

KAROL DZIUBEK\*

## Zmiany poziomu cytochromu P-450 i glutationu zredukowanego (GSH) w wątrobie myszy pod wpływem podaży 5-fluorouracylu i dekstranu

### S t r e s z c z e n i e

W wątrobie myszy oznaczano poziom cytochromu P-450 i glutationu zredukowanego (GSH) pod wpływem 5-fluorouracylu i dekstranu. Poziom cytochromu P-450 określano w mg białka mikrosomalnego wątroby, zaś GSH w jednym gramie badanej tkanki. Wykazano znaczny spadek poziomu cytochromu P-450, jak i GSH zarówno pod wpływem 5-fluorouracylu, jak i dekstranu.

Na podstawie uzyskanych wyników sugeruje się, że zarówno 5-fluorouracyl, jak i dekstran nie są induktorami syntezy cytochromu P-450.

#### Wstęp

Wątroba ssaków zawiera zespół enzymatycznych i nieenzymatycznych systemów, które katalizują procesy biotransformacji ksenobiotyków, tj. egzogennych związków chemicznych o strukturach nie syntetyzowanych przez organizmy zwierzęce w polarne metabolity mogące być wydalane z moczem lub żółcią (Gebolin, 1971). Do takich należy między innymi wieloskładnikowy układ monooksygenaz, którego jednym ze składników jest cytochrom P-450 (Gander i Mannering, 1980).

---

\* Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Krakowie.

W procesach biotransformacji ksenobiotyków powstaje wiele pośrednich metabolitów, z których sporo jest toksycznych. Detoksyfikacja tych metabolitów polega między innymi na ich sprzęganiu z GSH.

Indukcja względnie hamowanie syntezy cytochromu P-450 mają wpływ na szybkość metabolizmu leków, a tym samym na ich efekty terapeutyczne. W związku z powyższym interesującym wydaje się problem określenia poziomu cytochromu P-450 w wątrobie myszy pod wpływem 5-fluorouracylu, powszechnie stosowanego cytostatyku i dekstranu, leku osłonowego. Jeżeli bowiem nastąpi ewentualna indukcja syntezy cytochromu P-450, to efekty farmakologiczne leków cytostatycznych będą obniżone, być może nawet poniżej poziomu terapeutycznego. W takiej sytuacji w miarę trwania terapii należałoby zwiększać dawki cytostatyków. Z drugiej zaś strony hamowanie syntezy białek pod wpływem cytostatyków jest powszechnie znane (Der i inni, 1975), co może mieć także wpływ na syntezę monoooksygenaz.

Również ze względu na fakt, że 5-fluorouracyl wywołuje zaburzenia metabolizmu komórek, interesującym wydawało się określenie także poziomu GSH, trójpeptydu uczestniczącego w odtoksycznianiu wielu metabolitów.

#### **Materiał i metodyka badań**

Do badań użyto 80 samców myszy białej, dojrzałych płciowo o średniej wadze 25 g, które żywiono pokarmem standardowym i hodowano w warunkach oświetlenia LD 12:12. Zwierzęta przeznaczone do badań podzielono na dwie grupy kontrolne i osiem grup doświadczalnych. Zwierzętom grup doświadczalnych podawano 5-fluorouracyl w dawce 1.5 mg/kg wagi ciała, dekstran 40 000 mol w dawce 0.3 ml, przez siedem kolejnych dni i na przemian 5-fluorouracyl i dekstran przez sześć dni (3 iniekcje 5-fluorouracylu i 3 iniekcje dekstranu).

W grupach doświadczalnych zwierzęta zabijano bezpośrednio po ostatniej iniekcji i w przypadku zwierząt, którym podawano sam dekstran i dekstran na przemian z uracylem, także po siedmiu dniach od ostatniej iniekcji.

