOTTO M. P., DUTTON D. R., MCMILLEN S. K., PARKINSON A., 1987. *Regulation of testosterone hydroxylation by rat liver microsomal cytochrome P-450*. Arch. Bioch. Bioph. 255 (1), 27-41.
- SONG B.-J., GELBOIN H. V., PARK S. S., YANG C. S., GONZALEZ F. J., 1986. *Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P-450s*. J. Biol. Chem. 261 (35), 16689-16697.

- SONG B.-J., VEECH R. L., PARK S. S., GELBOIN H. V., GONZALEZ F. J., 1988. *Induction of rat hepatic N-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due CYP21A to protein stabilization.* J. Biol. Chem. 264, 3568-3572.
- SWANSON H. I., BARFIELD C.A., 1993, *The Ah-receptor: genetics, structure and function.* Pharmacogenetics 3, 213-230.
- TYNDALE R., AOYOMA T., BROLY F., MATSUNAGA T., INABA T., KALOW W., GELBOIN H. V., MEYER U. A. I., GONZALEZ F. J., 1991. *Identification of a new variant CYP2D6 allele lacking the codon encoding Lys-281: possible association with the poor metabolizer phenotype.*, Pharmacogenetics 1, 26-32.
- UENO T., GONZALEZ F. J., 1990. *Transcriptional control of the rat hepatic CYP2E1 gene.* Mol. Cell. Biol. 10, 4495-4505.
- WRIGHTON S. A., STEVENS J. C., 1992. *The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism.* Critical Reviews in Toxicology 22, 1-21.
- YAMAZAKI H., INOUE K., MIMURA M., ODA Y., GUEGERICH F. P., SHIMADA T., 1996. *7-Ethoxycoumarin O-deethylation catalyzed by cytochromes P450 1A2 and 2E1 in human liver microsomes.* Biochem. Pharmacol. 51, 313-319
- YOKOMORI N., KOBAYASHI R., MOORE R., SUEYOSHI T., NEGISHI M., 1995. *A DNA methylation site in the male-specific P450 (Cyp2d9) promoter and binding of the heteromeric transcription factor GABP.* Mol. Cell. Biol. 15, 5355-5362.
- YOSHIKI F-K, OSAMU G., 1995. *Molecular Biology of Cytochrome P-450: Evolution, Structure and Regulation.* [W:] *Molecular Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes*, ARIN E., SCHENKMAN J. B., HODGSON E. (red.).