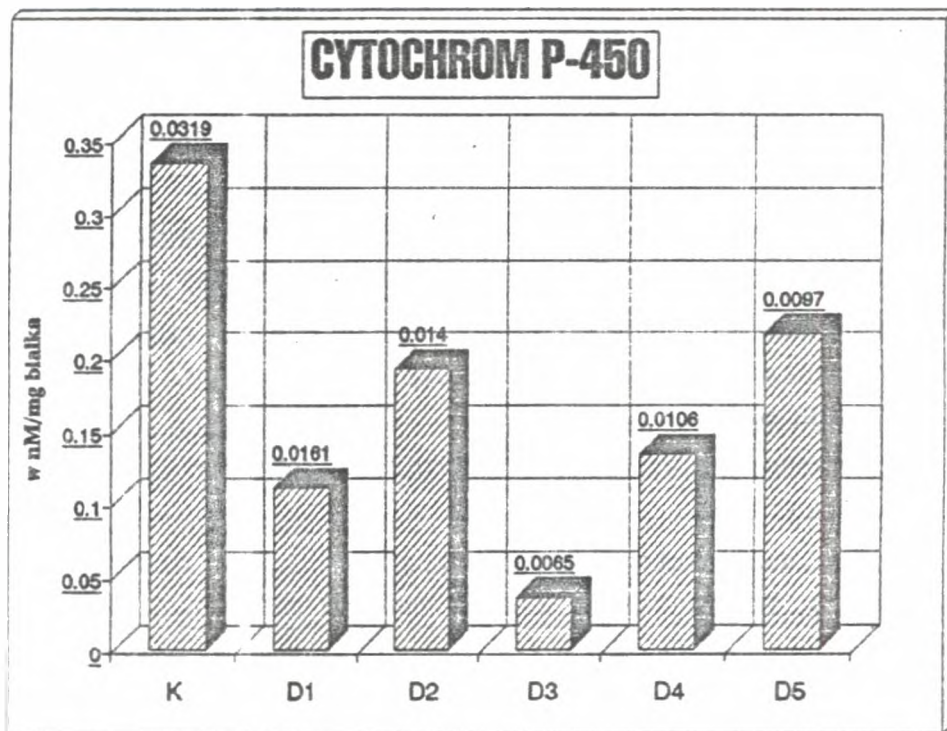
Cytochrom P-450 oznaczano w mikrosomach wątroby myszy metodą Omury i Sato (1964), zaś GSH metodą Ellmana (1959). Poziom cytochromu P-450 wyrażano w nM/mg białka mikrosomalnego, GSH w  $\mu\text{M/g}$  wątroby. Z uzyskanych danych wyliczono średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe. Dla stwierdzenia czy uzyskane zmiany poziomu cytochromu P-450 i GSH pomiędzy kontrolą a poszczególnymi grupami badawczymi są statystycznie istotne zastosowano test "t" Studenta-Gosseta.

### **Wyniki badań**

Uzyskane dane wskazują, że poziom cytochromu P-450 i GSH w wątrobie myszy wykazują zmiany po podaży 5-fluorouracylu i dekstranu. Wszystkie dane liczbowe zestawiono w tab. 1, 2 i zilustrowano je ryc. 1 i 2. W mikrosomach wątroby zwierząt kontrolnych stwierdzono wysoki poziom cytochromu P-450. Dekstran 40 000 spowodował spadek poziomu cytochromu P-450 u zwierząt, które zabijano bezpośrednio po ostatniej iniekcji, jak i u tych, które zabijano po siedmiu dniach od ostatniej iniekcji.

Znacznie wyraźniejszy spadek poziomu cytochromu P-450 odnotowano po podaży 5-fluorouracylu. Spadek ten był również wyraźny, choć nie tak wysoki jak u zwierząt, którym podawano dekstran na przemian z uracylem. W wątrobie myszy po podaży samego dekstranu uzyskano nieznaczny, choć również statystycznie istotny spadek poziomu GSH u zwierząt, które zabijano bezpośrednio po iniekcji, jak i u tych, które były badane po siedmiu dniach od ostatniej iniekcji. Spadek ten był wyraźniejszy u tych zwierząt, którym podawano sam 5-fluoro-

uracyl i dekstran na przemian z 5-fluorouracylem i które zabijano w siódmym dniu od ostatniej iniekcji.



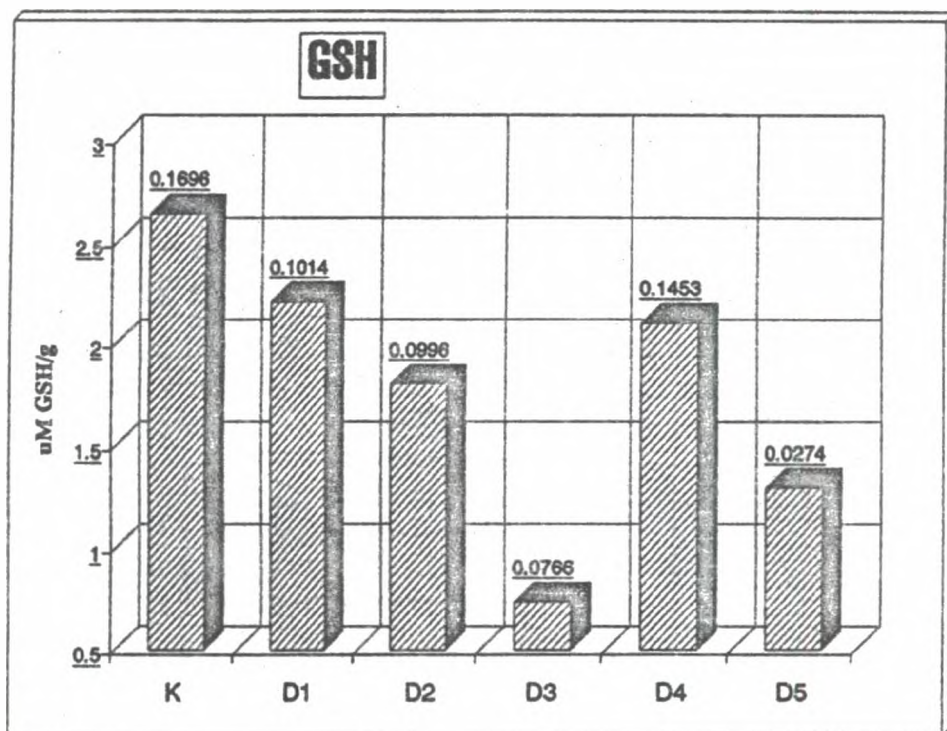
Ryc. 1. Zmiany poziomu cytochromu P-450 w mikrosomach wątroby myszy pod wpływem podaży 5-fluorouracylu i dekstranu. Oznaczenia: D1 - Dekstran, cytochrom oznaczano bezpośrednio po ostatniej iniekcji; D2 - Dekstran, po 7 dniach od ostatniej iniekcji, D3 - Uracyl, bezpośrednio po ostatniej iniekcji, D4 - Dekstran + Uracyl (na przemian), bezpośrednio po ostatniej iniekcji, D5 - Dekstran + Uracyl, po 7 dniach od ostatniej iniekcji.

Tabela 1

Zmiany poziomu cytochromu P-450 w mikrosomach wątroby myszy pod wpływem podaży 5-fluorouracylu i dekstranu

Grupa badawcza	Cytochrom P-450 w nM/mg białka mikrosomalnego	% kontroli	Odchylenie standardowe S	% S	Średni błąd Sx	"t"
Kontrola	0.3339	100	0.0319	9.55	0.011	
Dekstran 40 000 mol (D <sub>1</sub> )	0.1103	33.03	0.0161	14.59	0.0056	51.5207*
Dekstran 40 000 mol (D <sub>2</sub> )	0.1914	57.32	0.0140	7.31	0.0049	33.6008*
5-fluorouracyl (D <sub>3</sub> )	0.0355	10.36	0.0065	18.39	0.0022	76.5128*
Dekstran/5-fluorouracyl (D <sub>4</sub> )	0.1332	39.89	0.0106	7.95	0.0037	49.1911*
Dekstran/5-fluorouracyl (D <sub>5</sub> )	0.2154	64.51	0.0097	4.50	0.0034	29.3316*

Każda grupa badawcza zawierała po 8 osobników. \*Statystycznie istotne przy  $p \leq 0.001$   
 Oznaczenia: D<sub>1</sub> - bezpośrednio po ostatniej iniekcji, D<sub>2</sub> - po 7 dniach od ostatniej iniekcji, D<sub>3</sub> - bezpośrednio po ostatniej iniekcji, D<sub>4</sub> - bezpośrednio po ostatniej iniekcji, D<sub>5</sub> - po 7 dniach od ostatniej iniekcji.



Ryc. 2. Zmiany poziomu glutationu zredukowanego (GSH) w wątrobie myszy pod wpływem podaży 5-fluorouracylu i dekstranu. Oznaczenia jak na ryc. 1.

Tabela 2

Zmiany poziomu glutationu zredukowanego (GSH) w wątrobie myszy pod wpływem podaży 5-fluorouracylu i dekstranu

Grupa badawcza	GSH w $\mu\text{g/g}$ wątroby	% kontroli	Odchylenie standardowe S	% S	Sredni błąd Sx	"t"
Kontrolna	2.6368	100	0.1696	6.43	0.0599	
Dekstran 40 000 mol ( $D_1$ )	2.2052	83.63	0.1014	4.59	0.0358	17.5020*
Dekstran 40 000 mol ( $D_2$ )	1.7994	68.24	0.0996	5.5351	0.0352	34.1795*
5-fluorouracyl ( $D_3$ )	0.7367	27.93	0.0766	10.3991	0.0270	81.9008*
Dekstran/5-fluorouracyl ( $D_4$ )	2.1000	79.64	0.1453	6.9190	0.0513	19.3093*
Dekstran/5-fluorouracyl ( $D_5$ )	1.2986	49.24	0.0274	2.1099	0.0096	62.4451*

Każda grupa badawcza zawierała po 8 osobników. \*Statystycznie istotne przy  $p \leq 0.001$   
 Oznaczenia:  $D_1$  - bezpośrednio po ostatniej iniekcji,  $D_2$  - po 7 dniach od ostatniej iniekcji,  $D_3$  - bezpośrednio po ostatniej iniekcji,  $D_4$  - bezpośrednio po ostatniej iniekcji,  $D_5$  - po 7 dniach od ostatniej iniekcji.



## Dyskusja

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że 5-fluorouracyl oraz dekstran wywołują statystycznie istotny spadek poziomu cytochromu P-450 i GSH w wątrobie myszy. W przypadku zwierząt, które otrzymywały sam dekstran spadek poziomu cytochromu P-450 i GSH był wyraźnie mniejszy. U zwierząt, którym podawano na przemian 5-fluorouracyl z dekstranem stwierdzono wprawdzie statystycznie istotny spadek poziomu zarówno cytochromu P-450, jak i GSH w porównaniu z grupą kontrolną, lecz nie tak znaczny, jak pod wpływem podażu samego 5-fluorouracylu.

Leki oraz trucizny środowiskowe ulegają detoksykacji w reakcjach utleniania enzymatycznego i w reakcjach nieenzymatycznego sprzęgania, np. z GSH, po czym zostają wydalone (Parke i Otrębska-Parke, 1987). Alternatywnie związki chemiczne mogą być też utleniane enzymatycznie, lecz utworzone metabolity pośrednie nie wchodzi dalej w reakcję sprzęgania. Reagują one nieenzymatycznie z białkami, DNA oraz z GSH, powodując śmierć komórek. Metabolity pośrednie mogą również reagować z tlenem, tworząc aktywne rodniki tlenowe, które powodują peroksydację lipidów, rozerwanie błon komórkowych oraz także uszkodzenia DNA, co w konsekwencji prowadzi do martwicy tkanek, mutacji, zmian nowotworowych lub degeneracyjnych, włączając w to miażdżycę naczyń, cukrzycę czy chroniczne stany zapalne (Hallivel i Gutteridge, 1984; Kensler i Trush, 1984).

Utlenianie leków oraz innych związków chemicznych w fazie utleniania enzymatycznego jest katalizowane przez układ cytochromu P-450. Enzymy należące do rodziny cytochromu P-450 katalizują utlenianie "łatwo dostępnych" miejsc w cząsteczkach związków chemicznych, co umożliwia następnie fazę sprzęgania z glutationem i związaną z nią detoksykację (Gelboin, 1983).



Ortiz de Montello i Correia (1983) sądzą, że syntezę cytochromu P-450 hamują głównie nadtlenki lipidów i metale ciężkie. Zdaniem zaś Parke i Parke (1987) cytochrom P-450 jest wybiórczo niszczony w przewlekłych stanach zapalnych (choroby reumatyczne) oraz przez aktywne rodniki tlenu tworzone pod wpływem toksycznych związków chemicznych i kancerogenów.

W obecnej pracy stwierdzono spadek poziomu cytochromu P-450 w wątrobie myszy pod wpływem podaży 5-fluorouracylu. 5-fluorouracyl jest fluorowaną pirymidyną i wywołuje blok biosyntezy endogennych zasad pirymidynowych oraz hamuje cykl mitotyczny. 5-fluorouracyl ulega w organizmie konwersji do trójfosfonukleozydu i zostaje wbudowany w informacyjny RNA zamiast uracylu, hamując tym samym biosyntezę RNA (Czarnecki, 1987).

Stwierdzony spadek indukcji syntezy cytochromu P-450 w przypadku podaży 5-fluorouracylu należałoby wiązać ze spadkiem syntezy RNA i białka w hepatocytach wątroby. Sugestia ta koresponduje z danymi Parke (1982), który twierdzi, że leki przeciwnowotworowe powodują tworzenie się wolnych rodników, powstawanie nadtlenków lipidów, rozrywanie błon komórkowych, uszkodzenia DNA i wiele mutacji, co w efekcie wyraźnie hamuje biosyntezę cytochromu P-450.

Dekstrany w zależności od wielkości cząsteczki różnie się zachowują w ustroju zwierzęcia. Dekstrany o dużej cząsteczce są bardzo toksyczne. Mianowicie uszkadzają narządy ciała i powodują powstawanie ognisk martwicy w wątrobie. Przyjmuje się jednak, że dekstrany o mniejszej cząsteczce niż 20 000 mol nie są toksyczne (Supniewski, 1966). Zdaniem zaś Czarneckiego (1987) dekstrany w ogóle nie uszkadzają narządów mięsnych.

Uzyskane dane sugerują jednak, że dekstran 40 000 mol obniża poziom cytochromu P-450. Być może dzieje się tak dlatego, że właśnie tak jak sugeruje Supniewski (1966) dekstrany są toksyczne i

uszkadzają hepatocyty wątroby, obniżając w ten sposób syntezę cytochromu P-450, ale pod warunkiem, że są podawane przez dłuższy okres czasu.

Metabolity 5-fluorouracylu oraz dekstranu po enzymatycznym utlenieniu, w którym uczestniczy cytochrom P-450, ulegają w dalszej kolejności sprzęganiu z GSH. W wątrobie zwierząt w warunkach fizjologicznych stwierdza się znaczny poziom GSH, u wielu badanych zwierząt laboratoryjnych. Od poziomu GSH zależy między innymi intensywność biosyntezy białka, syntezy RNA jądrowego, intensywność podziałów mitotycznych i integralność membran cytoplazmatycznych (Joce-lyn, 1972). Poziom GSH ma więc istotne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórek, organów i całego ustroju, o czym świadczą między innymi badania Flohé i wsp. (1974). Badania te wykazują, że poziom GSH świadczy o ogólnym stopniu przemian metabolicznych u zwierząt i człowieka.

Wykazany spadek poziomu GSH zarówno po podaży 5-fluorouracylu, jak i dekstranu sugeruje, że leki te podawane przez dłuższy okres nie są obojętne dla organizmu zwierząt. Podając je, obniżamy właściwości detoksykacyjne wątroby.

W konkluzji należy stwierdzić, że 5-fluorouracyl oraz dekstran podawane w wybranych dawkach wywołały efekt z przewagą zahamowania syntezy monooksygenaz. Nie stwierdzono faktu indukcji syntezy cytochromu P-450.

### Literatura

Czarnecki R., 1987. Wpływ leków na wyniki klinicznych badań laboratoryjnych. Akad. Med. im. M. Kopernika w Krakowie.

- Der S., Jonek J., Konecki J., 1975. The effect of 5-fluorouracil on the mitotic cycle and DNA synthesis in the epithelium of mouse small intestine. *Folia Histochemica et Cytochemica*. Vol. 13, 21-35.
- Ellman G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70-77.
- Flohé L., Benöhr H.C.N., Sies H., Waller H.D., Wendel S., 1974. *Glutathione*. Acad. Press New York.
- Gander J.E., Mannering G.J., 1980. Kinetics of hepatic cytochrome P-450 dependent monooxydase systems. *Pharmac. Ther.* 10, 191-221.
- Gelboin H.V., 1971. Mechanisms of induction of drug metabolism enzymes; In *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition* (Edited by LaDu D.N., Mandel H.G., Way E.L.), pp. 279-307. Williams Wilkins, Baltimore.
- Gelboin H.V., 1983. Carcinogen, drugs and cytochromes P-450. *New Engl. J. Med.* Vol. 309, 105-106.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* Vol. 219, 1-4.
- Jacoby W.B., Habig W.H., 1980. Glutathione transferases. In: *Enzymatic basis of detoxication* (Jakoby W.B., ed.). Vol. II, 63-93, Academic Press, New York.
- Jocelyn P., 1972. *Biochemistry of the SH group*. Academic Press, London, New York.
- Kensler T.W., Trush M.A., 1984. Role of oxygen radicals in tumor promotion. *Environ. Mutagen.* Vol. 6, 593-616.
- Omura T., Sato R., 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378.

- Ortiz de Montellano P.R., Correia M.A., 1983. Suicidal destruction of cytochrome P-450 during oxidative drug metabolism. *Ann. Rev. P-pharmacol. Toxicol.* 23, 481-503.
- Parke D.V., 1982. Mechanism of chemical toxicity: A unifying hypothesis. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.*, 2. 267-286.
- Parke D.V., Otrębska-Parke M.J., 1987. Biochemical mechanisms of chemical toxicity. *Folia Med. Cracov.* Vol. 28, 27-46.
- Parke A.L., Parke D.V., 1987. Genetic and environmental aspects in of drug metabolism relevant to side-effects in arthritic disease. In *Proceedings of the Second Symposium on the Adverse Effects of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs* (ed. K. Ransford), CRS Press Inc., 1987.
- Supniewski J., 1966. *Farmakologia. PZWL*, pp. 330-331.

Karol Dziubek

CHANGES IN THE LEVEL OF CYTOCHROME P-450  
AND REDUCED GLUTATHIONE (GSH)  
IN THE LIVER OF MICE TREATED WITH  
5-FLUOROURACIL AND DEXTRANE

S u m m a r y

The effect of 5-fluorouracil and dextrane on the activity of cytochrome P-450 and reduced glutathione (GSH) in the mouse liver was examined. The cytochrome P-450 content was determined in mg of the liver microsomal protein, while that of GSH was given in 1 g of the analysed tissue. The action of 5-fluorouracil and dextrane caused a considerable decrease in the content of cytochrome P-450 as well as in that of GSH. The results obtained seem to indicate that both 5-fluorouracil and dextrane do not induce the synthesis of cytochrome P-450.

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЦИТОХРОМА P-450  
А ТАКЖЕ ГЛЮТАТИОНА  
(GSH) РЕДУЦИРОВАННОГО В ПЕЧЕНИ МЫШИ  
ПОД ВЛИЯНИЕМ ИНЪЕКЦИИ 5-ФЛЮОРОУРАЦИЛЯ И ДЕКСТРАНА

Р е з ю м е

В печени мыши отмечался уровень цитохрома P-450, а также (GSH), который был редуцирован под влиянием 5-флюороурациля и декстрана. Уровень цитохрома P-450 определялся в мг. микросомального белка печени, а (GSH) в одном грамме исследованной ткани.

Было отмечено значительное падение цитохрома P-450 и (GSH) так под влиянием 5-флюороурациля, как и декстрана. Полученные данные наводят на мысль, что так 5-флюороурацил как и декстран не являются индукторами синтеза цитохрома P-450.